

0381  
9 2 ej. 1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología

Relevancia Fisiológica de las Enzimas que Degradan al  
TRH en Sinapsis

TESIS

que para obtener el grado de  
Doctor en Investigación Biomédica Básica

presenta  
la M. en C. (Bioquímica)

MILAGROS MENDEZ UBACH.

Cuernavaca, Morelos.

Febrero 1990.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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.

## INDICE

	Pagina
ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION	2
I.- Los neuropéptidos como mensajeros quimicos en el Sistema Nervioso.	2
Importancia.	2
Origen y distribución.	5
Diversidad : formas moleculares.	7
Funciones.	8
Biosíntesis.	9
Coexistencia.	13
Liberación.	14
Acción y mecanismos de transducción.	17
II.- Mecanismos de inactivación de los neuropeptidos.	18
Difusión.	20
Internalización.	20
Modificación covalente.	22
Captura.	24
Degradación enzimática :	25
A. Mecanismos intracelulares de inactivación.	26
B. Mecanismos extracelulares de inactivación.	26
III.- TRH como modelo de estudio.	35
A.- Características en el Sistema Nervioso.	35
Función endocrina en el eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo.	35
Distribución.	38
Biosíntesis.	39
Liberación.	40
Receptores y mecanismos de acción.	45
Efectos en el Sistema Nervioso Central.	46
B.- Degradación enzimática del TRH.	49
- Propiedades de las peptidasas que lo degradan.	49
- Regulación de la actividad de las enzimas que degradan al TRH.	53
OBJETIVOS Y METAS	57

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	58
I.- Regulacion de los niveles endógenos de TRH en la terminal nerviosa.	58
II.- Regulacion de los niveles extracelulares de TRH : mecanismo de inactivacion del TRH liberado.	60
RESULTADOS	54
I.- Regulacion de los niveles endogenos de TRH en la terminal nerviosa.	65
II.- Regulacion de los niveles extracelulares de TRH : mecanismo de inactivacion del TRH liberado.	70
Publicaciones.	90
DISCUSION	114
CONCLUSION GENERAL	134
REFERENCIAS	137

## ABREVIATURAS

ACH = acetilcolina.  
ACTH = corticotropina.  
CPHNA = N-1-carboxi-feniletíl (N<sup>+</sup> benzil)-histidil-Bnaftilamida.  
CCK = colecistocinina.  
DA = dopamina.  
GABA = ácido gama aminobutírico.  
H = histamina.  
5-HT = serotonina.  
KKB = Kress-Ringer-Bicarbonato.  
Leu-enc = Leucina-encefalina.  
LHRH = hormona liberadora de la hormona luteinizante.  
MAO = monoamino oxidasa.  
MEH = hipotálamo mediobasal.  
α-MSH = hormona estimulante de melanotropina.  
Met-enc = Metionina-encefalina.  
NA = noradrenalina.  
NM = neuromodulador.  
NP = neuropéptido.  
NT = neurotransmisor.  
PAM = péptido de glicina monooxigenasa α-amidante.  
PDMK = piroglutamil diazo metilcetona.  
PE = prolil endopeptidasa.  
PGA I = piroglutamato aminopeptidasa I.  
PGA II = piroglutamato aminopeptidasa II.  
POMC = pro-opiomelanocortina.  
RER = retículo endoplásmico rugoso.  
RIA = radioinmunoensayo.  
SNC = Sistema Nervioso Central.  
SNP = Sistema Nervioso Periférico.  
SRIF = somatostatina.  
T<sub>3</sub> = triiodotironina.  
T<sub>4</sub> = tiroxina.  
TRH = hormona liberadora de tirotropina.  
TSH = tirotropina.  
VIP = péptido vasoactivo intestinal.  
ZPP = N-benziloxicarbonil-prolil-prolinil.

## INTRODUCCION

### I.- Los neuropéptidos como mensajeros químicos en el Sistema Nervioso.

El cerebro de los mamíferos es un sistema complejo que coordina una gran variedad de funciones en el organismo. La regulación de estas funciones se lleva a cabo a través de la comunicación interneuronal, la cual es mediada por mensajeros químicos. Inicialmente se pensó que el número de mensajeros químicos no debía ser muy grande, restringiéndose a moléculas como la acetilcolina, las aminas biogénicas y algunos aminoácidos. Sin embargo, actualmente se sabe que existe otro tipo de sustancias neuroactivas, de naturaleza peptídica, capaces de modificar la actividad neuronal, por lo que se ha propuesto que estos mensajeros podrían actuar como neurotransmisores (NT) o neuromoduladores (NM) de la transmisión sináptica. Por consiguiente, resulta de capital importancia conocer la bioquímica de los neuropéptidos y con ello contribuir a la comprensión del funcionamiento del Sistema Nervioso (SN). Tal investigación requiere de información relacionada con aspectos fundamentales como la biosíntesis, empaquetamiento, transporte, liberación, inactivación e interacción de los neuropéptidos (NP) con sus receptores específicos. Aunque se conocen algunos de los efectos de los NP en el Sistema Nervioso Central (SNC), se cuenta con poca información relacionada a los procesos bioquímicos involucrados en el funcionamiento de las neuronas peptidérgicas. Se conoce aún menos acerca de los mecanismos que regulan las funciones nerviosas en las que participan los NP, y se ha sugerido que los procesos de

