



Universidad Nacional Autónoma de México
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA

**ESTUDIO SOBRE LA RECAPTURA DE LA HORMONA
LIBERADORA DE LA TIROTROPINA (TRH) EN EL
CEREBRO Y LA HIPOFISIS DE LA RATA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P r e s e n t a
Georgina Ponce Romero



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

CONTENIDO

I INTRODUCCION

- 1 Control central de las secreciones de la adenohipófisis
- 2 Aislamiento de los factores de liberación
- 3 Generalidades de la TRH
 - a- Características químicas de la TRH
 - b- Acción sobre la adenohipófisis
 - c- Localización regional y subcelular
 - d- TRH en el sistema nervioso central
 - e- Biosíntesis de la TRH
 - f- Liberación
 - g- Inactivación de la TRH

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

III OBJETIVOS

IV HIPOTESIS

V MATERIAL Y METODOS

a- Reactivos

b- Metodología

- Purificación de la TRH(³H-pro) comercial / análisis de la pureza de la TRH, prolina y Gaba
- Captura de TRH, prolina y Gaba
- Análisis de los productos captados

- Captura de TRH en presencia de dinitrofenol, ouabaína y un medio sin glucosa
- Medición del espacio extracelular
 - Purificación de Inulina
 - Espacio extracelular
- Captura de ácido gama aminobutírico (Gaba)
 - Captura de Gaba
 - Análisis de la radiactividad asociada
 - Captura de Gaba en presencia de dinitrofenol, ouabaína y un medio sin glucosa
- Determinación de proteína por el método de Lowry
- Análisis de los datos
 - Captura de TRH(³H-pro) y prolina ¹⁴C y análisis del medio de incubación
 - Captura de TRH en presencia de dinitrofenol, ouabaína y un medio sin glucosa
 - Cálculo del espacio extracelular

VI RESULTADOS

- Optimización de la TRH comercial
- Optimización de la radiactividad asociada al tejido
- Captura de TRH
 - Demostración de que la TRH intacta se asocia al tejido
 - Demostración de que la TRH detectada en el tejido proviene del medio de incubación
 - La TRH en el espacio extracelular

- Curso en el tiempo de la asociación de la TRH(³H-pro) al tejido
 - Asociación de TRH al tejido- Dependencia de la cantidad de tejido incubado
 - Asociación de TRH al tejido- Dependencia de la concentración de la hormona en el medio de incubación
 - Caracterización del fenómeno de baja afinidad
 - Efecto del dinitrofenol, ouabaina y un medio sin glucosa en la captura de TRH
-
- Captura de la TRH en adenohipofisis
 - Captura de prolina y Gaba en el hipotálamo

VII DISCUSION DE LOS RESULTADOS

VIII CONCLUSIONES

IX ANEXO 1

X BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

1- Control central de las secreciones de la adenohipófisis

Los resultados obtenidos por Hinsey y Markee (32) durante los estudios sobre el control de las secreciones de la hipófisis anterior, hicieron que estos autores propusieran que una señal de origen en el sistema nervioso central puede afectar la función de la adenohipófisis. Basados en esta proposición y apoyados en estudios realizados por otros investigadores (21) Green y Harris (18) en 1947 propusieron que neuronas localizadas en el hipotálamo eran capaces de segregar a la circulación portal hipotálamo hipofisiaria ciertas sustancias ahora llamadas factores de liberación, inhibidores de la liberación o también hormonas hipotalámicas que estimulan o inhiben la secreción de hormonas hipofisarias y son esenciales para el funcionamiento normal de la adenohipófisis. La secreción de estas sustancias son el resultado de la integración de varias influencias (internas y externas). Fig. 1

La adenohipófisis es una glándula de origen ectodérmico y sus células no están innervadas directamente.

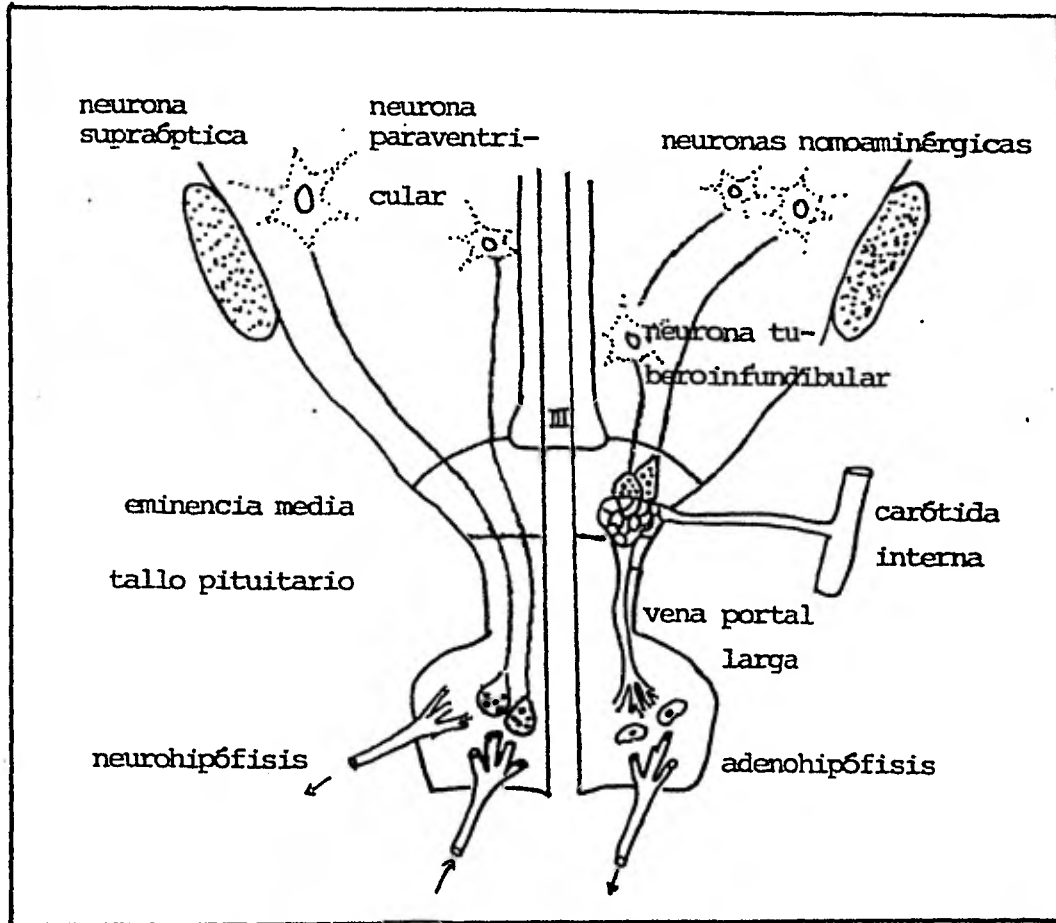


FIGURA. 1 DIAGRAMA DEL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIARIO. IZQUIERDA: SISTEMA HIPOTALAMICO-NEUROHIPOFISIARIO, AXONES DE LOS NUCLEOS SUPRAOPTICO Y PARAVENTRICULAR TERMINAN SOBRE LOS VASOS SANGUINEOS EN LA NEUROHIPOFISIS. DERECHA: EL SISTEMA HIPOTALAMO-ADEHIPOFISIARIO, TERMINACIONES DE NEURONAS TUBEROINFUNDIBULARES TERMINAN SOBRE EL PLEXO CAPILAR DE LA EMINENCIA MEDIA.

CUADRO 1: continuación

Hormona liberadora de MSH
(MSH-RH no identificado)

Hormona estimulante de
los melanocitos MSH

Hormona inhibidora de la libe
ración de MSH (MSH-RIH
tripéptido ?)

HORMONA HIPOFISIOTROFICA

HORMONA HIPOFISARIA

Hormona liberadora de tirotropina
(TRH tripéptido,)

Tirotropina TSH

Hormona liberadora de ACTH
(CRF 39 aminoácidos }

Corticotropina ACTH

Hormona liberadora de LH y FSH
(LHRH decapeptido)

Hormona luteinizante LH
Hormona folículo estimu
lante FSH

Hormona liberadora de hormona
de crecimiento
(GRF decapeptido)

Hormona de crecimiento GH

Hormona inhibidora de la libera
ción de GH
(SRIF o somatostatina 14
aminoácidos)

Hormona liberadora de prolactina
(PRF tripéptido ?)

Prolactina PRL

Hormona inhibidora de la liberación
de prolactina { PIF diferente
de dopamina no identificado }

CUADRO 1 HORMONAS HIPOTALAMICAS QUE PARTICIPAN EN LA
SECRECION DE HORMONAS HIPOFISARIAS.

La glándula esta formada por tres porciones:

- a) Pars distalis
- b) Pars intermedia
- c) Pars tuberalis

El cuadro 1 lista las hormonas hipotalámicas reconocidas hasta el presente y la hormona sobre cuya secreción ejerce sus efectos.

La neurohipófisis es una estructura neural que contiene axones secretorios que provienen de los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo (figura 1). Es decir, el lóbulo posterior es una prolongación del diencéfalo que secreta dos hormonas: vasopresina (hormona antidiurética) y la oxitocina que provoca la contracción de los músculos lisos del aparato genital.

La neurohipófisis recibe flujo sanguíneo de la arteria carótida interna. El lóbulo posterior recibe diferente flujo sanguíneo, aunque en el hombre se ha visto que la sangre que viene del lóbulo posterior puede entrar al lóbulo anterior. Fig.1

2- Aislamiento de las hormonas hipotalámicas

Schally y col (49) lograron aislar y caracterizar tres factores que inducen la liberación de hormonas hipofisarias a partir de un extracto obtenido de 500,000 hipotálamos de ovinos y bovinos. Probaron las diferentes fracciones (resultado de los pasos de purificación) en un sistema de incubación de adenohipófisis in vitro donde se midió la cantidad de hormona hipofisaria secretada utilizando radioinmunoanálisis.

El primer factor de liberación aislado fué la TRH (6,7, 20). El responsable de la liberación de LH (LH-RH) y el factor que inhibe la liberación de hormona de crecimiento GH-RH o somatostatina fueron aislados después (48,49). Más recientemente, utilizando la misma metodología Vale y col. aislaron el factor estimulante de la secreción de ACTH (54). Todos los factores de liberación aislados hasta el presente son de naturaleza peptídica.

La primera hormona hipotálámica de liberación aislada e identificada utilizando la metodología antes descrita fué la TRH y la caracterización de la molécula condujo a demostrar que posee la estructura que se muestra en la figura 2 (48).

3- GENERALIDADES DE LA TRH

a- Características químicas de la TRH

La TRH es un tripéptido de la familia de los L-aminoácidos cuyas terminaciones amino y carboxi están bloqueadas. Esta característica es común para la hormona obtenida de diferentes fuentes biológicas (7). Diversos autores han demostrado que la posición -----

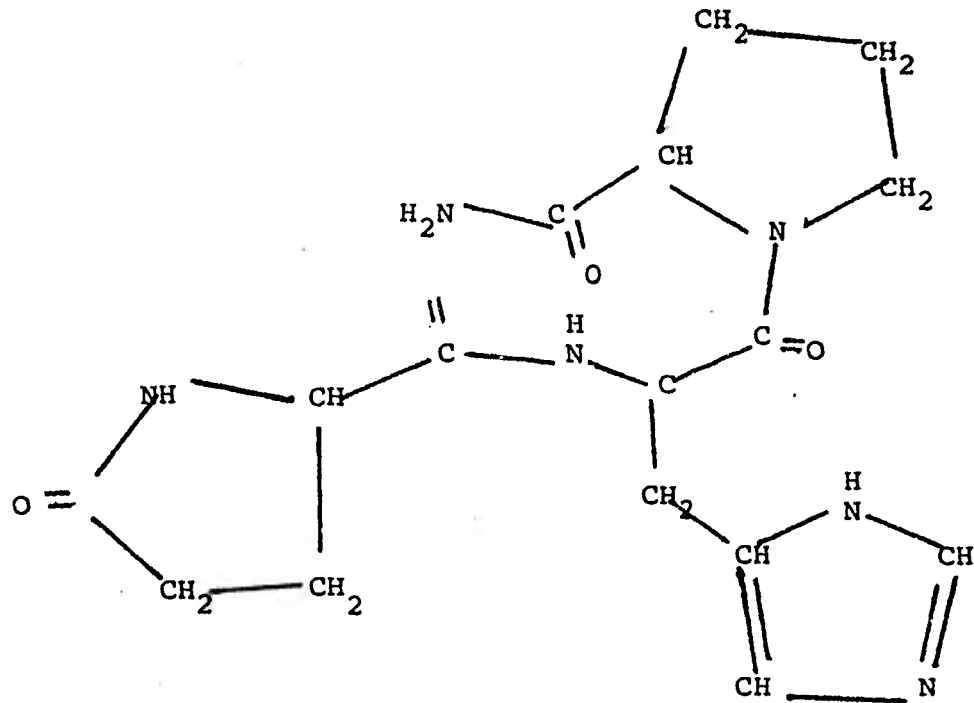


FIGURA 2 ESTRUCTURA QUIMICA DE LA TRH

glutamil cíclica parece ser fundamental para la actividad biológica de la hormona (15, 52). Cambios en el residuo histidil provocan una disminución significativa de la actividad hormonal.

Asimismo, la integridad del anillo imidazol es también fundamental para mantener las características funcionales de la hormona. Estudios en los que se introdujeron modificaciones a este anillo, se acompañaron de alteraciones del pKa, aromaticidad y libertad en la rotación espacial de la molécula. Otros estudios han demostrado que la amida terciaria de la prolinamida es esencial para las acciones de la hormona.(15,52) .

b- Acción sobre la adenohipófisis.

Una vez conocida su estructura fué posible sintetizar TRH y usarla en pruebas biológicas. La TRH sintética es capaz de estimular la liberación de tirotropina (TSH) y también de prolactina en la adenohipófisis de todas las especies de mamíferos probados, sin importar la ruta de administración, edad o sexo (2, 20) .

Después de la administración de TRH se produce un aumento del nivel de TSH en la sangre, así como de los niveles plasmáticos de triyodotiroinina y tiroxina (14). La TRH parece actuar sobre la membrana plasmática del tirotropo a través de receptores de alta afinidad (K_D de magnitud nanomolar) donde induce la liberación de la TSH que llega a la tiroides y causa la secreción de T3 y T4.

Las acciones de la TRH sobre el tirotrofo son inhibidas por las hormonas tiroideas. Estas no afectan la unión del péptido a su receptor (30). Se supone que las hormonas tiroideas actúan dentro de la célula e inducen la síntesis de un FNA_m quien ordena la síntesis de una proteína reguladora (no caracterizada aún). Esta inhibe el efecto que resulta de la acción de la TRH sobre su receptor.

Debido a que la TRH es rápidamente degradada por el plasma y con el objeto de estudiar más a fondo sus efectos, se han sintetizado varios análogos de misma, los cuales muestran cambios drásticos en la potencia del fármaco, más que cambios en la actividad intrínseca del mismo. La actividad de algunos análogos de la TRH se muestra en el cuadro 2.

La actividad biológica de todos estos análogos está correlacionada con su capacidad para desplazar la TRH de los sitios de unión encontrados en la hipófisis. Esto sugiere que los sitios de unión encontrados, corresponden a los receptores fisiológicos.

c- Localización regional y subcelular de la TRH

A fin de relacionar las acciones hormonales con los sitios donde se encuentra la TRH, la distribución de ésta se ha estudiado en algunas regiones del cerebro por radioinmunoensayo (9) aprovechando la existencia de anticuerpos específicos anti TRH.

La concentración más alta de TRH inmunoreactiva fué encontrada en el hipotálamo. También se encontraron cantidades aprecia-

bles en otras regiones como cerebro anterior, tallo encefálico y diencéfalo posterior. En el cuadro 3 se presentan las regiones del SNC donde se ha localizado su existencia y las concentraciones medidas.

Brownstein (9) estudió la distribución de la TRH utilizando técnicas de inmunofluorescencia y observó que la eminencia media, las porciones medial y lateral del núcleo ventromediano, el núcleo dorsomediano, el núcleo arcuato y el núcleo ventricular dan reacciones positivas frente a los anticuerpos marcados. Usando técnicas de inmunohistoquímica, Hokfelt (24) encontró reacciones positivas a la TRH en el órgano vasculoso, el núcleo acumbens y en la médula espinal, principalmente en el asta ventral y en el epéndimo.

También se ha encontrado TRH en animales inferiores con un patrón de distribución diferente para cada especie. En estos animales la TRH no tiene influencia sobre la función tiroidea (25).

Por métodos de fraccionamiento subcelular se comprobó que tanto en el hipotálamo como en el resto del cerebro, la TRH se encuentra esencialmente en terminaciones nerviosas (5).

d- TRH en el sistema nervioso central.

La TRH, además de su función en el control de la secreción de TSH y prolactina por la adenohipófisis, se considera que actúa como neurotransmisor por la amplia distribución que tiene en el SNC.

AREA DEL CEREBRO	TRH pg x mg TEJIDO ⁻¹	
	MEDIA	LIMITES
CEREBRO EXTRAHIPOTALAMICO		
Tallo cerebral	5	4-5
Cerebelo	2	1-3
Diencéfalo	6	3-12
Lóbulo olfatorio	6	5-8
Corteza cerebral	2	1-3
COMPLEJO HIPOTALAMO-HIPOFISARIO		
Hipotálamo dorsal	49	41-61
Hipotálamo ventral	64	23-106
Eminencia media	3570	920-7600
Hipófisis anterior	10	8-11
Hipófisis posterior	.155	150-160

Cuadro 3

DISTRIBUCION DE TRH EN EL CEREBRO DE
LA RATA (tomado de 9)

Otros efectos de la TRH en el sistema nervioso central (SNC) incluyen los mencionados a continuación:

a- Potenciación de la acción excitatoria de acetilcolina en neuronas corticales (58).

b- Antagoniza el tiempo de sueño inducido por barbitúricos y etanol principalmente cuando se administra en la región septal(45).

c- Potencia los cambios conductuales resultado de un aumento de 5-hidroxitriptamina en ratas (17).

d- Potencia los efectos estimulantes de la L-dopa en ratas y ratones pretratados con pargilina, una prueba para discernir la acción de fármacos antidepresivos(44)

e- Antagoniza los efectos endocrinológicos y conductuales de algunos péptidos, por ejemplo: la neurotensina inyectada intracranealmente, produce hipotermia. Este efecto es antagonizado por agentes bloqueadores dopaminérgicos y colinérgicos y es parcialmente invertido por la TRH(46).