biosíntesis, liberación e inactivación representan etapas potenciales sujetas a regulación.

El descubrimiento de que las neuronas secretoras de péptidos comprenden una gran porción del Sistema Nervioso Central y Periférico (SNP) (Krieger y col., 1983; Lynch y Snyder, 1986; Scharrer, 1987), ha levantado un gran interés en cuanto al posible papel fisiológico de éstos en la comunicación neuronal y en los procesos implicados en la regulación de muchas funciones nerviosas. La familia de neuronas peptidérgicas incluye actualmente, además de las células neurosecretoras "clásicas", una larga lista de tipos celulares que sintetizan y utilizan péptidos como mensajeros químicos (Scharrer, 1987). Es así como muchos de ellos participan en diversas funciones del organismo, desde el metabolismo general de las células, el control del desarrollo y la reproducción, hasta funciones más especializadas como la transmisión nerviosa. Por lo tanto, los péptidos pueden transmitir información como hormonas o neuro-hormonas (comunicación endócrina, parácrina, autócrina, neurohemal), como neurotransmisores y/o neuromoduladores (Fig. 1) en distintos sitios del organismo (Vizi, 1984; Scharrer, 1987), de tal manera que el límite entre neuronas y otras especies celulares implicadas en la comunicación celular, especialmente las células endócrinas, se ha vuelto indistinto. Esto se ve ejemplificado por dos tipos celulares, las células APUD (células endócrinas del sistema difuso del aparato digestivo) (Pearse y Takor Takor, 1979) y las paraneuronas (Fujita, 1985). La importancia de los NP en una gran variedad de procesos biológicos puede difícilmente ser sobreestimada. Su versatilidad parece explicar gran parte de la complejidad y sutileza en el señalamiento neuroquímico, el cual no

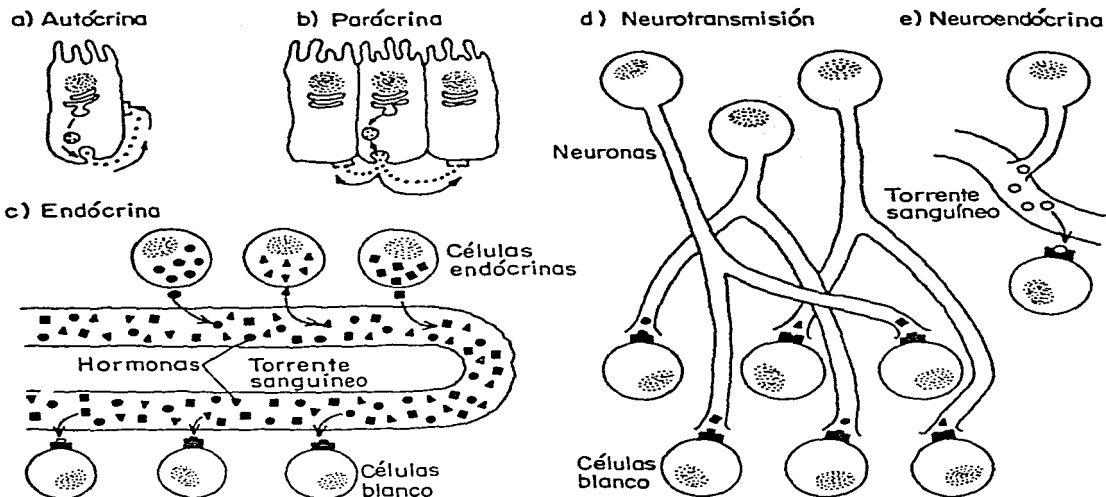


Fig. 1.-Formas de comunicación intercelular. (Tomado de Snyder, 1985).



podría llevarse a cabo exclusivamente a través de la transmisión sináptica clásica.

La amplia distribución de los NP tanto dentro como fuera del SNC, así como el hecho de que muchos de ellos coexistan con NT no peptidérgicos, apoya esta premisa.

Recientemente, se ha demostrado que algunas poblaciones de astrocitos sintetizan y secretan NP y que poseen receptores a éstos (Shinoda y col., 1989; Hansson, 1988), por lo que la presencia de NP no se limita a neuronas y a células secretoras. Por el momento, no se conoce la función de estos mensajeros en células gliales.

Los NP están ampliamente distribuidos a lo largo de todo el reino animal, incluyendo los organismos unicelulares (Roth y Le Roith, 1984). La similitud en secuencias de aminoácidos de numerosos péptidos en distintos organismos sugiere que los NP biológicamente activos son elementos estables con una larga historia evolutiva. Sus orígenes parecen remontarse al momento en que los primeros sistemas nerviosos empezaron a formarse, o aún antes. Aparentemente, cuando no existían células endócrinas propiamente dichas, el SN tuvo a su cargo todas las funciones integrativas requeridas por el organismo. De hecho, en células nerviosas primitivas, las funciones endócrinas deben haber precedido a las actividades sinápticas, las cuales parecen haberse desarrollado después.

Se ha especulado que los péptidos activos de hoy provienen de precursores ancestrales proteínicos que, paso a paso, desarrollaron la capacidad de producir principios activos en una forma ejemplificada hoy en día por los mecanismos de biosíntesis a partir de pro-proteínas. A medida que la demanda en mensajes se hizo más

compleja, se seleccionaron secuencias que codificaban para péptidos con funciones fisiológicas específicas, las cuales evolucionaron concertadamente con sus moléculas receptoras. Parece razonable pensar que después de la aparición de un sistema endócrino propiamente dicho en organismos más avanzados, las células neurosecretoras pluripotenciales adquirieron un nuevo papel fisiológico, aunque su capacidad de comunicación directa con sus células efectoras terminales no se perdió. Es así como la célula neurosecretora es más bien un ancestro que un tipo celular "raro" y especializado. Parece tener más en común con la célula nerviosa precursora que con la neurona "convencional", con su especialización para la transmisión sináptica (Scharrer, 1987).

Los NP y sus receptores se han encontrado distribuidos en todas las regiones del cerebro, así como fuera de él (Lynch y Snyder, 1986; Scharrer, 1987). Un gran número de péptidos biológicamente activos, considerados tradicionalmente como hormonas del tracto gastrointestinal o como constituyentes de la piel, se han identificado también en neuronas periféricas y centrales (Pearse 1976; Hökfelt y col., 1980a), y viceversa. Un ejemplo de esto es la somatostatina, conocida inicialmente como una neurohormona hipofisiotrópica e identificada y caracterizada también en el páncreas y otros tejidos no neurales (Patel y Reichlin, 1978). Algunas hormonas digestivas (gastrina y colecistocinina [CCK] ) y adenohipofisiarias (adenocorticotropina [ACTH], hormona estimulante de melanotropina [ $\alpha$ -MSH] y  $\beta$ -lipotropina), se han identificado también en el cerebro. Ya que la piel y el tejido nervioso se originan a partir del ectodermo, podría existir un punto de enlace

entre los péptidos en el cerebro, la piel y los órganos enteropancreáticos (eje cerebro-piel-intestino) a través de su origen ectodérmico común (Vizi, 1984).

Los mapas de distribución de los NP muestran patrones distintivos de somas neuronales y de proyecciones axonales que contienen NP específicos. Ejemplos notables de esta organización los constituyen la disposición laminar precisa de distintos NP en el tectum óptico (Kuljis y Karten, 1982) y su localización en diferentes poblaciones en la retina, en particular en las células amacrinas (Brecha y Karten, 1983).

Probablemente, la observación más interesante sobre los NP es que algunos de ellos pueden existir en diferentes formas moleculares (Lynch y Snyder, 1986). Las encefalinas, péptidos opiáceos, fueron inicialmente caracterizadas como Leu-encefalina (Leu-enc) y Met-encefalina (Met-enc) (Hughes y col., 1975). Actualmente existen al menos 9 péptidos endógenos con actividad opiácea, todos ellos con la secuencia de las encefalinas en sus extremos amino terminales. La CCK se ha aislado en al menos 5 formas diferentes, todas ellas con la misma secuencia COOH terminal (Rehfeld, 1985). La angiotensina existe en al menos 3 (y probablemente 4) formas producidas por rupturas extracelulares a partir unas de otras (Ganten y col., 1984). Esto sugiere la existencia de familias de NP en el SNC.