Piva y Steiner (43) administraron TRH a ratas y observaron que la hormona produce un estado de alerta generalizado, lagrimeo y estremecimiento(piloerección,

erección de la cola y temblor).

La TRH ha sido usada experimentalmente como antidepresivo (depresión unipolar) y en el síndrome de abstinencia alcohólica; también ha sido usado en casos clínicos de esquizofrenia, induciendo mejoría clínica en la mayoría de los pacientes. Sin embargo, en sujetos esquizofrénicos-paranoicos, el cuadro clínico empeoró después de la administración de TRH.

Nagawa (38) propone a la TRH como un neuromodulador que controla el estado conciente, la temperatura corporal y la actividad mental, correlacionándolo con la eficacia clínica de la TRH en desordenes mentales (por ejemplo eleva el estado conciente, atención, interés, motivación, manejo de la expresión emocional y contacto social).

En mujeres normales la TRH produce relajación, euforia y altera los patrones de comportamiento (55).

Además de sus efectos neuroquímicos y sobre el comportamiento, la TRH inhibe o excita neuronas en varias regiones del cerebro (27).

Burt (33) demostró la existencia de sitios de unión para la TRH en diferentes regiones del encéfalo de la oveja. Observó que en todo el encéfalo existen zonas de afinidad y especificidad para la TRH similares a los encontrados en la adenohipófisi -

sis. La zona de mayor concentración fué el núcleo acumbens. En este sitio la inyección de TRH provoca alteraciones en el comportamiento y efectos neuroquímicos(34). En el cuadro 4 se lista los sitios del encéfalo donde se ha demostrado la unión de TRH a receptores.

e- Biosíntesis de la TRH

A pesar de que la molécula de TRH fué caracterizada hace ya 13 años, actualmente se conoce poco sobre su sitio de síntesis y mecanismo de la misma. Los primeros estudios sobre biosíntesis de TRH fueron realizados por Reichlin y col.(37) utilizando un sistema de incubación in vitro; la presencia de cicloheximida (un veneno ribosomal) en el sistema de incubación no provocó una disminución en la radiactividad que migró junto con la TRH sintética. Estos resultados apoyan la idea de estos investigadores, quienes sugieren la existencia de un mecanismo de biosíntesis independiente de los ribosomas citoplasmáticos. Este mecanismo involucra la existencia de una enzima soluble a la que se denominó sintetasa de TRH. También se ha propuesto que el mecanismo es similar al de la sintetasa del glutatión(50). Posteriormente los trabajos de Mc Kely y col (34) demostraron que la metodología utilizada en los trabajos antes mencionados no era suficiente para purificar la TRH sintetizada de novo. Los resultados

REGION	fMol unidos x g tej. húmedo ⁻¹
Hipófisis anterior	639.59
Hipófisis posterior	108.25
Eminencia media	40.30
Glándula pineal	33.8
Núcleo accumbens	313.61
Punto medio del núcleo caudado	141.29
Región dorsolateral de septum	138.46
Tubérculo olfatorio	89.18
Polo frontal de la corteza cerebral	29.18
Núcleo caudado lateral	24.19
Hipocampo	46.14
Amígdala	55.16
Tálamo medio	15.13
Hipotálamo	20.10

CUADRO 4 DISTRIBUCION REGIONAL DE SITIOS DE UNION A

TRH EN ENCEFALO Y ADENOHIPOFISIS DE OVEJA.

(tomado de 10)

Continuación Cuadro 4

Piso del cuarto ventrículo	31.8
Cerebelo	21.9
Bulbo raquídeo	45.4
Cuerpo mamilar	20.10
Colículo superior	18.43
Colículo inferior	48.41
Núcleo oculomotor	4.4
Substancia negra	10.5

de estos investigadores demostraron la necesidad de utilizar técnicas de separación y purificación más rigurosas.

Mc Kelvy y col demostraron que por medio de una purificación secuencial se podía eliminar entre el 99.7 y el 99.98% de la radiactividad asociada y obtener de esa forma una pureza radioquímica adecuada de la TRH marcada. Además era necesario formar derivados del tipo dinitrofenil-TRH y hacer cromatografías con los derivados para corroborar la identidad del péptido.

Con el uso de estas técnicas se llegó a la conclusión de que tanto la síntesis de TRH como la de la LHRH son susceptibles a los inhibidores de la síntesis ribosomal de proteínas(34). Ello podría implicar la formación de un precursor, cuya naturaleza no ha sido aún identificada.

Como en el caso de otros péptidos y a diferencia de algunos neurotransmisores, es probable que la TRH sea sintetizada en el soma neuronal.

f- Liberación de TRH

La TRH es liberada cuando se despolariza el tejido nervioso tanto química como eléctricamente. La liberación es dependiente de calcio y en este sentido sigue el mismo patrón que el de otros péptidos neuroactivos y transmisores aminérgicos(35).

La liberación de la TRH por las neuronas del hipotálamo

medio basal es controlada por circuitos noradrenérgicos e histaminérgicos (estimulantes) así como por fibras serotoninérgicas y dopaminérgicas (inhibitorias) (48).

g- Inactivación de la TRH

Redding y Schally (47) fueron los primeros en estudiar la inactivación de la TRH en el plasma. Otros órganos como hígado, riñón y corteza cerebral también muestran actividad enzimática que inhibe a la hormona.

En el cerebro de la rata, la actividad enzimática que degrada a la TRH presente en las fracciones que resultan del fraccionamiento subcelular, indican que las enzimas responsables de la inactivación de la hormona están tanto en la fracción soluble como en la particulada (56).

En estudios con TRH incubado en plasma y suero se demostró la existencia de una desamidasa (47). Debido a que no hay alteración en la parte piroglutamil ni en el residuo histidil, se propuso que el TRH-OH es el principal producto de degradación. Sin embargo otros autores (56) no fueron capaces de reproducir los resultados de los primeros, encontraron que el principal producto de la degradación es la prolina. Por ello propusieron que la remoción del grupo amido es seguida por una ruptura del enlace peptídico entre la histidina y la prolina (figura 3).

Estudios realizados en homogenados de tejido hipotalámico

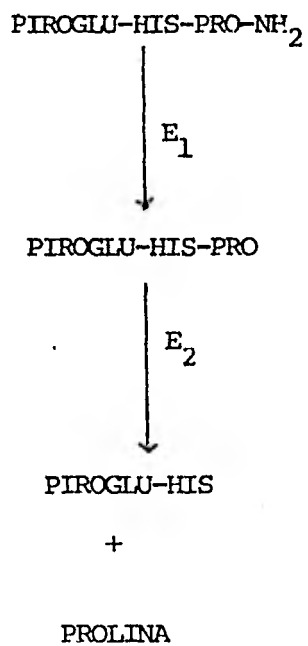


FIGURA 3 DEGRADACION ENZIMATICA DE LA TRH EN EL PLASMA Y SUERO (47). E₁, ENZIMA DESAMIDANTE DE LA TRH; E₂, PROLINA DIPEPTIDASA.

y de corteza cerebral, se demostró la existencia de actividad enzimática que degrada a la TRH de la misma manera que sucede en el plasma y el suero.

Los resultados obtenidos al incubar las enzimas (cerebral y sérica) en presencia de inhibidores muestran diferencia en el grado de inhibición, por lo que se piensa que la deamidasa cerebral es diferente de la deamidasa sérica. Un hecho que apoya la diferencia entre las enzimas es que la bacitracina es capaz de inhibir la degradación de la TRH producida por el homogenado de cerebro pero no en el suero (10).

En la figura 4 se muestra la ruta de degradación de la TRH en adenohipófisis propuesta por Bauer (4).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los efectos antes mencionados sobre el sistema nervioso central (SNC), así como la presencia de la TRH en las terminaciones nerviosas y de receptores específicos para ésta, así como la manera como se libera, parecen ser pruebas sólidas de su función como neuromodulador. Si éste fuera el caso, la TRH sería liberada en una sinápsis por la terminación nerviosa y actuaría en los

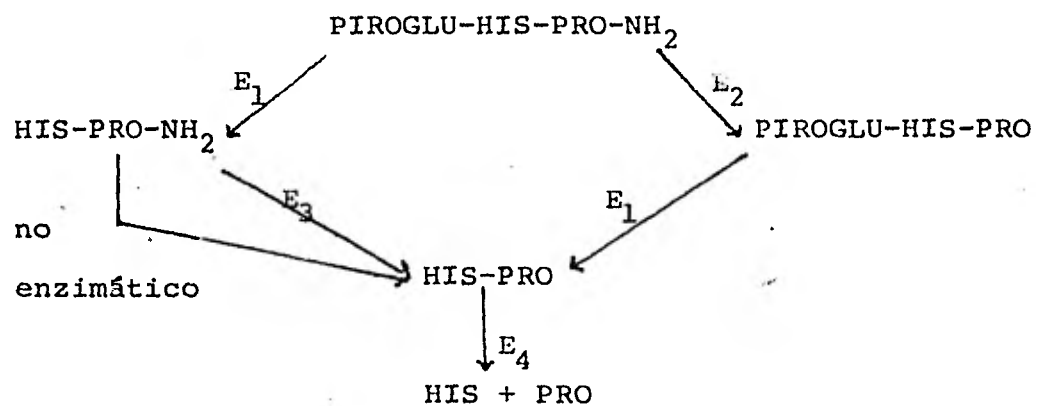


FIGURA 4 DEGRADACION ENZIMATICA DE LA TRH POR EL TEJIDO ADENOHIPOFISIARIO PROPUESTO POR BAUER(3). E₁,PIROGLUTAMATO AMINOPEPTIDASA; E₂, ENZIMA DEAMIDANTE DE LA TRH; E₃, POST-PROLINA DIPEPTIDIL AMINOPEPTIDASA; E₄, PROLINA DIPEPTIDASA.

receptores de la membrana postsináptica como lo muestra la figura 5.

Necesariamente a esto debe seguir una rápida inactivación que anule la acción del péptido. La inactivación podría ser por tres mecanismos:

- a) Degradación por una enzima presente en el espacio extracelular o en la membrana pre o postsináptica, con la subsecuente eliminación de los metabolitos formados.
- b) Un mecanismo de recaptura (como se ha observado para los neurotransmisores clásicos).
- c) Alguna transformación química.

Los siguientes son los criterios que se han establecido para definir a una sustancia como neurotransmisor:

- a) Presencia de una ruta biosintética
- b) Presencia presináptica del neurotransmisor
- c) Presencia presináptica de un mecanismo de almacenamiento del transmisor.
- d) Presencia de un mecanismo específico para la liberación

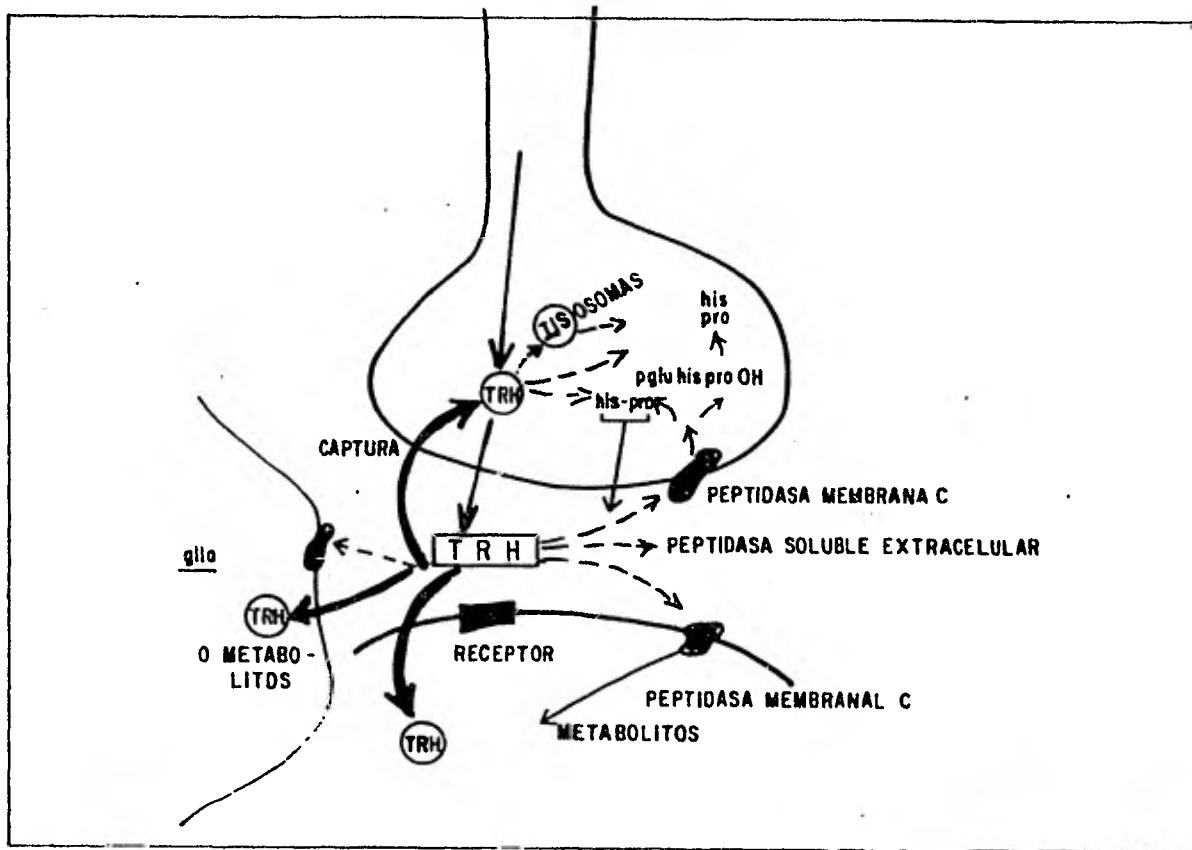


FIGURA 5 POSIBLE DESTINO METABOLICO DE LA TRH EN EL ESPACIO SINAPTICO.

del transmisor.

- e) Presencia del receptor postsináptico específico
- f) Presencia de mecanismo específicos para terminar la acción del transmisor.

Para los neurotransmisores clásicos como la acetilcolina y noradrenalina se han demostrado mecanismos de inactivación específicos después que han sido secretados al espacio sináptico.

La acetilcolina es degradada por la acetilcolinesterasa a ión acetato y colina, ésta última es recaptada hacia el interior de la terminación nerviosa donde se utiliza para sintetizar acetilcolina nueva.

La noradrenalina desaparece del espacio sináptico mediante tres mecanismos:

- a) Es recaptada por la terminación nerviosa (donde es degradada) mediante un mecanismo de transporte activo.
- b) Difunde alejándose de la terminación nerviosa hacia los líquidos corporales vecinos y de allí a la sangre donde es inactivada.
- c) Es degradada por alguna de las enzimas:
 - monoaminooxidasa
 - transferasa de catecol O-metilo

En membranas de sinaptosomas se encontró una enzima capaz de degradar a la TRH. Sin embargo ésta no ha sido caracterizada por lo que se desconoce cuál es el mecanismo de inactivación de la TRH una vez que ha sido liberada en el espacio sináptico.

La existencia de mecanismos de captación en tejido nervioso para péptidos biológicamente activos se ha sugerido por la evidencia presentada para el péptido carnosina(2). Sin embargo, para el caso de las encéfalinas y substancia P no se ha logrado encontrar un fenómeno de esta naturaleza(39,56).

En experimentos preliminares se observó que la TRH yodada parece ser captada por sinaptosomas. Sin embargo no se identificó el producto captado(P.Joseph B.,J.L.Charli observaciones no publicadas).

Recientemente, Parker y col(42) encontraron que los sinaptosomas no son capaces de captar TRH(^3H -PRO).

También se ha demostrado la existencia de un sistema de captura de TRH en rebanadas de cerebelo. Los resultados obtenidos en presencia de inhibidores metabólicos e inhibidores del transporte de sodio sugieren que se trata de un sistema de transporte activo (41).

Hay una evidencia de que la TRH penetra a las células aisladas de tejido hipofisario, donde probablemente modula la expresión de los genes para tirotropina y prolactina(30).

OBJETIVOS

El objetivo central de esta tesis es conocer cuál es el destino metabólico de la TRH una vez que ha sido liberada al espacio extracelular; específicamente si su captura puede ser el mecanismo responsable de la inactivación del péptido. Los objetivos son:

- a) Determinar si existe un mecanismo de captación de TRH en rebanadas de hipotálamo medio basal de rata.
- b) Mejorar el método de purificación y análisis de la TRH captada o sus metabolitos.
- c) Determinar el mecanismo de entrada de la TRH a las células nerviosas.
- d) Comparar el patrón de captura de la TRH con los de prolina y ácido gama-aminobutírico (GABA).
- e) Estudiar los requerimientos energéticos del fenómeno de captura de la TRH (si lo hay).

Decidimos trabajar con hipotálamo porque se ha comunicado en la literatura que existen varios núcleos con reacción positiva a TRH revelado por inmunohistoquímica (9). Además existen varias

pruebas de que en ésta región la TRH desempeña diversas funciones relacionadas con su función como hormona y vinculadas con su posible acción como neurotransmisor.

Entre las preparaciones fisiológicas in vitro más comunes (sinaptosomas, rebanadas, tejido íntegro) se eligió el sistema de rebanadas porque en este tipo de preparación se conservan todas las células que pueden estar involucradas en este fenómeno.

HIPOTESIS

Los efectos de la TRH en el SNC así como su distribución apoyan la proposición de que éste péptido actúa como neuromodulador en el SNC. Si tal es su función, debe existir algún mecanismo de inactivación una vez que la hormona ha interactuado con su receptor. El mecanismo más activo en éste fenómeno sería la captura de la TRH alrededor del sitio de acción.

MATERIAL Y METODOS

a- Material

-Equipo

Contador de centelleo líquido Tri-Carb Packard

Rebanador de tejido Mc Ilwain graduable

Incubador con agitación constante Precision

Microcentrífuga Beckman

Espectrofotómetro Spectronic 20 Bausch & Lomb

Aparato de oscilaciones sónicas Bronson Sonic Power "Sonifer B12"

Centrífuga Dupont Instruments Sorvall RC-5 Super Speed refrigerada

Vortex Super Mixer Lab Line Instruments

Balanza analítica Mettler H54 AR

Bomba de vacío Feli Welch

Cámara para cromatografía en capa fina Instrumentos Científicos

Rotador clínico Eberbach

Balanza granataria Ohaus 2 Kg

Rotoevaporador con vacío Savant

Parrilla de agitación Corning PC-353

Potenciómetro Beckman Selection 2000

Cilindro de O₂ / CO₂ con regulador de flujo

Refrigerador Iem de Luxe 4°C

Congelador Iem de Luxe -20°C

Micropipetas Gilson variables p-20 p-200 p-1000

-Reactivos

TRH- (³ H-pro)	New England Nuclear
Prolina ¹⁴ C	"
Inulina ¹⁴ C	"
Gaba ¹⁴ C	"
Sephadex G-25 fine	Pharmacia
Sephadex SPC-25	Sigma
Albúmina fracción V	"
Cloruro de colina	"
PPO	New England Nuclear
POPOP	"
Dinitrofenol	Sigma
Triton X 100	"
Ouabaína	"
Tolueno	Baker
p-Dioxano	"
Etilenglicol	"
Metanol	"
Hidróxido de amonio	"
Cloroformo	"
Naftaleno	"
Acido sulfanílico	Merck
Isatina	Sigma
Omnifluor	New England Nuclear
Reactivo de Folin	Sigma
Tartrato de sodio y potasio	Baker
Sulfato cúprico pentahidratado	Merck
Eter dietílico	Baker
Bicarbonato de sodio	"

Hidróxido de sodio	Baker
Inulina	Sigma
Carbonato de sodio	"
Glucosa	"
Bacitracina	"
Acido aminoxiacético	"
Tris-HCl	"
Acido clorhídrico	Baker
Bicarbonato de potasio	"
Acido cítrico monohidratado	"
Fosfato de sodio monoácido	"
Acetona	"
Nitrito de sodio	"
Cloruro de sodio	"
Cloruro de potasio	"
Fosfato de potasio monobásico	"
Cloruro de calcio dihidratado	"
NCS solubilizante de tejido	Amersham
n-Butanol	Mallinckrodt Chemical Works

b- Métodos

-Repurificación de TRH(³H-PRO) comercial / métodos de análisis de pureza de TRH, Prolina y Gaba.

Ya que las impurezas radiactivas pueden interferir en la evaluación de los parámetros cinéticos, es necesario purificar los productos radiactivos comerciales. El cuadro 5 resume la metodología de purificación de TRH(³H-pro) según Mc Kelvy(3) y Bauer(33).

-El análisis de prolina por el sistema II revela un solo pico de radiactividad, por lo que no se purificó.

-El análisis del Gaba ¹⁴C por el sistema n-butanol 7: acetona 3 revela un solo pico de radiactividad por lo que no se purificó.

-Experimentos de captura de TRH y prolina

Se utilizó un sistema de incubación in vitro. La metodología de muestra en el cuadro 6.

-Captura de TRH en presencia de dinitrofenol (DNP), ouabaina y un medio de incubación sin glucosa.

Se utilizó la metodología indicada en el cuadro 6 .

- * Sobre una columna de Sephadex SPC-25 equilibrada con agua destilada se colocó una muestra de 100 uCi de TRH(³H-pro). Se eluyó primero con 10 porciones de agua destilada y después con 4 porciones de NH₄OH 2M (aquí se eluye la TRH)
- * Se evaporaron las fracciones de NH₄OH en rotoevaporador
- * Se resuspendió en agua y se aplicó sobre una placa de gel de sílice HPKF de alta resolución. Se desarrolló el cromatograma con una mezcla de: acetona : agua 8:2 . Se corrió en paralelo un patrón de TRH sin marca
- * Se eluyó con metanol al 90% la zona correspondiente a la TRH. Se evaporó el metanol
- * Se resuspendió en agua destilada para verificar la pureza por cromatografía en capa fina se eluyó con una mezcla de metanol: cloroformo: hidróxido de amonio 3:5:1 (sistema II). También se verificó la pureza de la TRH por electroforesis (550 V , amortiguador de citrato pH 2.9 durante 5 hrs.)

CUADRO 5 METODOLOGIA DE PURIFICACION Y ANALISIS DE LA TRH

- * Ratas macho de 120-150 días de edad cepa Wistar mantenidas en ciclos luz oscuridad regulares y con libre acceso a alimento y a agua se sacrifican por decapitación (todos los experimentos fueron realizados entre las 10-14 hrs). Se disecó el tejido a estudiar (hipotálamo sin incluir el quiasma óptico, adenohipófisis).
- * Se rebanó el tejido en porciones de 225 μ m
- * Se preincubó el tejido (un hipotálamo por vial de incubación) en 1.9 ml de Ringer Krebs bicarbonato (preparado como se indica en el anexo 1).
- * Se equilibró el vial de incubación con O_2/CO_2 95/5% y se incubó durante 5 min (para la mayoría de los experimentos) a 37°C con agitación constante (100 rpm)
- * Se adicionó una solución (100 μ l) del producto radiactivo a estudiar (TRH, prolina o Gaba) y producto sin marca.
- * Se saturó nuevamente el vial con O_2/CO_2 95/5% y se incubó durante el tiempo indicado en resultados en las condiciones antes mencionadas.
- * Al finalizar el tiempo de incubación se separó el tejido del medio de incubación por filtración con vacío sobre filtros de papel (whatman 540) y se congeló inmediatamente el tejido sobre hielo seco.
- * Al medio de incubación recuperado se le adicionó la cantidad necesaria de HCl hasta tener una concentración 0.1M

CUADRO 6 METODOLOGIA PARA LOS EXPERIMENTOS DE CAPTURA DE TRH, PROLINA Y GABA.

Se adicionó cada lote de medio fisiológico:

- a) Dinitrofenol concentración final 1 mM
- b) Ouabaina concentración final 250 uM
- c) Se sustituyó la glucosa por NaCl

En cada caso se adicionó bacitracina a una concentración de 2×10^{-5} M final.

-Análisis de los productos captados y del medio de incubación de los experimentos de captura de TRH y prolina.

Ya que el método utilizado para separar a la TRH de los metabolitos formados durante la incubación es cromatográfico, es necesario limpiar las muestras de contaminantes protéicos y lípidos que pueden alterar la migración de la TRH en la muestra. El cuadro 7 resume el procedimiento de extracción y análisis.

A partir de los resultados obtenidos utilizando la metodología indicada en el cuadro 7, es posible deducir el porcentaje de radiactividad que corresponde a la TRH asociada al tejido.

En algunos experimentos se eluyó la zona de cromatografía correspondiente a la TRH con metanol al 90% y

- * Se homogeneizó el tejido en 500 ul de ácido acético acuoso al 20%
- * Se separó una alícuota de 50 ul para determinación de proteína por el método de Lowry (31)
- * Se adicionó una mezcla de TRH y metabolitos sin marca (hisprodicetopiperacina, TRH-OH, gluhispro, prolina, prolina-10 ug de cada uno)
- * Se centrifugó el homogeneizado restante (15000rpm) durante 15 min
- * Se extrajo el sobrenadante con 3 porciones de éter etílico saturado con agua. Se evaporó a sequedad en rotoevaporador
- * Se resuspendió en 700 ul de metanol al 90% y se dejó toda la noche a -20°C o 2 hrs a -70°C
- * La suspensión se centrifugó (15000 rpm durante 15 min) se separó el sobrenadante y se evaporó a sequedad
- * El residuo se resuspendió en agua destilada y se aplicó una alícuota sobre placas de gel de sílice GF₆₀. Se eluyó con el sistema II. Se corrió en paralelo un patrón de TRH y metabolitos sin marca como referencia de migración
- * Cada centímetro de gel de sílice se eluyó con 1 ml de metanol al 90%. Se adicionaron 10 ml de mezcla de cettellec (ver anexo 1) y se determinó la radiactividad
- * Se revelaron los patrones sin marca con reactivo de Pauly o isatina según el caso para asociar la radiactividad en cada centímetro con la distancia migrada por los patrones.

CUADRO 7 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION Y ANALISIS DE LA RADIATIVIDAD ASOCIADA AL TEJIDO Y EN EL MEDIO DE INCUBACION EN LOS EXPERIMENTOS DE CAPTURA DE TRH, PROLINA.

se aplicó sobre una placa de cromatografía GF₆₀ y se eluyó con el sistema I.

-Medición del espacio extracelular

Considerando que en el espacio intercelular se encuentra radiactividad que no esta dentro de la célula ni unida a la membrana citoplasmática, es necesario saber que cantidad de radiactividad invade el volumen extracelular. Para ello se evaluó el volumen extracelular o volumen de inulina.

Se estimó el valor del volumen extracelular por el valor del espacio de inulina según Cohen y col(13).

La inulina es un polisacárido de alto peso molecular que no es capaz de penetrar en la célula, por lo que sólo invade el espacio extracelular. Generalmente se utiliza inulina ¹⁴C que posee una pureza radioquímica insuficiente para los experimentos biológicos (los contaminantes radiactivos de bajo peso molecular pueden alterar la estimación del espacio extracelular) por lo que es necesario purificarla. El cuadro 8 muestra la secuencia de purificación que se hace siguiendo el método de Cohen(12).

La metodología para la medición del espacio extracelular se muestra en el cuadro 9.

- * Sobre una columna se Sephadex G-25 fina (0.9 x 26 cm) equilibrada con NaCl 20mM se colocó una muestra de 100 ul de Inulina ^{14}C 0.25 mCi / 100 mg
- * Se eluyó con NaCl 20 mM colectando fracciones de 200 ul con un flujo de 500 ul por minuto
- * Del volumen cercano al volumen de exclusión (determinado con azul de dextran) se tomaron alícuotas de 5 ul y se adicionó ácido perclórico hasta alcanzar una concentración final del 7%. Esta solución se hidrolizó a 85-90°C durante 30 min
- * Se adicionó mezcla de centelleo y se determinó la radiactividad
- * De las fracciones que contienen el mayor porcentaje de radiactividad se reunieron y fueron utilizadas en los experimentos descritos

CUADRO 8 METODOLOGIA PARA LA PURIFICACION DE

INULINA ^{14}C .

Se utilizó la misma metodología descrita en el cuadro 6 con las siguientes modificaciones.

- * Después de la preincubación se adicionó una solución de inulina radiactiva purificada (2×10^6 cpm) e inulina sin marca.
- * Se equilibró el vial de incubación con O_2/CO_2 95/5% y se incubó durante 0,2,5,15,30,60 y 90 min
- * Al finalizar el período de incubación se separó el tejido del medio de incubación por filtración con vacío sobre filtros de papel (whatman 540), se congeló el tejido inmediatamente sobre hielo seco. El medio de incubación no se recuperó

CUADRO 9 MEDICION DEL ESPACIO EXTRACELULAR

- La metodología de análisis de la radiactividad en el tejido se muestra en el cuadro 10
- Captura de ácido gama aminobutírico (Gaba)

Este experimento fué realizado para demostrar que el sistema de incubación in vitro utilizado es funcional. Para ello se utilizó la captura de Gaba, hecho que se sabe es inhibido por dinitrofenol y ouabaina (11).

Al modelo de estudio para la captura de TRH se le hicieron las siguientes modificaciones:

- a) Se le adicionó al medio de incubación Gaba ^{14}C en lugar de TRH (^3H -pro)
- b) Se le adicionó ácido aminoxiacético 10^{-4}M como inhibidor de la degradación del Gaba
- c) Se incubó durante 10 min

En un experimento paralelo se incubó el tejido en Ringer Krebs bicarbonato sustituyendo el NaCl por Tris-HCl en las mismas condiciones de incubación. Esto permite deducir la radiactividad que sólo está unida a la membrana citoplasmática de la radiactividad que ha penetrado a la célula, ya que el sistema de transporte de Gaba depende del transporte de sodio (11).

- Análisis de la radiactividad de Gaba en el tejido

El cuadro 11 muestra la metodología de análisis de Gaba en el tejido.

- * Se sonicó el tejido en 500 ul de ácido acético acuoso al 20% dando pulsos de 4 seg hasta homogeneizar
- * Se tomó una alícuota de 50 ul para determinación de proteína por el método de Lowry (31)
- * Una muestra de 200 ul de homogeneizado se colocó en un vial de centelleo líquido y se adicionaron 500 ul de NCS (solubilizador de tejido)
- * Se adicionó mezcla de centelleo líquido y se determinó la radiactividad

CUADRO 11 ANALISIS DE LA RADIATIVIDAD DE GABA EN EL
TEJIDO.

- * Se sonicó el tejido en ácido perclórico en solución acuosa al 7% dando pulsos de 4 seg hasta homogeneizar
- * Se separó una alícuota de 50 ul para determinación de proteína por el método de Lowry(31)
- * Se centrifugó el homogeneizado restante(15000 rpm durante 15 min). Se separó el sobrenadante y se colocó en viales de centelleo líquido.
- * La solución se hidrolizó a 85-90°C durante 30 min, se adicionó mezcla de centelleo y se determinó la radiactividad

CUADRO 10 ANALISIS DE LA RADIOACTIVIDAD DE
INULINA EN EL TEJIDO.

- Efecto del dinitrofenol, ouabaína y un medio de incubación sin glucosa en la captura de Gaba

En este caso el medio de incubación se preparó como se describe en el anexo 1, adicionando en cada caso:

- a) Dinitrofenol 1 mM
- b) Ouabaína 250 uM
- c) Sustituyendo la glucosa por NaCl

La concentración del Gaba se fijó a 1 uM

En todos los casos anteriores incluyendo al medio de incubación control se les adicionó ácido aminoxiacético 10^{-4} M

- Determinación de proteína por el método de Lowry (31) modificado (J.L. Charli comunicación personal).

La metodología para la determinación de proteína se indica en el cuadro 12.

ANALISIS DE LOS DATOS

- Captura de TRH, prolina y Gaba

Una vez obtenida la radiactividad que migró con TRH, prolina o Gaba se corrigieron por el rendimiento de la extracción (CPM finales / CPM iniciales) y se dividieron

- * A 20 ul de homogeneizado se les adicionó 20 ul de NaOH 2 M. La suspensión se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche
- * Se completó a 100 ul con NaOH 1M y se adicionaron 900 ul de solución 4 ,se agitó perfectamente bien y se dejó a temperatura ambiente durante 10 min
- * Se adicionaron 100 ul de reactivo de Folin 1N, se mezcló bien y se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min
- * Las lecturas espectrofotométricas se hicieron a 660 nm

En forma paralela se hizo una curva estándar de albúmina conteniendo diferentes cantidades de proteína. Se procesó de la misma forma que para la cuantificación de proteína en el homogeneizado sin incluir la hidrólisis.

Solución 1	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.5%
Solución 2	$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$	1.0%
Solución 3	$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.0%
Solución 4	solución 1 + solución 2 1:1 a 50 ml con solución 3	

CUADRO 12 CUANTIFICACION DE PROTEINA POR EL METODO DE LOWRY (31).

por mg de proteína. De la radiactividad asociada al tejido se restaron las que son extracelulares (sólo en el caso de TRH y prolina) quedando solamente la radiactividad que esta dentro de la célula o unida a la membrana.

A partir del conocimiento de la concentración en el medio de incubación se determinó la masa de TRH, prolina o Gaba que es intracelular (o unido a la membrana) en unidades de: masa de TRH, prolina o Gaba / mg de proteína x tiempo de incubación⁻¹.

Variando la concentración de TRH, prolina o Gaba se puede determinar si hay un mecanismo de transporte saturable; las constantes cinéticas del transporte saturable se determinaron al graficar el inverso de la velocidad ($1/v$) contra el inverso de la concentración ($1/C$) según la transformación lineal de Lineweaver-Burk de la ecuación de Michaelis -Menten. Los mismos datos fueron derivados de la radiactividad total asociada al tejido dividida por mg de proteína.

Para el medio de incubación se obtuvieron los datos de radiactividad correspondientes a cada centímetro de gel de sílice para asociarlos a la distancia migrada en cromatografía por los patrones sin marca y se deter-

minó el porcentaje de cada pico radiactivo sobre el carril de cromatografía.

- Captura de TRH y Gaba en presencia de dinitrofenol, ouabaina y un medio de incubación sin glucosa.

Con los datos de radiactividad asociada al tejido por mg de proteína a concentración 10^{-6} M y 10^{-4} M de TRH (10^{-6} para Gaba) se comparó la radiactividad asociada al tejido de una manera saturable en presencia y ausencia de inhibidores aplicando la prueba t de Student para conocer si hay diferencia en el valor medio de las poblaciones con un nivel de significancia de 0.05.

- Cálculo del volumen extracelular

A partir de la curva de radiactividad asociada al tejido por mg de proteína contra el tiempo de incubación, se extrapola al eje de las "Y" el valor de radiactividad en el tejido cuando de ha alcanzado el equilibrio en la distribución de inulina entre el espacio extracelular y el medio de incubación. Con éste dato y el conocimiento de la radiactividad adicionada al medio de incubación se calculó el volumen de inulina en unidades de μ l por mg de proteína.

Así, en los experimentos de captura de TRH o proli-

ma se puede restar la radiactividad que se encuentra en el medio extracelular de la radiactividad total asociada al tejido.

RESULTADOS

- Optimización de la purificación de la TRH

Con la metodología antes mencionada y cambiando solamente detalles de temperatura de evaporación (puede someterse la solución que contiene a la TRH hasta 40°C sin degradación química) se obtuvieron los siguientes resultados:

La figura 6 muestra el resultado de la purificación de la TRH comercial por los métodos utilizados. La separación previa por cromatografía de intercambio iónico no mejora los resultados obtenidos con el uso de la cromatografía en capa fina de alta resolución como único método de purificación..

- Optimización de la metodología de análisis de la radiactividad asociada al tejido.