¿ Porqué existen tantas formas diferentes de NP ? y ¿ cual es su significado fisiológico ? Una posibilidad es que cada forma lleve a cabo una función separada o interactúe con un subgrupo de receptores post-sinápticos. Otra posibilidad es que la estabilidad de cada una de estas formas sea diferente. En el caso de NT-clásicos, se conocen

varios subtipos de receptores para el mismo NT (2 para acetilcolina, 4 para hormonas adrenérgicas). Los distintos tipos de receptores parecen seleccionar diferencialmente varios ligandos. Este parece ser también el caso para los NP. Por ejemplo, se han caracterizado al menos 4 tipos para opiáceos y 2 para taquininas. Así, las múltiples formas de NP correlacionan con receptores múltiples (White y col., 1985; Lynch y Snyder, 1986); la distribución de estos últimos en el SNC es también diferencial (Lynch y Snyder, 1986).

¿ Cuáles son las funciones de los NP ? Algunos parecen ligarse a funciones determinadas, mientras que otros no. En general, los NP juegan papeles similares en el SNC y en el SNP. Esto resulta de gran importancia cuando se consideran aspectos de uso terapéutico. Muchos NP comparten un gran número de características, así como vías de síntesis e inactivación. Queda por determinar si existen diferencias relacionadas a las enzimas tejido y péptido específicas en la síntesis y degradación de los mismos.

Un punto importante es el hecho de las interacciones que existen entre los centros neurales peptidérgicos con dos sistemas regulatorios. Uno de ellos es el sistema inmune (Goetzl, 1985), el cual comparte con las estructuras neuroendócrinas un grupo de sustancias regulatorias, que incluyen a la ACTH, la hormona liberadora de tirotropina (TRH) y las endorfinas, así como sus receptores correspondientes (Blalock y col., 1985 a, b). La comunicación neuroinmunológica es bidireccional. Numerosos estudios indican que las funciones inmunes están sujetas a regulación neuroendócrina (por ejemplo, la susceptibilidad al "stress"). También existen evidencias que indican que las señales de algunos agentes inmunomoduladores alcanzan el SN y proporcionan parte de la

información registrada y procesada por el sistema regulatorio endócrino.

El segundo de ellos es el sistema endócrino, cuyos mensajeros químicos (hormonas protéicas y peptídicas y esteroides) pueden regular también la actividad neuronal, así como intervenir en la homeostasis del organismo. Por ejemplo, la vasopresina y el péptido atrial natriurético participan en el balance de fluidos y electrolitos (Scharrer, 1987).

Excepto por los dipéptidos carnosina ( $\alpha$ -Ala-His) y N-acetil-aspartil-glutamato, virtualmente todos los péptidos bioactivos, igual que otras proteínas manufacturadas por la célula, se originan a partir de precursores de alto peso molecular sintetizados por vía ribosomal (Herbert y Uhler, 1982; White y col., 1985; Lynch y Snyder, 1986; Scharrer, 1987). La caracterización inicial de los precursores protéicos de los NP se hizo con la insulina en los islotes pancreáticos (Nolan y col., 1971), momento a partir del cual se empezó a estudiar la biosíntesis de otros NP y hormonas. Ejemplos de tales moléculas precursoras son la pro-opiomelanocortina (POMC), que contiene las secuencias de ACTH,  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -endorfina y  $\beta$ -lipotropina; la pro-encefalina, que contiene múltiples copias de Met-enc y Leu-enc; y las pro-presofisinas, que contienen las secuencias de vasopresina u oxitocina y sus respectivas neurofisinas (Fig. 2).

La biogénesis de los NP involucra la síntesis del precursor polipeptídico de alto peso molecular, a partir del cual se origina el péptido activo maduro. Bajo condiciones ambientales y hormonales apropiadas, el gene que codifica para determinado péptido se

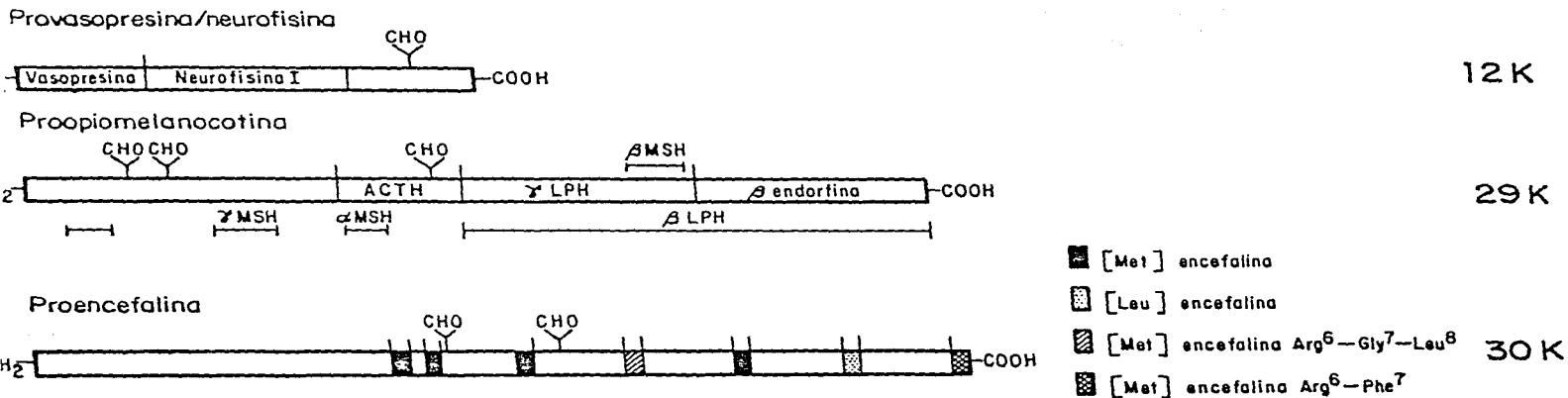


Fig. 2.- Precusores protéicos de algunos neuropéptidos  
(Tomado parcialmente de Steiner y col. 1983).

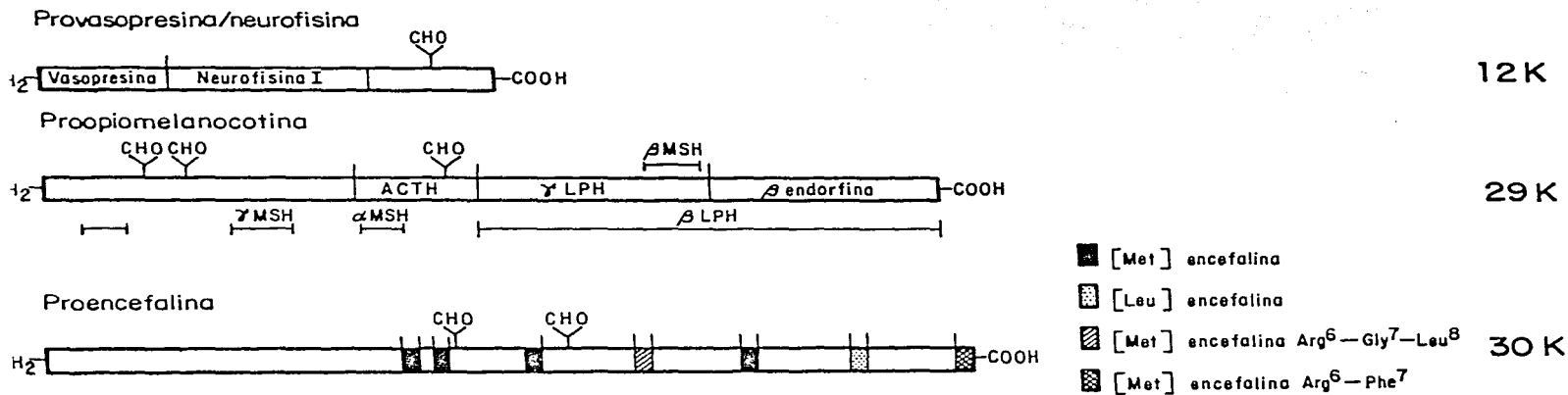
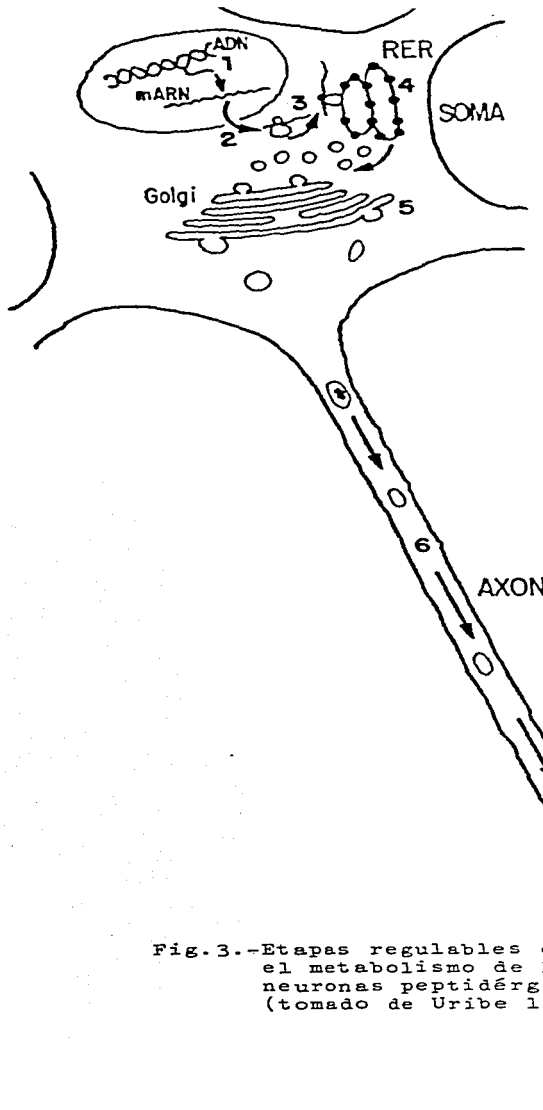