Durante el desarrollo del trabajo se probaron algunas modificaciones al proceso de extracción de la radiactividad asociada al tejido (cuadro 6) con los siguientes resultados:

Al cambiar el disolvente en la sonicación, de ácido acético a metanol, se trató de evitar un paso en la secuencia de extracción; sin embargo, se encontraron problemas para separar la fracción soluble de la particulada después de centrifugar, pues a mayor tiempo y velocidad de centrifugación, se

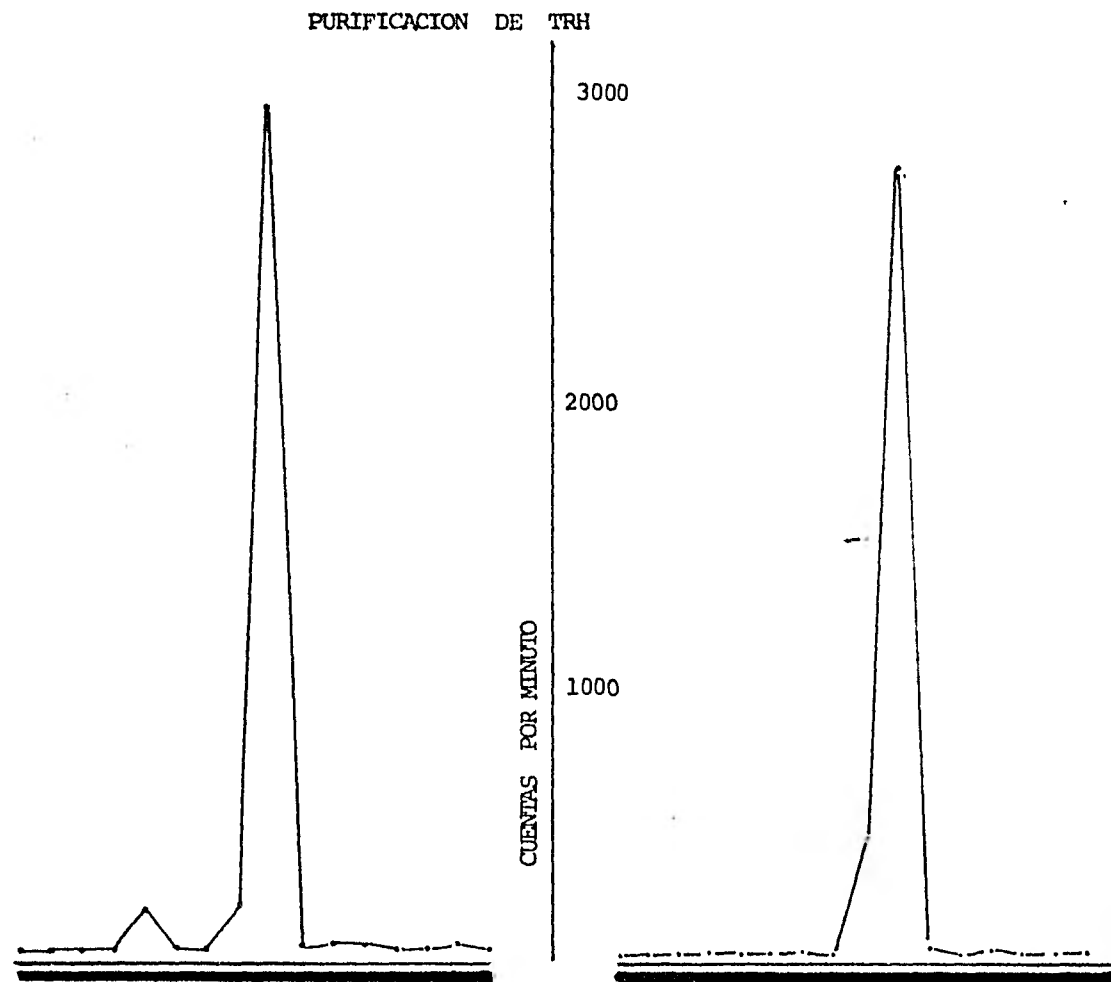


FIGURA 6 PURIFICACION DE TRH. IZQUIERDA: TRH DESPUES DE SER SOMETIDA A DOS TECNICAS DE SEPARACION (INTERCAMBIO IONICO Y CROMATOGRFIA EN CAPA FINA), DERECHA: TRH PURIFICADA POR CROMATOGRFIA EN CAPA FINA DE ALTA RESOLUCION.

formó un paquete flocculento que se desintegró fácilmente. Por lo tanto se eligió sonicar en ácido acético acuoso 20%.

Se comprobó que es necesario adicionar acarreadores para mejorar el rendimiento de la extracción y la correcta separación de la TRH radiactiva de sus metabolitos.

Se logró una buena separación de la TRH estándar de sus metabolitos utilizando el sistema II y por otra técnica de separación como es la electroforésis en papel. Los resultados se muestran en las figuras 7 y 8.

La presencia de contaminantes proteícos o lipídicos que pudieran permanecer después de la extracción metanólica y etérea no retardan la migración de la TRH(³H-pro) como se revela con reactivo de Pauly. Figura 9.

La metodología de extracción actual es eficiente, los rendimientos van del 50-70%. Ya que existe variación de una muestra a otra es necesario corregir los datos por el valor del rendimiento de las extracciones.

Durante el procesamiento de la muestra no hay degradación de la TRH(³H-pro) siempre que se manejen las muestras a 4°C tal como se muestra en la tabla 1

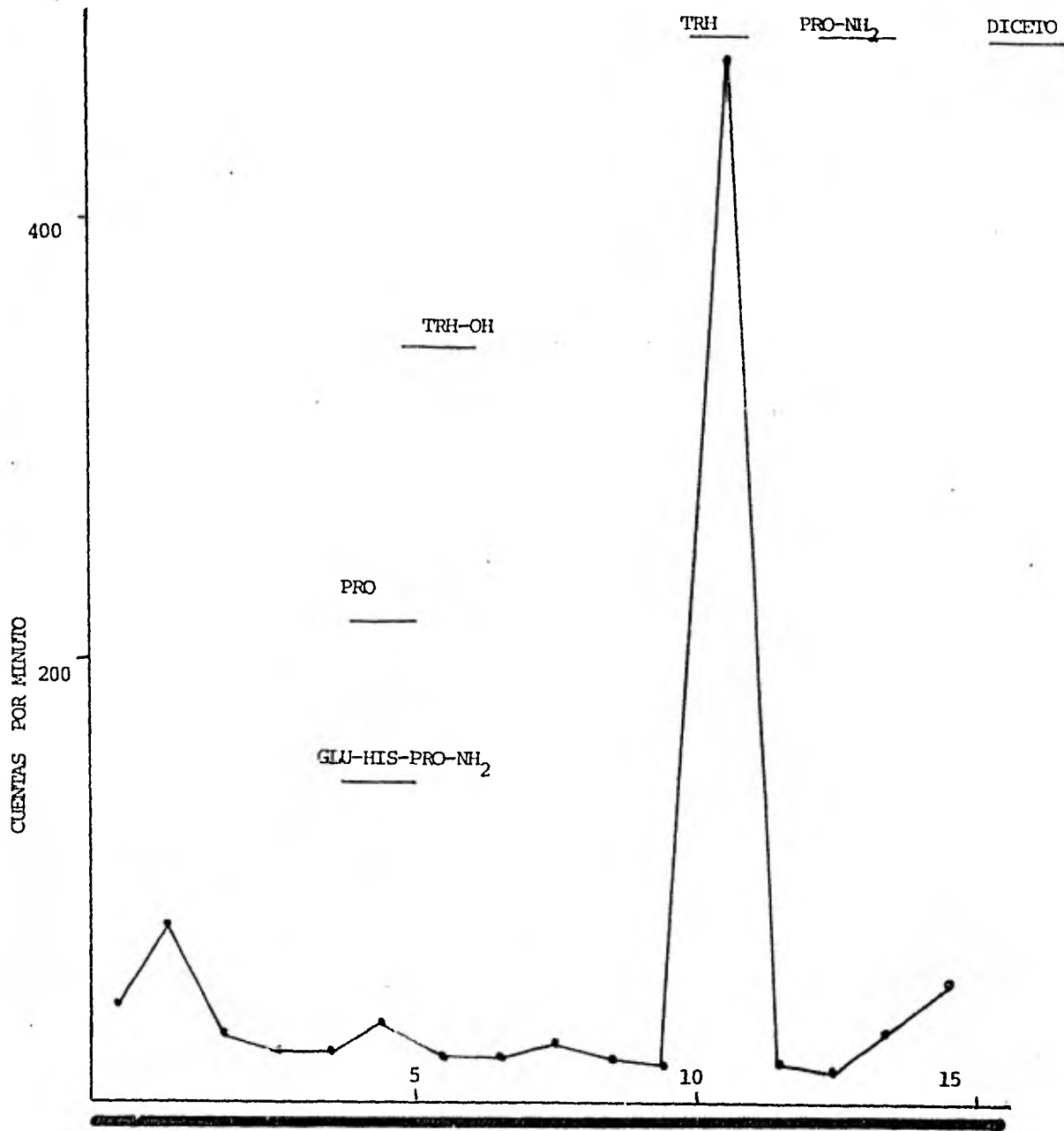
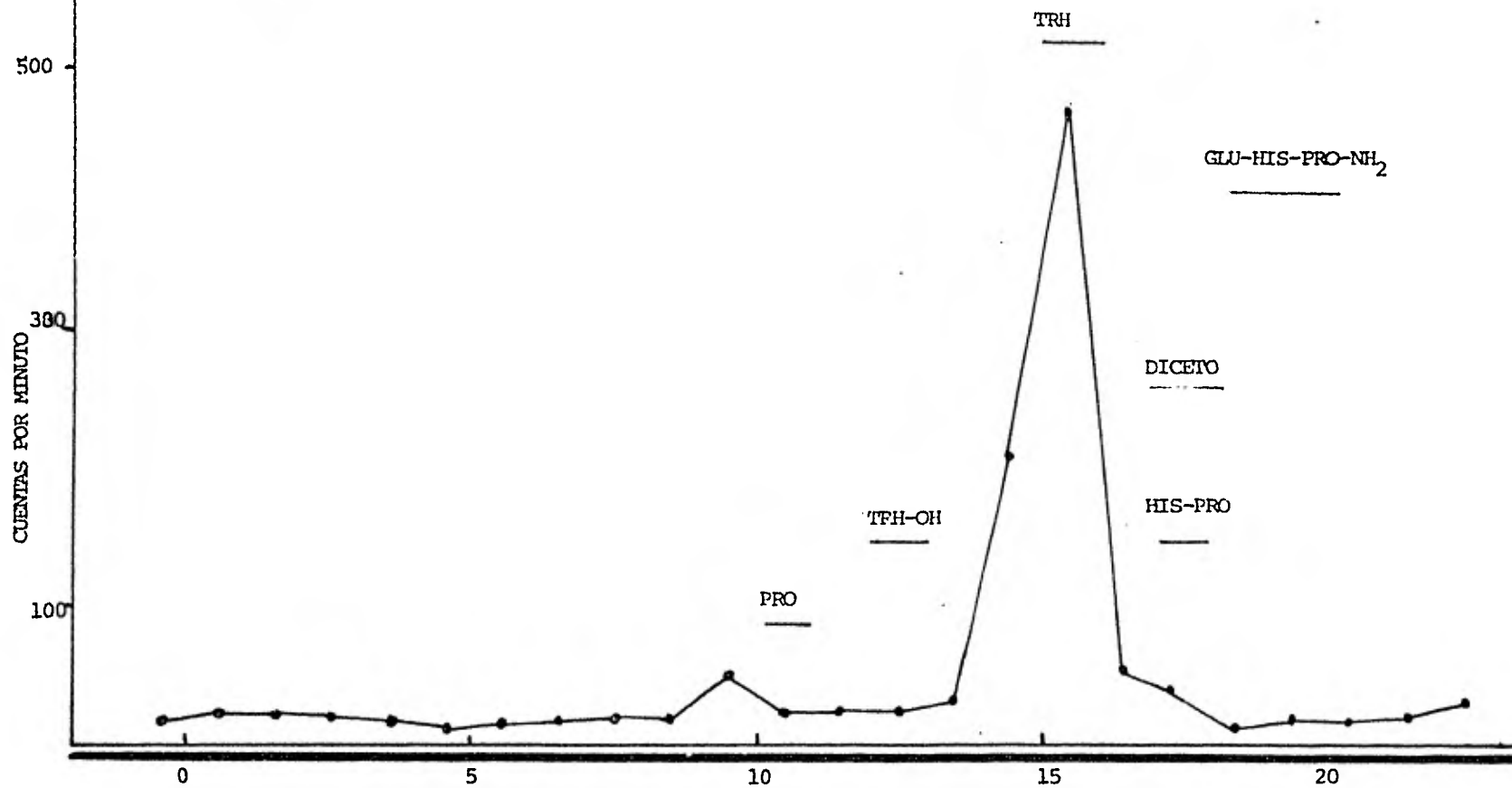


FIGURA 7 SEPARACION DEL TRH DE SUS METABOLITOS POR CROMATOGRAFIA
EN CAPA FINA .SISTEMA II

FIGURA 8 SEPARACION DE LA TRH DE SUS METABOLITOS POR ELECTROFORESIS EN PAPEL



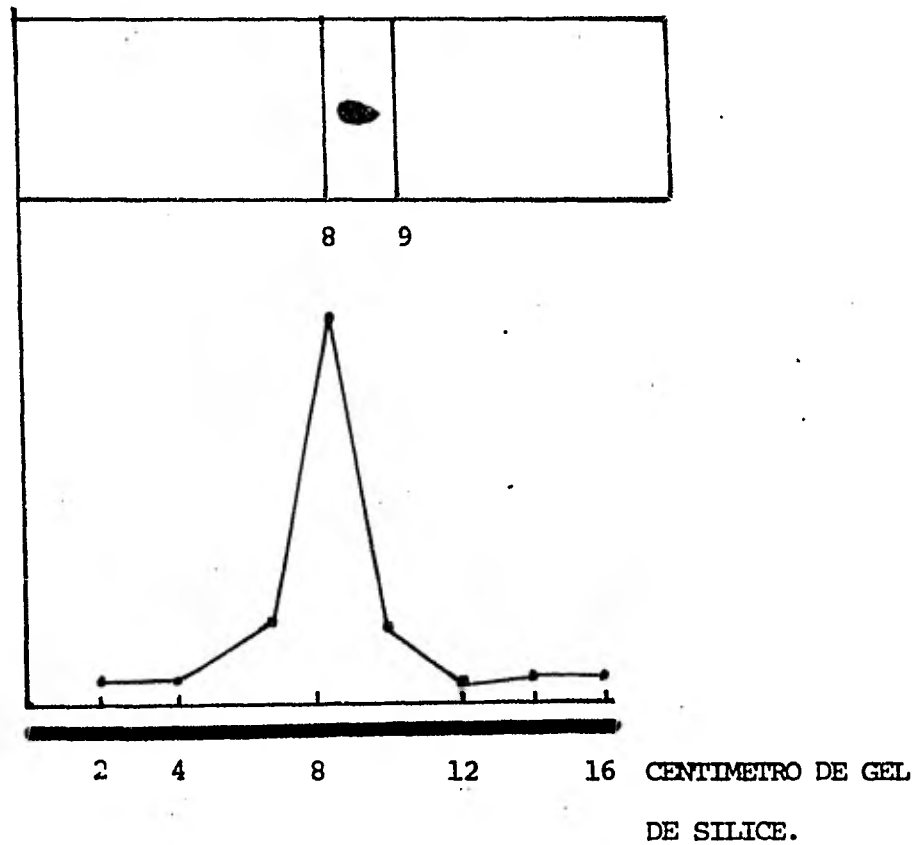


FIGURA 9 MIGRACION DE TRH ($^3\text{H-PRO}$) PURIFICADO DESPUES DE INCUBAR A 37°C DURANTE 5 MIN. MIGRACION DE TRH ESTANDAR.

- Resultados sobre la captura de la TRH en hipotálamo

a) Demostración de que TRH intacta se asocia al tejido

Se observó que no hay degradación en el medio de incubación (siempre que se adicione bacitracina) aún a tiempos de incubación tan largos como 90 min incubando a 4°C y a 37°C como se muestra en las figuras 10 y 11.

Cuando se incuba TRH (^3H -pro) durante 5 min con rebanadas de hipotálamo, purificando la radiactividad asociada al al tejido como se indica en el cuadro 6, se observó que la mayoría de la radiactividad migra con TRH estándar.

Para demostrar que la radiactividad que migra junto con la TRH es realmente TRH, se eluyó la zona de cromatografía correspondiente a la TRH con metanol al 90 % y se analizó por cromatografía en capa fina utilizando el sistema I; en este caso el 95% de la radiactividad migró con la TRH estándar.

b) Demostración de que la TRH encontrada en el tejido proviene de la TRH (^3H -pro) adicionada al medio de incubación.