Fig. 2.- Precursores protéicos de algunos neuropéptidos (Tomado parcialmente de Steiner y col. 1983).

transcribe a RNAm, el cual es traducido a proteínas. La pre-proteína inactiva (pre-pro-proteína) puede sufrir modificaciones co-traduccionales y/o post-traduccionales que son tejido-específicas, para producir el péptido maduro. La mayoría de los péptidos biológicamente activos están flanqueados en el precursor por pares de aminoácidos básicos. La acción secuencial de una enzima tipo tripsina y de una tipo carboxipeptidasa B (Docherty y Steiner, 1982; Fricker y Snyder, 1983; Lynch y Snyder, 1986) produce el péptido activo. Además, algunas evidencias apoyan la existencia de una actividad tipo kalicreína que actúa sobre residuos individuales de arginina (Weber y col., 1982) y de actividades de metaloendopeptidasas, que pueden actuar concertadamente en la generación de NP activos. Además, los precursores pueden sufrir otras modificaciones, tales como la adición covalente de algunos grupos químicos, como glicosilación, acetilación, sulfatación, fosforilación, así como la generación de extremos NH<sub>2</sub> y COOH terminales bloqueados, reacciones que se llevan a cabo a través de la formación de residuos piroglutamil en el extremo NH<sub>2</sub> por la acción de una glutaminil ciclasa, y la formación de extremos COOH terminales amidados por la acción de una peptidil monooxigenasa  $\alpha$ -amidante (PAM) (Eipper y Mains, 1988; Jackson, 1989). Tales modificaciones ocurren en distintos compartimentos celulares, desde el retículo endoplásmico rugoso (RER) y el Golgi hasta los gránulos o vesículas de almacenamiento, los cuales son transportados axonalmente hasta la terminal nerviosa (Fig. 3).

Algunas de estas modificaciones representan puntos de regulación de la actividad de los "NP" generados. Por ejemplo, la N-acetilación de la tirosina NH<sub>2</sub> terminal de la  $\beta$ -endorfina suprime la actividad





- 1- Transcripción y Procesamiento del ARNm
- 2- Transporte del ARNm del Núcleo al Citoplasma
- 3- Traducción
- 4- Procesamiento del Pre-propéptido en el Retículo endoplásmico rugoso
- 5- Modificaciones postraduccionales e inicio del procesamiento del propéptido en aparato de Golgi
- 6- Transporte y Procesamiento del propéptido
- 7- Almacenamiento del péptido activo

Fig.3.-Etapas regulables en el metabolismo de las neuronas peptidérgicas (tomado de Uribe 1988).



de este péptido sobre receptores a opiáceos (Smyth y col., 1979), mientras que la misma reacción sobre la  $\alpha$ -MSH aumenta la potencia de este mediador (O'Donohue y col., 1981). La eliminación de la tirosina NH<sub>2</sub> terminal de la  $\beta$ -endorfina por una aminopeptidasa cambia la actividad de un péptido opiáceo a otro con una actividad biológica no reversible por naloxona (Hersh y col., 1980).

Por otra parte, por estudios de inmunocitoquímica se ha mostrado que los precursores se encuentran en los somas neuronales, y en algunos casos también en los axones y terminales nerviosas, mientras que los NP maduros se localizan fundamentalmente en los axones y terminales (Pickel, 1985; White y col., 1985), y dentro de éstas en gránulos de secreción y vesículas grandes de centro denso (70-100 nm) (Hökfelt y col., 1980a; Pickel, 1985).

La generación de péptidos maduros a partir de sus precursores puede ocurrir en forma diferencial y específica, de manera que del mismo precursor pueden derivarse varios NP con funciones distintas, dependiendo del tejido. Por ejemplo, el procesamiento de POMC difiere en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis, y varía también en el cerebro (Herbert y Uhler, 1982). Por lo tanto, se piensa que las enzimas procesadoras representan uno de los puntos de regulación de la biosíntesis de NP. Por otro lado, parte del procesamiento de los precursores puede tener lugar una vez que han sido empaquetados en los gránulos de secreción durante el transporte axonal (Brownstein y col., 1980), como se ha demostrado en el caso de vasopresina y oxitocina y sus neurofisinas asociadas (Gainer y col., 1985) y POMC (Chang y col., 1982; Chang y Loh, 1983).

Cada vez existen más evidencias sobre la coexistencia de dos o más mediadores químicos en la misma neurona (Chan-Palay y col., 1978; Chan-Palay y Palay, 1984; Hökfelt y col., 1980b, 1984). Este principio se aplica no sólo a la co-localización de diferentes NP, sino también a la de péptidos y NT clásicos. La presencia de ACTH,  $\alpha$ -MSH y  $\beta$ -endorfina en las mismas neuronas (y aún en los mismos gránulos de secreción) del núcleo arcuato del hipotálamo, puede explicarse en términos de su origen a partir del mismo precursor. El hecho de que en células endócrinas, como las adenohipofisiarias, se presente una combinación similar de NP, es un ejemplo de que estos mediadores químicos son comunes en muchas áreas del SN. La forma como operan estos múltiples mediadores después de ser liberados es aún desconocida.

Menos clara aún es la función de los NP co-localizados con NT clásicos. El número de neuronas que contiene combinaciones tales como catecolaminas y encefalinas, serotonina, sustancia P y TRH, acetilcolina y péptido vasoactivo intestinal (VIP), es cada vez mayor del que se pensó originalmente. Se ha especulado que en esta situación, los neuromediadores convencionales funcionan como NT primarios, mientras que los NP pueden modificar dicha transmisión y funcionar, por lo tanto, como co-transmisores. Sin embargo, aunque esto no ha sido aún demostrado, estos casos de co-localización contribuyen a pensar que los NP constituyen un grupo muy importante de mensajeros químicos en el SN.

El estudio de la liberación de NP ha sido una tarea difícil debido a varios factores (Iversen y col., 1980). Primero, en tejido nervioso existen cantidades muy pequeñas de estas moléculas

(alrededor de 1000 veces menos que de catecolaminas). El advenimiento de técnicas más sensibles como el radioinmunoensayo (RIA), ha permitido resolver este problema. Segundo, los NP son degradados fácilmente (ver más adelante). Tercero, ha llevado cierto tiempo escoger la preparación adecuada. En este sentido, las rebanadas o fragmentos de tejido han mostrado ser más útiles que los sinaptosomas, ya que de esta manera se preserva la integridad de las células y también debido a que en sinaptosomas las tasas de liberación basal son usualmente mucho más altas, por lo cual es difícil detectar pequeñas cantidades liberadas en respuesta a una estimulación sobre la basal.

Los mecanismos de liberación de los NP son semejantes a los fenómenos de acoplamiento estímulo-secreción que existen en las neuronas que liberan NT clásicos o en otras células secretoras (Iversen y col., 1980; Scharrer, 1987; Augustine y col., 1987). La liberación de NP de la terminal nerviosa parece ocurrir por un proceso de exocitosis, el cual es desencadenado por un influjo de  $Ca^{2+}$  externo al interior de la célula (Di Polo y Beauge, 1983), a través de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, evento que sigue a la depolarización de la terminal axónica, y que probablemente involucra la interacción de  $Ca^{2+}$  con calmodulina y/o proteína cinasas específicas (Thorn y col., 1985). La siguiente etapa del proceso es aún desconocida. La única diferencia aparente parece ser el curso temporal más lento de la transmisión peptidérgica con respecto a la de NT clásicos, tiempo que es requerido por los diferentes mecanismos de inactivación de los mediadores peptídicos (ver más adelante).

Ya que la liberación de NT clásicos es exquisitamente sensible a la cantidad de  $Ca^{2+}$  que entra a la terminal pre-sináptica (Augustine y col., 1985), cualquier modulación de la corriente del canal de  $Ca^{2+}$  pre-sináptico tendrá efectos sobre la transmisión sináptica. Aunque las evidencias que apoyan la acción de NT u hormonas sobre los canales pre-sinápticos de  $Ca^{2+}$  están incompletas, tales acciones son probablemente un mecanismo regulatorio importante en el SN (Klein y col., 1980). La modulación de la cantidad de NT liberado de la terminal pre-sináptica por mecanismos regulatorios locales que involucra receptores específicos localizados pre-sinápticamente, ha sido estudiada primordialmente en neuronas adrenérgicas. La noradrenalina puede inhibir su propia liberación actuando sobre receptores pre-sinápticos tipo  $\alpha$  (autoreceptores). Además, la liberación de este NT puede ser estimulada o inhibida por la activación de receptores pre-sinápticos que responden a acetilcolina, dopamina, agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, angiotensina II, prostaglandinas y opiáceos. La búsqueda de mecanismos regulatorios pre-sinápticos similares en neuronas peptidérgicas, ha revelado que éstos operan en forma semejante para modificar la liberación de varios NP de terminales nerviosas en el SNC (Iversen y col., 1980).