Para eliminar la posibilidad de que la TRH radiactiva se metabolizara a prolina y ésta penetrara a la célula con subsiguiente incorporación a algún metabolito que migrara con la TRH, se incubó prolina ^{14}C en las mismas condiciones que para la TRH. Se encontraron los siguientes resultados:

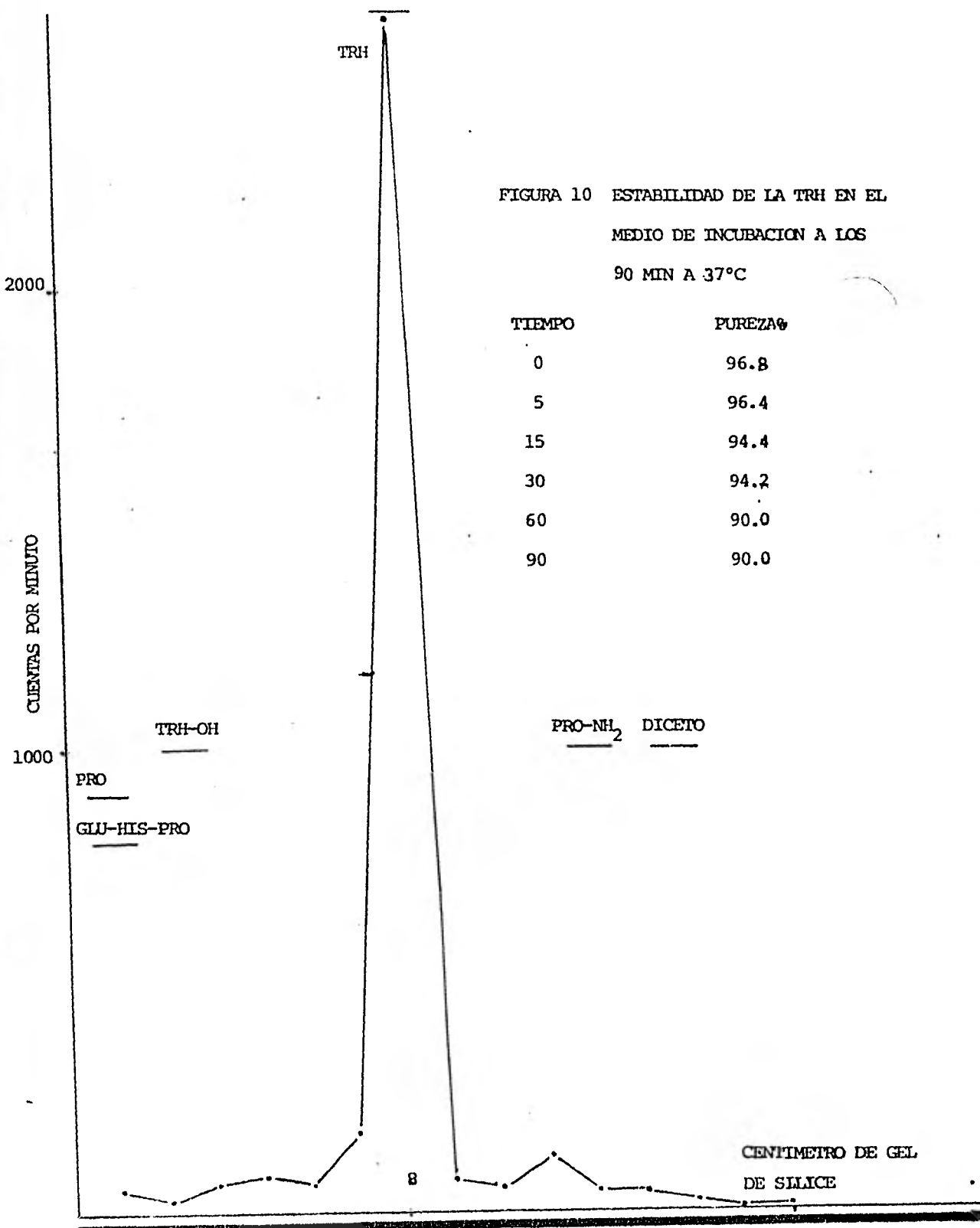
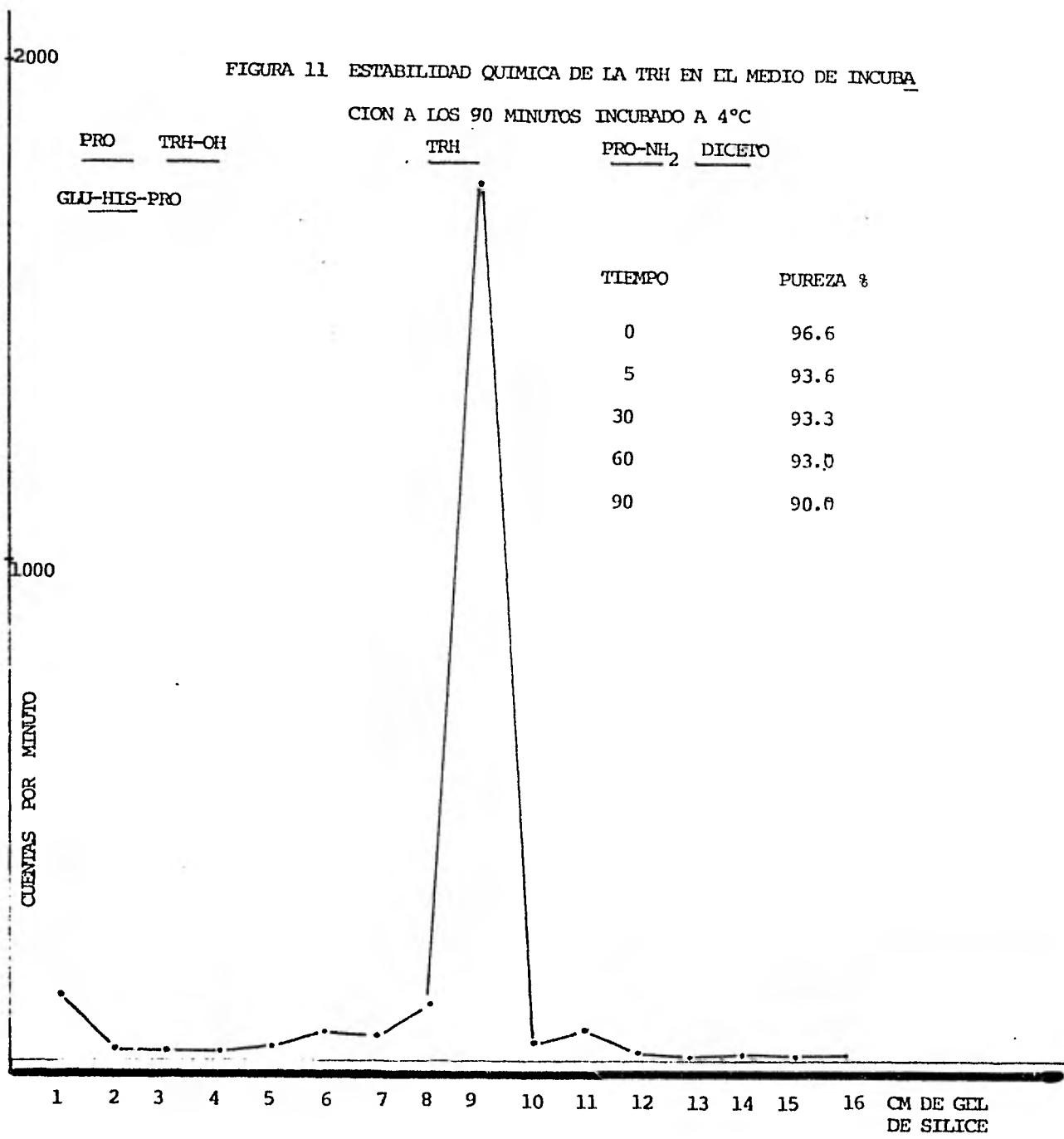


FIGURA 10 ESTABILIDAD DE LA TRH EN EL MEDIO DE INCUBACION A LOS 90 MIN A 37°C

TIEMPO	PUREZA%
0	96.8
5	96.4
15	94.4
30	94.2
60	90.0
90	90.0

FIGURA 11 ESTABILIDAD QUIMICA DE LA TRH EN EL MEDIO DE INCUBACION A LOS 90 MINUTOS INCUBADO A 4°C



Al incubar prolina ^{14}C en rebanadas de hipotálamo durante 5 min (1 μM), en la zona correspondiente a la TRH estándar revelado con reactivo de Pauly, se encontró solamente del 0.015 al 0.02% de la radiactividad total; esto descarta la posibilidad de que el mecanismo de obtención de la TRH antes mencionado sea acertado.

Al incubar TRH (^3H -pro) durante 5 min (1 μM) en rebanadas de hipotálamo existe poca degradación como lo muestra la figura 12.

c) Demostración de que una parte de la TRH (^3H -pro) asociada al tejido no está en el espacio extracelular.

Al incubar inulina ^{14}C en rebanadas de hipotálamo a intervalos de tiempo crecientes, la inulina invade el espacio extracelular y alcanza el estado estable después de los 30 min. A partir de los resultados obtenidos se calculó el valor del espacio extracelular cuyo valor es:

$$8.3 \pm 0.7 \mu\text{l} / \text{mg de proteína}$$

A partir de este valor se calculó la radiactividad del espacio extracelular, la que se restó a la total asociada al tejido. Este valor corresponde a la TRH que penetró a la célula o que está unida a receptores de la membrana. Esta porción que no es extracelular varía de un experimento

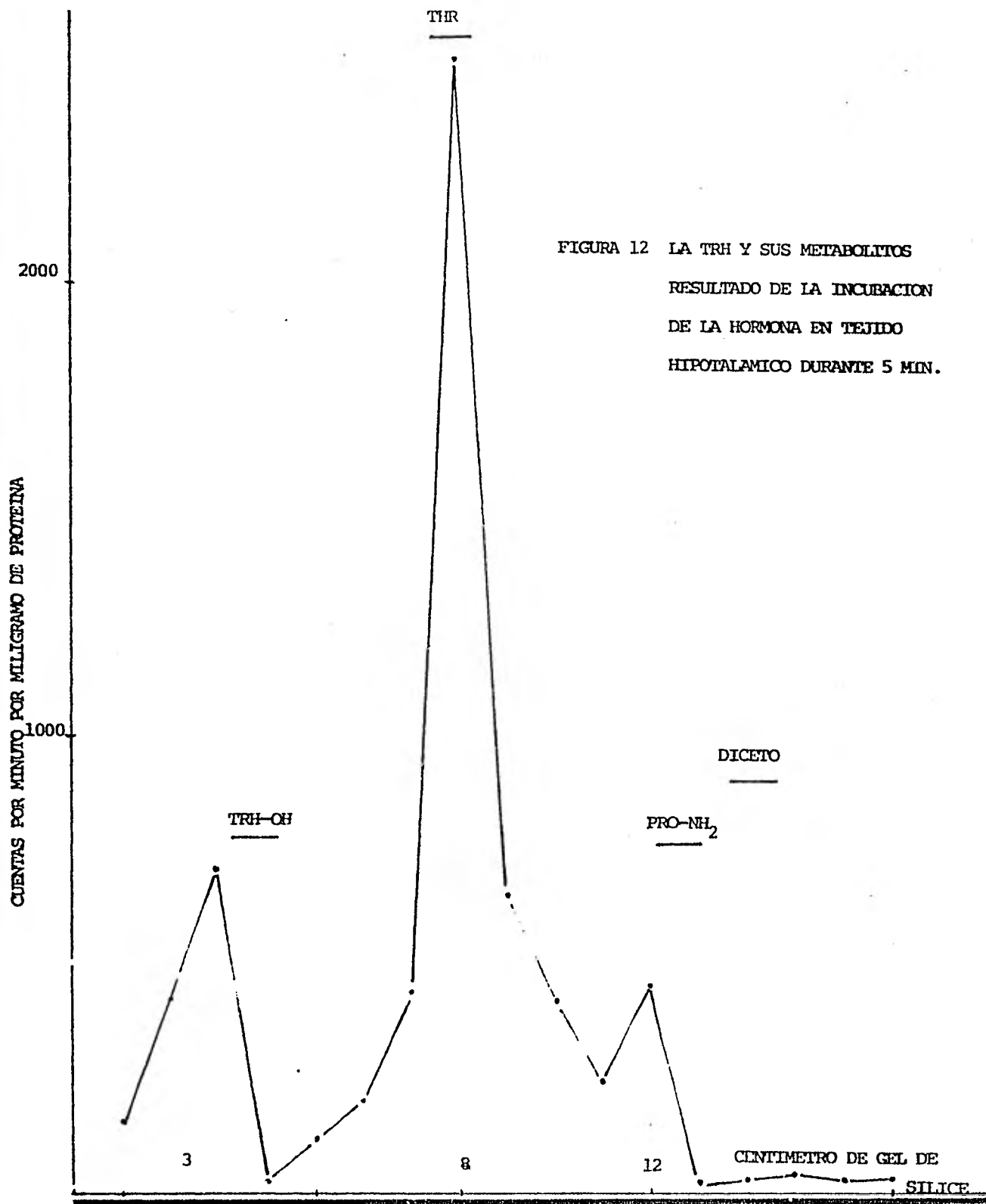
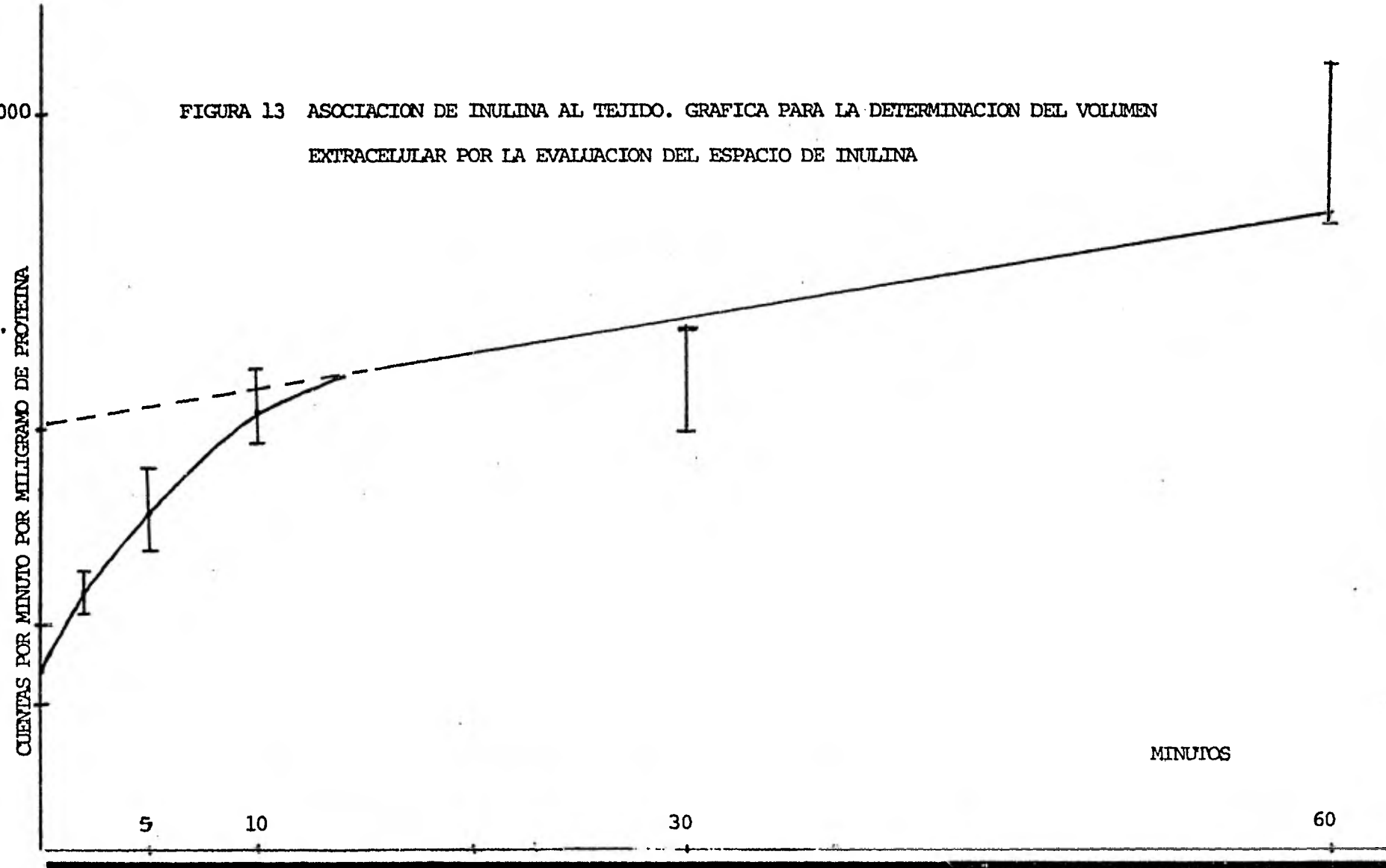


FIGURA 12 LA TRH Y SUS METABOLITOS
 RESULTADO DE LA INCUBACION
 DE LA HORMONA EN TEJIDO
 HIPOTALAMICO DURANTE 5 MIN.

7000

FIGURA 13 ASOCIACION DE INULINA AL TEJIDO. GRAFICA PARA LA DETERMINACION DEL VOLUMEN EXTRACELULAR POR LA EVALUACION DEL ESPACIO DE INULINA



CUENTAS POR MINUTO POR MILEGRAMO DE PROTEINA

MINUTOS

5

10

30

60

a otro y va del 20 al 40% de la radiactividad asociada al tejido en 5 min de incubación.

d) Curso en el tiempo de la asociación de la TRH al tejido.

Cuando se incubó TRH (^3H -pro) $1\ \mu\text{M}$ en periodos de tiempo crecientes, se observó un incremento en la radiactividad asociada al tejido dependiente del tiempo de incubación. El estado estable se alcanzó después de los 30 min Figura 14. Solamente se asocian al tejido el 0.9% de la radiactividad en el medio de incubación. El cociente tejido/medio es de aproximadamente 1.3

e) Velocidad de asociación-dependencia de la cantidad de tejido en incubación.

Al incubar TRH (^3H -pro) variando la cantidad de tejido (de 0.25 a 2 hipotálamos) se observó un incremento en la radiactividad asociada al tejido que es proporcional a la cantidad de tejido incubado, Figura 15. Esto indica que la cantidad de tejido utilizada en nuestros experimentos es adecuada para estimar la velocidad inicial del fenómeno de asociación.

f) Asociación de TRH al tejido- variación de la concentración.

Con el objetivo de visualizar la existencia de un fenómeno saturable, se incubó TRH (^3H -pro) en un amplio in -

FIGURA 14 CURSO EN EL TIEMPO DE LA ASOCIACION DE TRH 1 μ M
ASOCIADO AL TEJIDO HIPOTALAMICO INCUBADO A 37°C.

CUENTAS POR MINUTO POR MILIGRAMO DE PROTEINA

6000

2000

5

15

30

60

90 MINUTOS

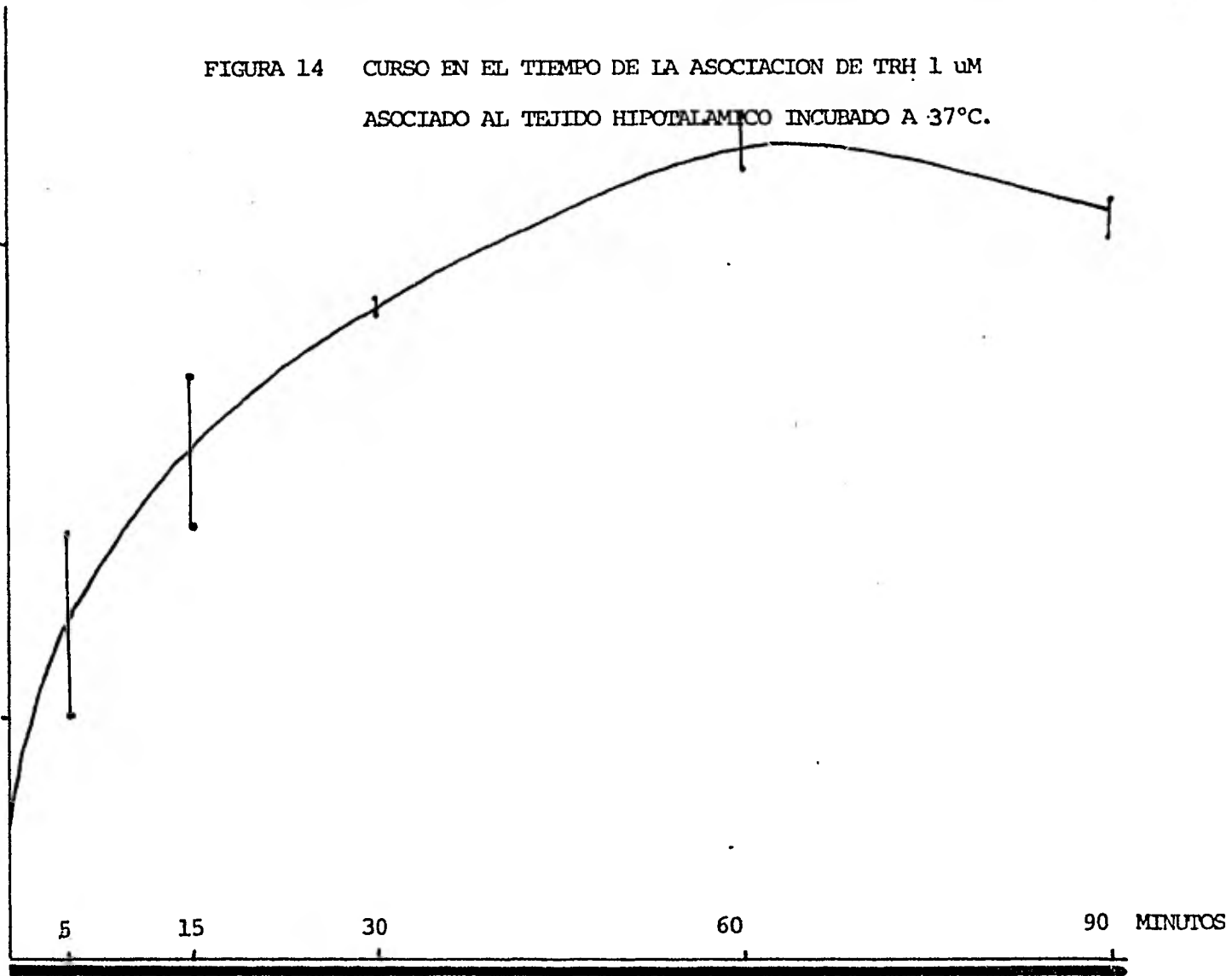
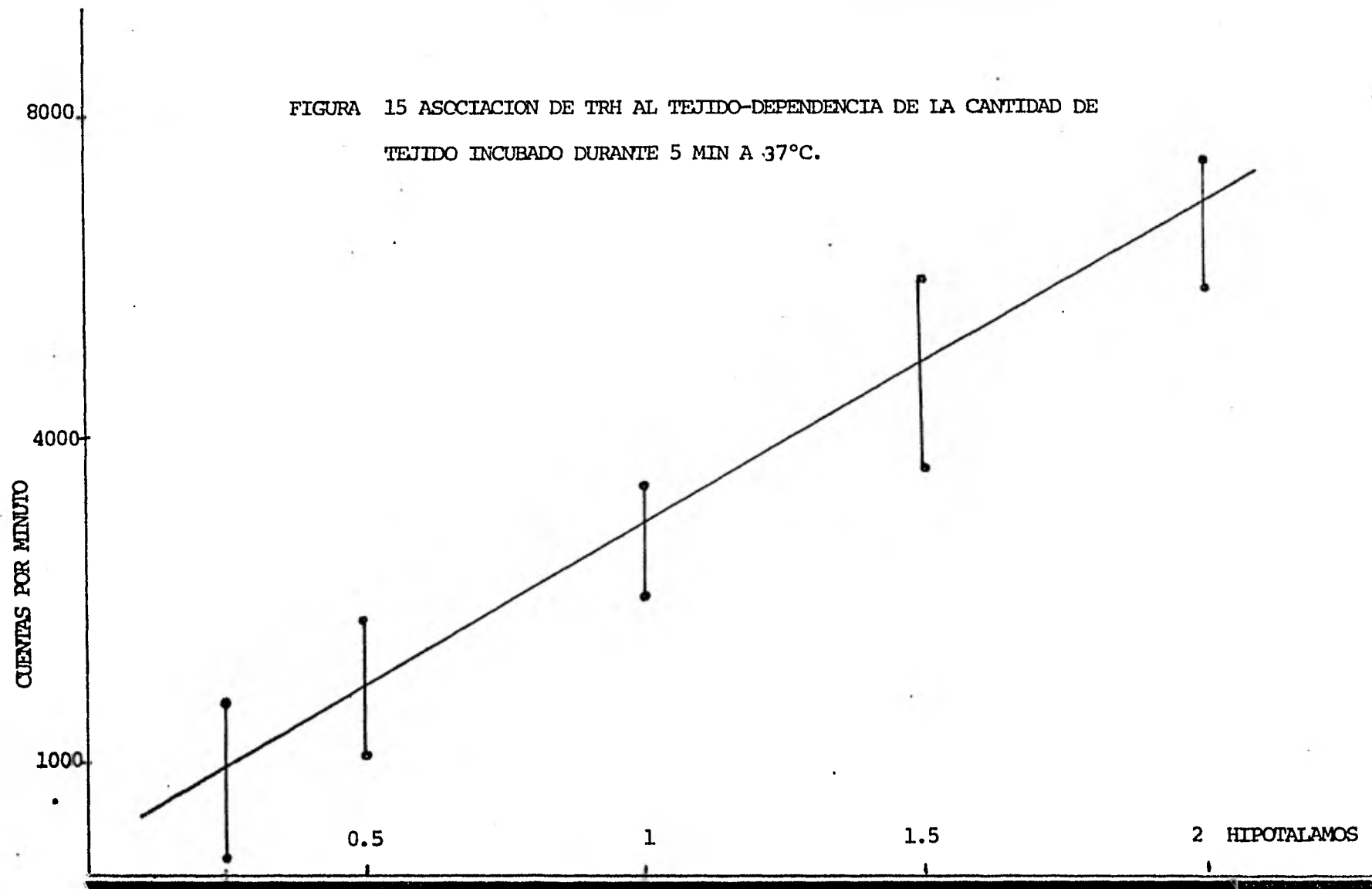


FIGURA 15 ASOCIACION DE TRH AL TEJIDO-DEPENDENCIA DE LA CANTIDAD DE
TEJIDO INCUBADO DURANTE 5 MIN A 37°C.



tervalo de concentraciones: de 2nM a 100 μ M con los siguientes resultados:

Existe asociación de TRH al tejido; ésta unión tiene un componente no saturable (difusión) y dos componentes saturables; los valores de las constantes cinéticas de los fenómenos saturables se muestran en la tabla 2. En la figura 16 se muestra la gráfica utilizada para la deducción de los valores de las constantes cinéticas.

g) Efecto de la temperatura sobre el fenómeno saturable.

Con el conocimiento de la Km del fenómeno saturable se procedió a estudiar la dependencia energética (traducida como temperatura). Para ello se incubó TRH (3 H-pro) en rebanadas de hipotálamo a 4°C y 37°C.

En la tabla 3 se expresan los resultados obtenidos al variar la temperatura de incubación. Como puede observarse el fenómeno de alta afinidad no es afectado por la variación de temperatura durante la incubación. En cambio, el fenómeno de baja afinidad se encuentra totalmente inactivo

La figura 17 muestra el efecto de la temperatura en la asociación de TRH al tejido; cuando se incubó a 4°C disminuyó notablemente la radiactividad asociada al tejido.

	%
PUREZA INICIAL	96
antes de incubar	
PUREZA EN HOMOGENADO	95.6
PUREZA DE EXTRACCION	
CON ETHER	95.2
PUREZA DE PRECIPITACION	
CON METANOL	95.0
PUREZA FINAL	94.9

TABLA 1 PUREZA DEL TRH(³H-PRO) DURANTE EL PROCESO DE EXTRACCION.

	Km	
ALTA AFINIDAD	10.8	nM
BAJA AFINIDAD	1.66	uM

TABLA 2 CONSTANTES CINETICAS DEL FENOMENO SATURABLE DE ASOCIACION DEL TRH AL TEJIDO.

		37°C		
		Km		Vmax
ALTA	AFINIDAD	10.8	nM	62.5 pmol/mg prot x 5 min
BAJA	AFINIDAD	1.66	uM	760.0 "
		4°C		
ALTA	AFINIDAD	32.0	nM	77.0 "
BAJA	AFINIDAD	NO HAY FENOMENO SATURABLE		

TABLA 3 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA CAPTURA DE TRH POR REBANADAS DE HIPOTALAMO DE RATA.

BAJA AFINIDAD Km 1.07 ± 0.22 uM
 Vmax 0.35 ± 0.035 pmol/mg prot x 5 min

TABLA 4 CONSTANTES CINETICAS DEL FENOMENO DE ALTA AFINIDAD PARA LA CAPTURA DE TRH EN HIPOTALAMO DE RATA. (LOS DATOS PRESENTADOS SON LA MEDIA DE 4 DETERMINACIONES \pm EL ERROR ESTANDAR).

FIGURA 16 GRAFICA DE LA TRANSFORMACION LINEAL DE LINEWEAVER-BURK
DE LA ECUACION DE MICHAELIS-MENTEN PARA LA EVALUACION
DE LAS CONSTANTES CINETICAS.

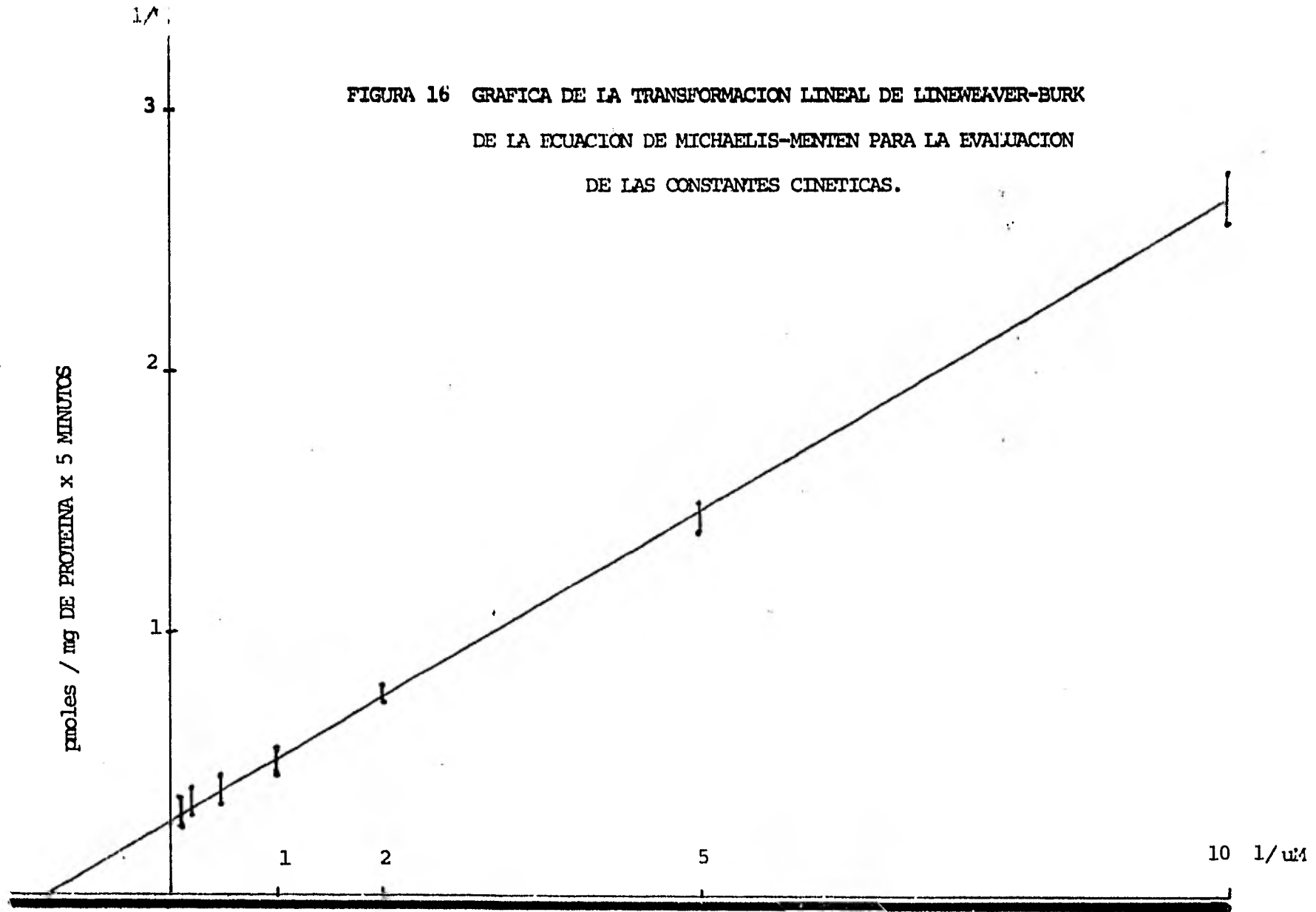
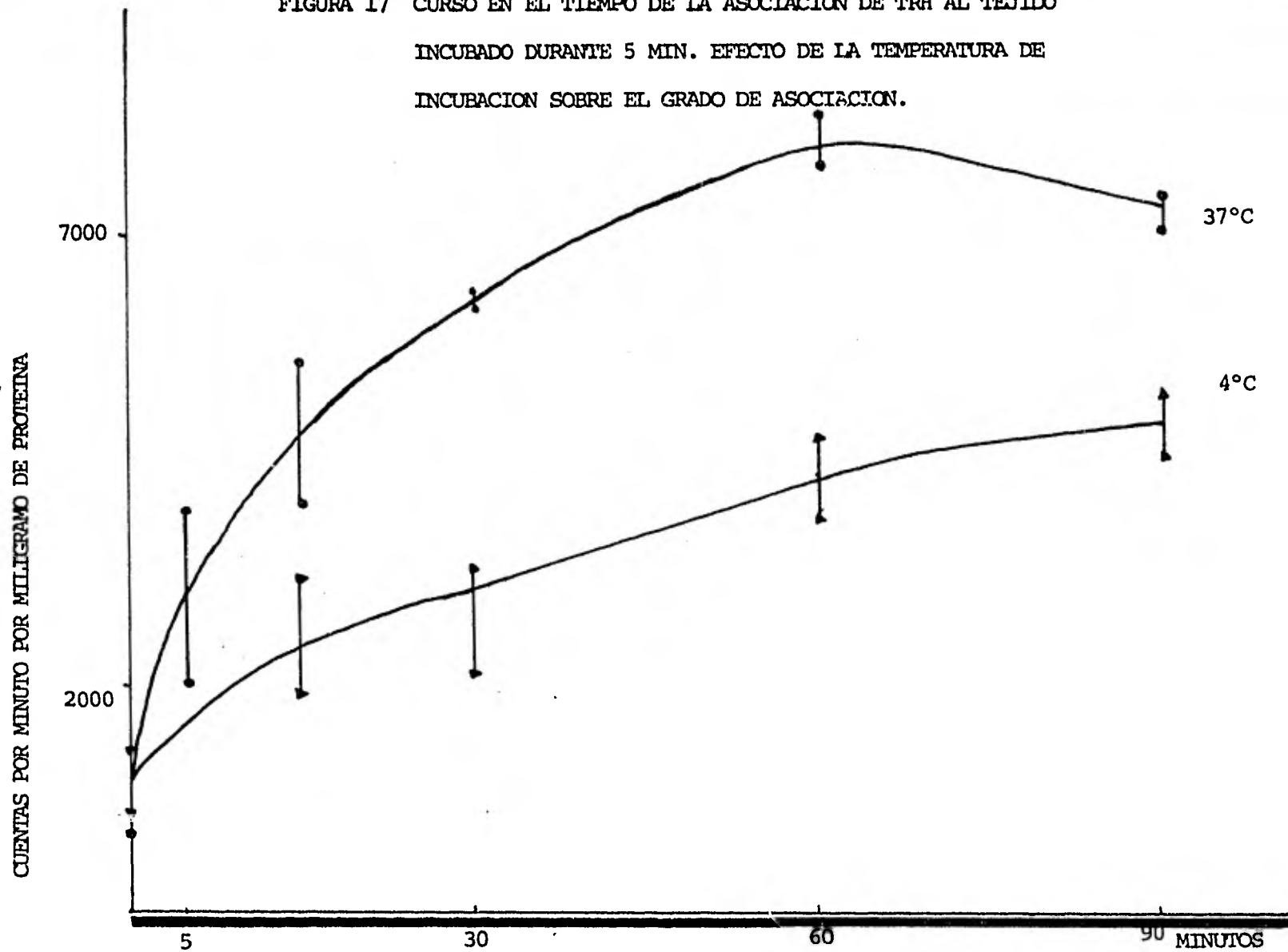


FIGURA 17 CURSO EN EL TIEMPO DE LA ASOCIACION DE TRH AL TEJIDO
INCUBADO DURANTE 5 MIN. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE
INCUBACION SOBRE EL GRADO DE ASOCIACION.



h) Caracterización adicional del fenómeno saturable de baja afinidad.

Se enfocó el trabajo hacia el estudio del fenómeno saturable de baja afinidad afectado por la temperatura, ya que esta dependencia energética sugirió la existencia de un sistema de transporte activo.

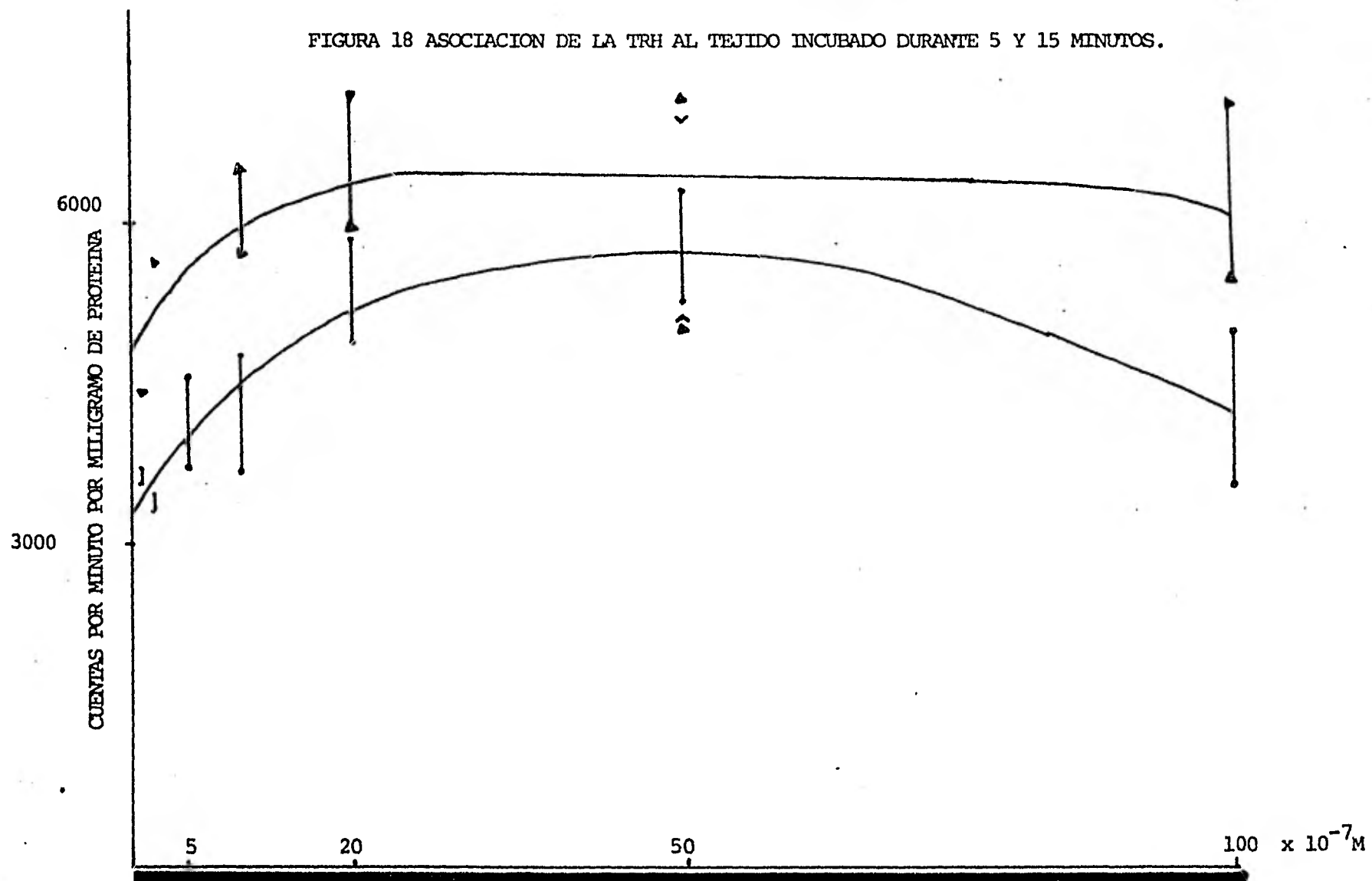
La tabla 4 muestra los resultados obtenidos al incubar TRH($^3\text{H-pro}$) en concentraciones variables a 37°C durante 5 min.

i) Asociación de TRH($^3\text{H-pro}$) al tejido-comparación de dos tiempos de incubación.

Ya que la radiactividad que se asocia al tejido es baja, se trató de aumentar la precisión de la estimación de las constantes cinéticas calculándolas a partir de datos resultado de 15 min de incubación.

Al incubar TRH($^3\text{H-pro}$) en concentraciones crecientes (de 10^{-7} a 10^{-5}M) durante 5 y 15 min, se observó un incremento en la radiactividad asociada al tejido al incubar durante 15 min. En la figura 18 se compara la radiactividad asociada en periodos de incubación de 5 y 15 min. La evaluación de las constantes cinéticas con tiempos de incubación de 15 min condujo a resultados poco reproducibles por lo que se decidió incubar

FIGURA 18 ASOCIACION DE LA TRH AL TEJIDO INCUBADO DURANTE 5 Y 15 MINUTOS.



durante 5 min.

- Efecto de dinitrofenol (DNP), ouabaina y un medio de incubación sin glucosa en la captura de TRH.

La figura 19 muestra la disminución en la radiactividad asociada al tejido en presencia de DNP, ouabaina y un medio de incubación sin glucosa. La disminución en presencia de DNP y ouabaina son similares mientras que cuando se eliminó la glucosa del medio de incubación la disminución fué más notoria.

La figura 20 muestra los resultados obtenidos al evaluar el porcentaje de inhibición de la captura en la región saturable del fenómeno.

- Resultados sobre la captura de TRH en adenohipófisis;

Ya que la adenohipófisis es el órgano blanco de la TRH en su acción como hormona, se necesita algún mecanismo de asociación al tejido que sea específico. Para estudiar esta posibilidad, se incubó TRH (^3H -pro) con tejido hipofisario en las mismas condiciones que para el tejido hipotalámico. En la tabla 5 se expresan los valores de las constantes cinéticas calculadas.

- Resultados sobre la captura de prolina y ácido gama aminobutírico en tejido hipotalámico.

Variando la concentración de prolina ^{14}C en el medio de incubación se comprobó la existencia de un mecanismo de captura saturable con los valores de constantes cinéticas mostradas en

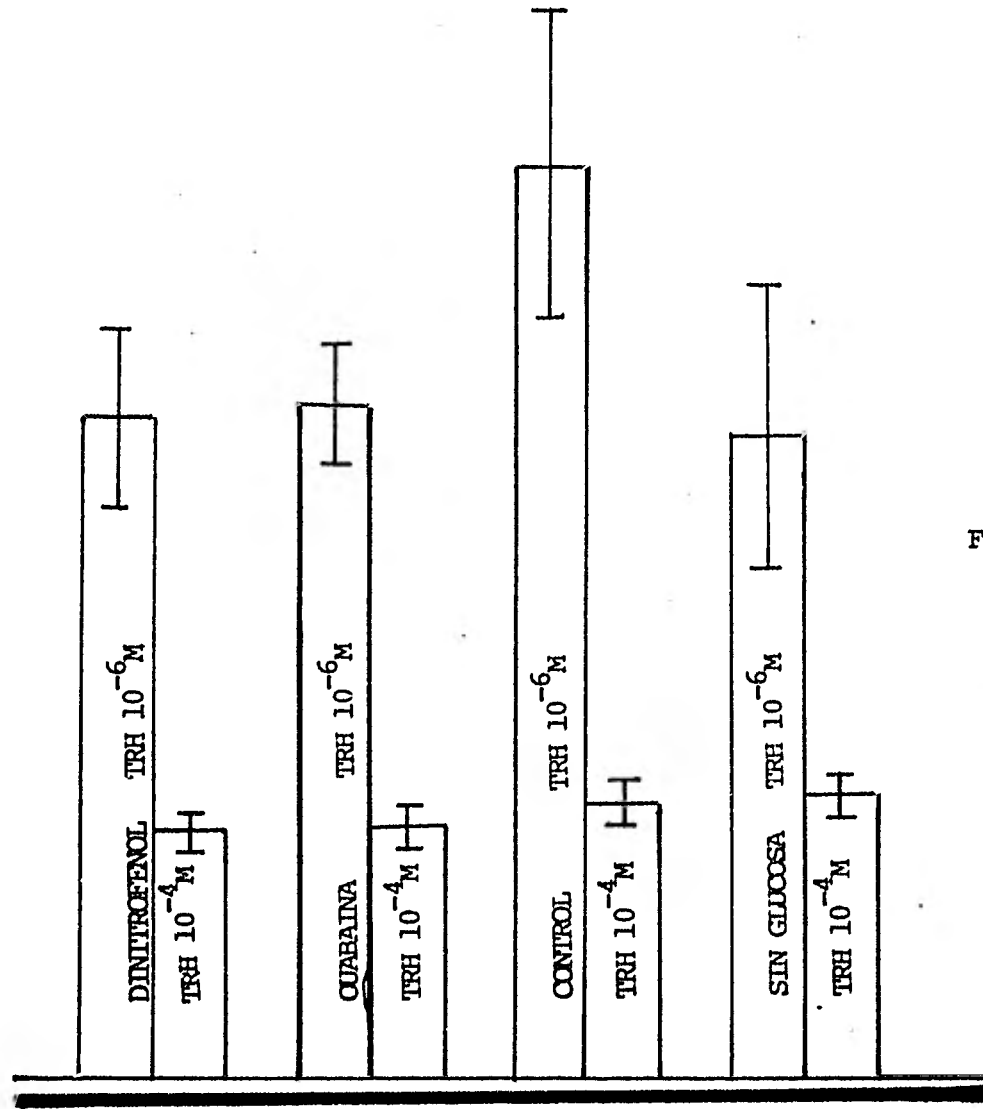


FIGURA 19 EFECTO DE DINITROFENOL, OUABAINA Y UN MEDIO SIN GLUCOSA EN LA CAPTURA DE TRH. DESPLAZAMIENTO POR ALTA CONCENTRACION DE THR. (LOS DATOS GRAFICADOS REPRESENTAN LA MEDIA \pm EL ERROR ESTANDAR DE 5 DETERMINACIONES).

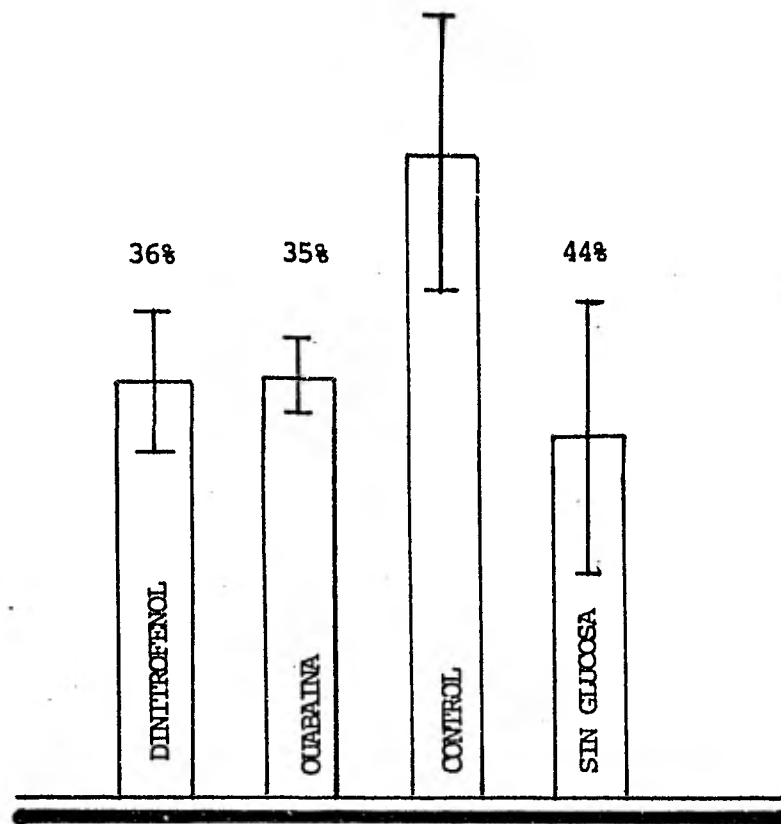


FIGURA 20 PORCIEN TO DE INHIBICION EN LA CAP TURA DE TRH EN PRESENCIA DE DINITROFENOL, OUABAINA Y UNA MEDIO SIN GLUCOSA.

la tabla 6. Estos valores son similares a los mencionados en la literatura(11).

La posibilidad de que la baja amplitud del fenómeno observado en los experimentos con TRH(³H-pro) fueran provocadas por manipulaciones inadecuadas con el tejido fué estudiada de la siguiente manera:

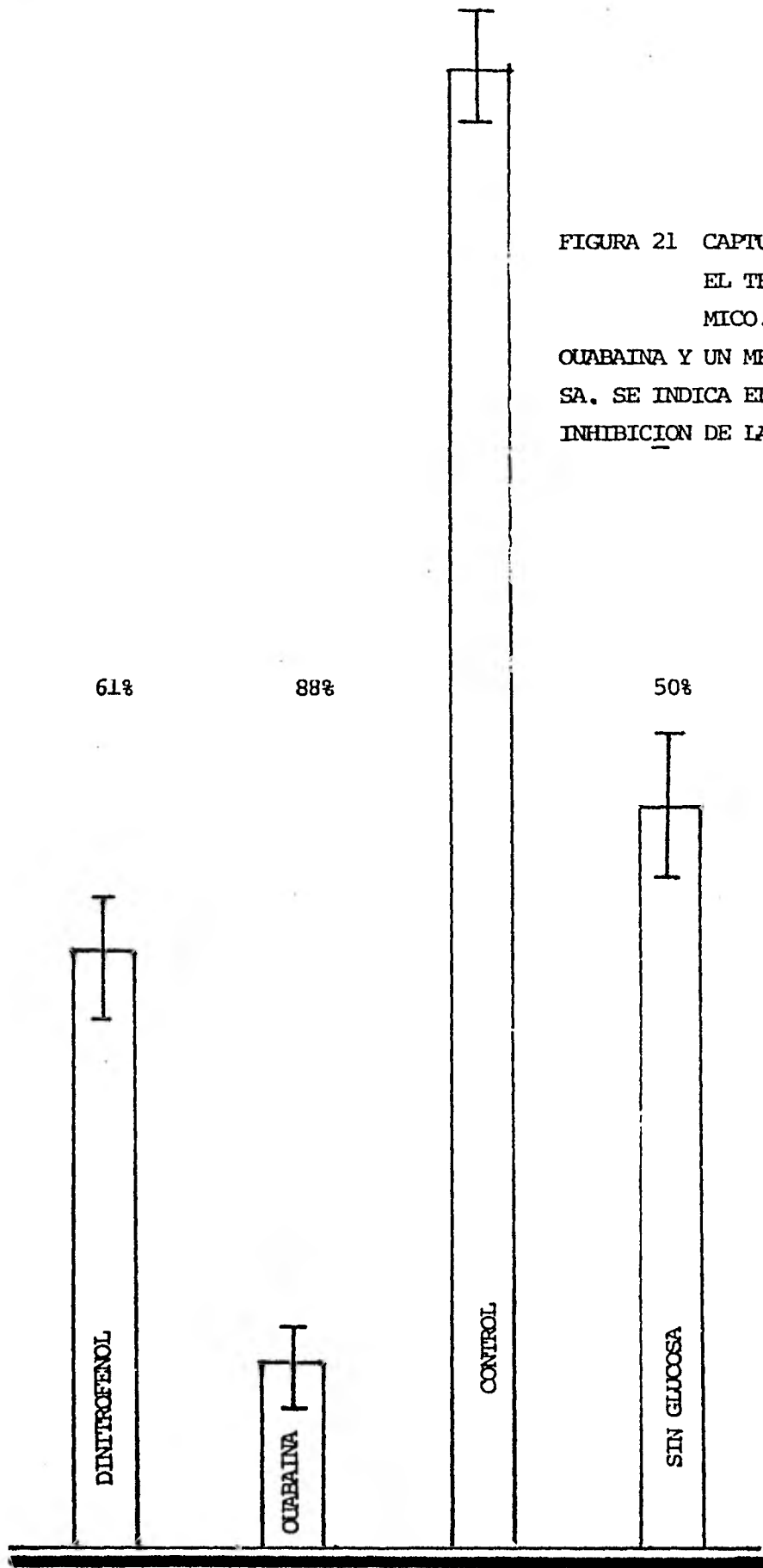
Al incubar Gaba en concentraciones variables (de 10^{-7} a 10^{-4} M) se obtuvo el valor de la constante de Michaelis mostrada en la tabla 7. Esta, comparada con la Km de la literatura, muestra la funcionalidad de la preparación.

- Resultados sobre el efecto de DNP, ouabaina y un medio de incubación sin glucosa en la captura de Gaba.

Este experimento fué realizado para demostrar que la concentración de DNP y ouabaina utilizada es suficiente para desacoplar la fosforilación oxidativa y afectar el transporte de sodio.

La figura 21 muestra que la concentración de DNP y ouabaina fueron suficientes para inhibir la captura de Gaba en la preparación utilizada.

FIGURA 21 CAPTURA DE GABA POR EL TEJIDO HIPOTALAMICO. EFECTO DE DNP OUABAINA Y UN MEDIO SIN GLUCOSA. SE INDICA EL PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA CAPTURA.



K_m

V_{max}

2.2 μM

53 nmoles / mg prot x 5 min

TABLA 5 CONSTANTES CINETICAS DEL FENOMENO
SATURABLE DE CAPTURA DE TRH POR EL
TEJIDO HIPOFISIARIO.

K_m

V_{max}

0.33 μM

0.22 pmoles/ mg prot x 5 min

TABLA 6 CONSTANTES CINETICAS DEL FENOMENO SATU-
RABLE PARA LA CAPTURA DE PROLINA POR TE-
JIDO HIPOTALAMICO.

Km EXPERIMENTAL 0.1 μ M

Km LITERATURA 0.12 μ M

TABLA 7 VALOR DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS DEL
FENOMENO SATURABLE PARA LA CAPTURA DE
GABA POR EL TEJIDO HIPOTALAMICO.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Existen datos suficientes como para afirmar que la TRH puede actuar no sólo sobre el tirótrofo, sino también como un neurotransmisor (7,27,32,38). Esto supone la necesidad de que exista un mecanismo que elimine su presencia del espacio sináptico después de su interacción con el receptor.

Nuestros resultados apoyan esta suposición. Para los estudios de caracterización y evaluación de un posible fenómeno de captura es necesario trabajar con una hormona marcada donde la pureza radioquímica debe ser muy elevada como requisito previo. El uso de la cromatografía en capa fina de alta resolución nos permitió obtener este tipo de pureza. De nuestros resultados podemos concluir además que una cromatografía de intercambio iónico previa no mejora los resultados obtenidos y si agrega un paso metodológico más que no se justifica.

La adición de bacitracina al medio de incubación inhibió la degradación de la TRH por las enzimas lisosomales, lo que se demostró por la no aparición de metabolitos durante períodos largos de incubación. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores que utilizaron una metodo-

gía similar(36). Sin embargo, cuando la incubación sobrepasa los 90 minutos comenzaron a aparecer metabolitos que migran con TRH-OH y prolina, indicando que la capacidad inhibidora de la bacitracina comenzó a disminuir. McKelvy(36) propone que la bacitracina actúa como un inhibidor competitivo de la degradación de la TRH y la LHRH.

La degradación de la TRH en el tejido no fué inhibida por la adición de bacitracina al medio. Este resultado hace suponer que la bacitracina no penetra a la célula y por lo tanto no inhibe a las péptidasas intracelulares. Esto sugiere que parte de la TRH asociada al tejido está en el compartimento intracelular, el cual contiene peptidasas. Esta degradación intracelular de la TRH obliga a utilizar TRH de pureza radioquímica elevada y a separarla de sus metabolitos.

Al restar la radiactividad extracelular, por medio del cálculo del volumen extracelular, se puede deducir que parte de la radiactividad asociada al tejido no está en el espacio extracelular. Burt (10) ha señalado la existencia de receptores específicos a la TRH en el hipotálamo. Por tanto una parte de la radiactividad que no está en el espacio extracelular ni en el compartimento intracelular, podría corresponder a la unión de la TRH marcada a estos receptores. Por nuestros experimentos no es posible afirmar o des-

cartar esta posibilidad.

Al estudiar la fijación de la TRH a los receptores en función del tiempo, se observó que a mayor tiempo de incubación la fijación aumentó hasta una saturación. Este hecho podría explicarse por la existencia de receptores de diferente afinidad. Este hecho es diferente a lo observado con la sustancia P donde no se ha probado la existencia de un fenómeno saturable (1,39).

Al variar la temperatura de incubación se observó que el fenómeno de baja afinidad era inhibido, mientras que el de alta afinidad no sufría modificaciones. La inhibición del fenómeno de baja afinidad por la temperatura reflejaría la existencia de un requerimiento energético para la recaptura de la TRH en el modelo utilizado en este estudio. Esta dependencia energética puede suponer la existencia de un sistema de transporte activo para la recaptura de la TRH. En base a lo anterior podemos proponer que los receptores descritos por Burt (10) corresponden a los receptores de alta afinidad encontrados en nuestros experimentos.

La existencia de un mecanismo de transporte activo dependiente del aporte de energía y del transporte de sodio está apoyada por los resultados obtenidos al agregar DNP o ouabaina al medio de incubación o al sustituir la glu

cosa por cloruro de sodio, Este hecho es semejante al descrito para el Gaba y la prolina(11).

Los resultados obtenidos al calcular la eficiencia de la captura de TRH en hipotálamo, muestra que esta sería un 75% menor que la calculada para el cerebelo(41).

El fenómeno de captura de la TRH, junto con el de la carnosina, parecen ser hasta ahora la excepción respecto a la existencia de fenómenos de captura para neuropéptidos en el SNC(1,39, 41).

Resultados experimentales realizados con sinaptosomas parecen indicar que la TRH no es captada por la terminación nerviosa(42, H.Torres, P.Joseph comunicación personal). Esto sugeriría que la captación de la TRH demostrada en nuestros experimentos sería debida a la acción de la glia o al soma neuronal. Nuevamente la TRH se comportaría en forma diferente al Gaba o a la Dopamina que si son captadas por la terminación nerviosa(11).

En la adenohipófisis, la TRH se asocia a las células en igual forma que lo hace en el hipotálamo pero con una V_{max} 100 veces mayor. Esto supone que el número de receptores en la adenohipófisis es mayor que en el hipotálamo.

En suma, los resultados obtenidos por nosotros, junto con los presentados por otros autores, apoyan la hipótesis de que la TRH luego de haber interactuado con su receptor es

captada por la neurona o por la glia.

CONCLUSIONES

Existe un fenómeno de asociación de la TRH a las células del hipotálamo medio basal y de la adenohipófisis.

Este fenómeno es saturable en el tiempo y depende de la temperatura, del transporte de sodio y de energía.

La captura de la TRH dependería de un fenómeno de transporte activo.

ANEXO 1

* COMPOSICION DEL RINGER KREBS BICARBONATO

NaCl	125 mM
KCl	4.4 mM
KH_2PO_4	1.2 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.3 mM
NaHCO_3	26.0 mM
GLUCOSA	10.0 mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.75 mM
+ BACITRACINA	$2.0 \times 10^{-5} \text{M}$
& ACIDO AMINOXIACETICO	$1.0 \times 10^{-4} \text{M}$

+Para experimentos con TRH, prolina y Gaba.

&Para experimentos con Gaba.

* COMPOSICION DEL RINGER KREBS BICARBONATO SIN SODIO

NaCl	125 mM
KH_2PO_4	1.2 mM
MgSO_4	1.3 mM
KHCO_3	4.4 mM
KCl	4.4 mM
GLUCOSA	10.0 mM
CaCl_2	.75 mM
TrisHCl	26.0 mM

* MEZCLAS DE CENTELLEO LIQUIDO
PARA MUESTRAS ACUOSAS

1	TRITON	333 ml
	TOLUENO	666 ml
	POPOP	150 mg
	PPO	5.5 g
11	NAFTALENO	60.0 g
	PPO	4.0 g
	POPOP	0.2 g
	METANOL ABS.	100.0 ml
	ETILEN GLICOL	20.0 ml
	p-DIOXANO CBP	1000.0 ml

PARA MUESTRAS NO ACUOSAS

1	OMNIFLUOR	4.0 g
	TOLUENO	1000.0 ml

* REACTIVO DE PAULY

Mezclar 10 ml de ácido sulfanílico (1%) en HCl 0.1 N con 10 ml de nitrito de sodio recientemente preparado, asperjar y secar; después asperjar con Na_2CO_3 al 10% (reacción con péptidos que contienen histidina).

* REACTIVO DE ISATINA

Asperjar con una solución de isatina al 0.2% en n-butanol dejar en el horno durante 15 min a 100°C. (para localizar prolina e hidroxiprolina).

BIBLIOGRAFIA

- 1- ABRAHM, F.; PISANO, J.J.; UDENFRIEND, S. Uptake of carnosine and homocarnosine by rat brain slices. Arch. Biochem. Biophys. 104;160;1954.
- 2- ANDERSON, M.S.; BOWERS, C.Y.; KASTIAN, A.J.; SCHALCH, D.-S. SCHALLY, A.V.; SNYDER, P.J.; UTIGER, R.D.; WILBER, J.F. & WISE, A.J. Synthetic TRH. A potent stimulator of thyrotropin secretion in man. New Engl. J. Med. 285;1279; - 1971.
- 3- BAUER, K.; KLEINKAUF, H. Catabolism of thyroliberin by rat adenohypophyseal tissue extract. J. Biochem. 106; 107; 1980.
- 4- BAUER, K.; LIPMANN, F. Attempts toward biosynthesis of the thyrotropin releasing hormone and studies on its breakdown in hypothalamic tissue preparations. Endocrinology. 99;230;1976.
- 5- BARNEA, A.; BEN-JONATHAN, N.; PORTER, J.C. Characterization of hypothalamic subcellular particles containing luteinizing hormone releasing hormone and thyrotropin releasing hormone. J. Neurochem. 27;477;1976.
- 6- BLACKWELL, R.E.; GUILLEMIN, R. Hypothalamic control of adenohypophysial secretions. Ann. Rev. Physiol. 35; - 357; 1973.
- 7- BOWERS, R.C.; SCHALLY, V.A.; REDDING, W.T. Effect of thyrotropin releasing factor (TRF) of ovine, bovine, porcine and human origin on thyrotropin release in vitro and in vivo. Endocrinology 77;609;1965.

- 8- BRAITMAN, D.J.; AUKER, C.R.; CARPENTER, D.O. Thyrotropin releasing hormone has multiple actions in cortex. Brain Res. 194;244;1980.
- 9- BROWNSTEIN, M.J.; PALKOVITS, M.; SAAVEDRA, J.M. Thyrotropin releasing hormone in specific nuclei of rat brain. Science 185;267;1974.
- 10- BURT, D.R.; TAYLOR, R.L. Binding sites for thyrotropin releasing hormone in sheep nucleus accumbens resemble pituitary receptors. Endocrinology 106; 1416;1980.
- 11- COHEN, S.R.; LAJTHA, A. Amino acid transport. En: Handbook of neurochemistry. Dirigido por: Lajtha A. vol. VII cap. 21 Plenum Press New York 1972.
- 12- COHEN, S.R. Anal. Biochem. 31;539;1969.
- 13- COHEN, S.R. The estimation of extracellular space of brain tissue in vitro. En: Research methods in neurochemistry. Dirigido por Marks, N.; Rodnight, R. vol. 1; cap 8; Plenum Press New York 1972.
- 14- FLEISCHER, N.; LORENTE, M.; KIRKLAN, D.J.; KIRKLAND, R.; CLAYTON, G.; CALDERON, M. Synthetic thyrotropin releasing factor as a test of pituitary thyrotropin reserve. J. Clin. Endocrinol. 34.;617;1972.
- 15- GRANT, G.; LING, N.; RIVIER, J.; VALE, W. Orientation restrictions of the peptide hormone thyrotropin releasing factor due to intramolecular hydrogen bonding. Biochemistry 11;307;1973.
- 16- GREEN, J.D. Comparative anatomy of hypophysis with special reference to its blood supply and innervation. Am. J. Anat. 88;225;1951.

- 17- GREEN,A.R.; GRAHAM,E.; SMITH,D.G. TRH potentiates behavioural changes following increased brain 5 - hydroxytryptamina accumulation in rats. *Nature* 251; 524;1974.
- 18- GREEN,J.D.; HARRIS,W.G. *J.Endocrinol.*5;136;1947.
- 19- GRIMM-JORGRNSEN,Y.; MCKELVY,J.F. Biosynthesis of TRH by newt (*Triturus viridescens*) brain in vitro isolation and characterization of TRH. *J.Neuro - chem.*23;471;1974.
- 20- GUILLLEN,R.; YAMAZAKI,E.; GARD,D.A.; JUTISZ,M.; SAKIZ,E. *In vitro* secretion of thyrotropin (TSH) stimulation by hypothalamic peptide (TRF). *C.R. Acad. Sci.* 73;564;1963.
- 21- HARRIS, G.W. Neural control of the pituitary - gland. *Physiol.Rev.* 28;139;1948.
- 22- HEAL,D.J.;GREEN,A.R. Administration of thyrotropin releasing hormone (TRH) to rats releases dopamine in n. accumbens but not in n. caudatus. *Neuropharmacology* 18;23;1979.
- 23- HERS,L.B.; MCKELVY,J.F. Enzymes involved in the degradation of thyrotropin releasing hormone (TRH) and luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in bovine brain. *Brain Res.* 168;553;1979.
- 24- HOKFELT,T.; FUXE,K.; JOHANSSON,O. ; JEFFCOATE,S.; WHITE,N. Distribution of thyrotropin releasing hormone (TRH) in the central nervous system as revealed with immunohistochemistry. *Eur.J.Pharmacol.* 34;389;1975.

- 25- JACKSON, I.; REICHLIN, S. TRH: Distribution in hypothalamic and extrahypothalamic brain tissues of mammalian and submammalian chordates. *Endocrinology* 95;854;1974.
- 26- JACKSON, I.M.; REICHLIN, S. Thyrotropin releasing hormone (TRH) distribution in the brain, blood and urine of the rat. *Life Sci.* 14;2259;1974.
- 27- JOSEPH, B.M.; RENAUD, L.P.; BRAZEAU, P. Hypothalamic peptides: new evidence for peptidergic pathways in the CNS. *Lancet* 2;963;1975.
- 28- JOSEPH, B.P.; LOUDES, C.; CHARLI, J.L.; KORDON, C. Subcellular distribution of brain peptidases degrading luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) and thyrotropin releasing hormone (TRH). *Brain Res.* 166;321;1979.
- 29- KELLER, H.H.; BARTHOLINI, G.; PLETSCHER, A. Enhancement of cerebral noradrenaline turnover by thyrotropin releasing hormone. *Nature* 248;528;1974.
- 30- LABRIE, F.; BORDEN, N.; POIRIER, G.; DELEAN, A. Binding of TRF to plasma membranes of bovine anterior pituitary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69;283;1972.
- 31- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, J.H.; FARRA, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193;265;1951.
- 32- Mc DONALD, S.; PROTER, C.J. Hypothalamic pituitary stimulating and inhibiting hormones. *Phys. Rev.* 49;2;1969.
- 33- McKELVY, J.F. *Anal. Biochem.* 64;609;1975.
- 34- McKELVY, J.F. *Biochemical neuroendocrinology I: Biosynthesis of thyrotropin releasing hormone (TRH) by organ cultures of mammalian hypothalamus.*

- Brain Res. 65;489;1974.
- 35- MCKELVY, J.F.; CHARLI, J.L.; JOSEPH, P.B. Cellular biochemistry of brain peptides: biosynthesis, degradation packaging, transport and release. En: Brain peptide biochemistry. vol I; 171; 1980.
- 36- MCKELVY, J.F.; LEBLANC, P.; LOUDES, C.; PERRIE, S.; GRIMM-JORGENSEN, Y.; KORDON, C. The use of bacitracin as an inhibitor of the degradation of thyrotropin releasing factor and luteinizing hormone releasing factor. Biochem. Biophys. Res. Comm. 73; 507; 1976.
- 37- MITNIK, M.; REICHLIN, S. Enzymatic synthesis of TRH by hypothalamic "TRH synthetase". Endocrinology 91; 1145; 1972.
- 38- NAGAWA, J. Pharmacology of the central nervous system effects of thyrotropin releasing hormone. J. Takeda Res. Lab. 39; 151; 1980.
- 39- NAKATA, Y.; KUSAKA, Y.; HARVAKI, Y. Active uptake of substance p carboxy-terminal heptapeptide (5-11) into rat brain and rabbit spinal cord slices. J. Neurochem. 37; 1529; 1981.
- 40- NEMEROFF, C.B.; BISSETTE, G.; PRANGE, A.J.; LOOSEN, P.T.; BARLOW, T.S.; LIPTON, M.A. Neurotensin: central nervous system effects of a hypothalamic peptide. Brain Res. 128; 485; 1977.
- 41- PACHECO, M.F.; WOODWARD, D.J.; MCKELVY, J.F.; GRIFFIN, W.S. TRH in the rat cerebellum: II uptake by cerebellar slices. Peptides 2; 283; 1981.
- 42- PARKER, C.R.; NEAVES, W.B.; BARNEA, A.; PORTER, J.C. Studies on the uptake of (³H) thyrotropin releasing hormone and its metabolites by synaptosome preparations of the rat brain. Endocrinology 101; 66; 1977.

- 43- PIVA, F.; STEINER, H. Bioassay and toxicology of TRH
Front Horm. Res. 1;11;1972.
- 44- PLOTNIKOFF, N.P.; PRANGE, A.J.; BREESE, B.R.; ANDERSON, M.S.; WILSON, I.C. Thyrotropin releasing hormone: enhancement of Dopa activity by a hypothalamic hormone. Science 178;417;1972.
- 45- PRANGE, A.J.; BREESE, G.R.; COTT, J.M.; MARTIN, B.R.; COOPER, B.R.; WILSON, I.C.; PLOTNIKOFF, N.P. Thyrotropin releasing hormone: antagonism of pentobarbital in rodents. Life Sci. 14;447;1974.
- 46- PRANGE, A.J.; BREESE, G.R.; JAHNKE, G.D.; COOPER, B.R.; COTT, J.M. Parameters of alteration of pentobarbital response by hypothalamic polypeptides. Neuropsychobiology 1;121;1975.
- 47- REDDING, T.W.; SCHALLY, A.V. Studies on inactivation of TRH, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131;415;1963.
- 48- SCHALLY, A.V.; ARIMURA, A.; KASTIN, A.J. Hypothalamic regulatory hormones. Science 179;341;1973.
- 49- SCHALLY, A.V.; BOWERS, C.Y.; REDDING, T.W. Purification of thyrotropic hormone releasing factor from bovine hypothalamus. Endocrinology 78;726;1966.
- 50- SNOKE, J.E.; BLOCH, K. The biosynthesis of glutathione: symposium on glutathione. Dirigido por COLUWICK, S.; LAZAROW, A.L.; RACKER, E.; SCHWARZ, D.R.; STADTMAN, E. vol. 1;129. Academic Press New York 1954.
- 51- TIXIER-VIDAL, A.; BRUNET, N.; GOURDJI, D. Morphological and molecular aspects of the regulation of prolactin secretion by rat pituitary cell lines. En: Progress in prolactin physiology and pathology. Di-

- rigido por ROBYN,C.; HARTER,M. volI; 29-43
Elsevier North Holland Amsterdam 1978.
- 52- VALE,W.; GRANT,G.; GUILLEMIN,R. Chemistry of the
hypothalamic releasing factors. Studies on structure
function relationships.En:Frontiers in neuroen-
docrinology. Dirigido por: Ganong,W.F.; MARTIN,L.
vol 1;375;1973.
- 53- VALE,W.; RIVER,C. Hypophysiotropic hormones.En:
Handbook of psychopharmacology.Dirigido por:IVER -
SEN,L.L.; IVERSEN,S.D.; SNYDER,S.H. vol 1;195. Ple
mun Press New York 1975.
- 54- VALE,W.; SPIESS,J. Characterization of a 41 resi -
due ovine hypothalamic peptide that stimulates se -
cretion of corticotropin and β endorphin. Science -
231;1394;1981.
- 55- WILSON,I.C.; PRANGE, A.J.; LARA,P.P.; ALLTOP,L.B.;
STIKELEATHER,R.A.;LIPTON.M.A. TRH (loprenone):Psy -
chobiological responses of normal women I. Subjeti-
ve experience. Arch.Gen.Psychiatry 29;15;1973.
- 56- WINOKUR,A.; UTIGER,R.D. Thyrotropin releasing hor-
mone in the central nervous system:distribution
and degradation.En:Central nervous system effects
of hypothalamic hormones and other peptides.Dir-
ido por: COLLU,A. vol I;55. Raven Press New York
1979.
- 57- WINOKUR,A.; UTIGER,R.D. Thyrotropin releasing hor
mone:Regional distribution in rat brain. Science
185;265;1973.
- 58- YARBROUGH,G.G. TRH potentiates excitatory actions
of acetylcholine on cerebral cortical neurones.
Nature 263;523;1976.