El descubrimiento a la fecha de más de 100 NP en neuronas en el SNC de mamíferos ha revolucionado el pensamiento sobre la naturaleza de la neurotransmisión en el mismo. Si cada uno de los NP funciona como un NT, éstos sobrepasan ampliamente en número a los NT clásicos. La evidencia de que, por ejemplo, la sustancia P, las encefalinas y otros NP pueden liberarse de neuronas por un mecanismo

dependiente de Ca<sup>2+</sup>, apoya este punto de vista. El descubrimiento de que algunos NP, notablemente las endorfinas, pueden actuar modificando y controlando la liberación de otros péptidos (substancia P, vasopresina y oxitocina) (Iversen y col., 1980) o monoaminas, también sugiere que en el SNC tienen lugar muchas otras interacciones entre distintos péptidos y entre éstos y NT clásicos.

La acción de los neuromediadores ocurre a través de la interacción de éstos con receptores protéicos específicos localizados en la membrana plasmática de la célula blanco. Para otros mensajeros como las hormonas tiroideas y los esteroides, existen además receptores intracelulares citoplásmicos y/o nucleares (Alberts y col., 1983; Snyder, 1985). El neuromediador puede llegar a su receptor vía la circulación, o difundirse en la vecindad de la célula que lo secretó para actuar sobre la misma célula (acción autócrina) o en una célula vecina (acción parácrina), o bien liberarse en una sinapsis, como ocurre con los NT clásicos (Fig. 1). Ya que existen diferentes tipos de receptores para el mismo mediador químico, la respuesta celular generada dependerá del tipo de receptor que exista en un tejido en particular, así como del mecanismo de transducción del mensaje al que esté acoplado dicho receptor (Berridge, 1980). Dichos mecanismos de transducción generan una gran variedad de segundos mensajeros (AMPC, GMPc, Ca<sup>2+</sup>, diacilglicerol, inositol trifosfato) (Berridge e Irvine, 1984; Berridge, 1985; Augustine y col., 1987), los cuales desencadenan reacciones en cascada que culminan en la respuesta celular correspondiente (Berridge, 1986). Los mecanismos intracelulares de la respuesta no se conocen bien, pero se han implicado distintas

tasa de síntesis. En cuanto a los mecanismos extracelulares, se sabe que las señales transmitidas por los NT clásicos son rápidamente apagadas al ser eliminados del espacio sináptico por procesos de transporte activo o por degradación del NT (Moore, 1971). En el caso de los NP, deben existir también mecanismos que determinen sus niveles extracelulares antes o después de haber actuado sobre sus receptores. Dichos mecanismos harían posible registrar la llegada de una nueva señal a la proximidad de los receptores y, por lo tanto, el que la célula blanco fuera capaz de responder al nuevo estímulo, o bien, servir para eliminar NP presentes en el líquido extracelular una vez lejos de su sitio de acción.

Conocer estos mecanismos es fundamental para entender el funcionamiento del SN, en particular porque esto permitiría diseñar drogas para uso terapéutico en algunos de los desórdenes mentales que se presentan en el hombre, tal como se ha hecho en el caso de las monoaminas (Moore, 1971; Solow, 1971). Sin embargo, aunque este es un aspecto importante en el campo de las Neurociencias, y aunque se conocen algunos de los efectos de muchos de los NP, los mecanismos que regulan su concentración en las terminales nerviosas y en el espacio sináptico y otros espacios extracelulares, no se conocen con certeza.

Surgen así dos preguntas fundamentales : 1) ¿ existen mecanismos intracelulares de inactivación que determinen los niveles de éstos en las terminales nerviosas ?, y 2) ¿ una vez que los NP son liberados al espacio sináptico o a otros espacios extracelulares, son eliminados por simple difusión, o bien, existen mecanismos más eficientes que los inactiven ?

moléculas receptoras de  $Ca^{2+}$ , tales como fosfolípidos, proteínas citosólicas que unen  $Ca^{2+}$  (calmodulina, troponina C, etc) o asociadas a vesículas (calmodulina, calelectrina, sinexina, caldermosima, proteína cinasa C), canales de  $K^{+}$  dependientes de  $Ca^{2+}$ , así como una gran variedad de proteínas contráctiles asociadas a citoesqueleto (actina, tubulina, etc). Para una revisión exhaustiva sobre el tema, ver Augustine y col. (1987) y Berridge (1980, 1985, 1986). Asimismo, una gran variedad de proteína cinasas puede estar implicada en el proceso (Alberts y col., 1983; Snyder, 1985; Berridge, 1985; Augustine y col., 1987).

Una vez que los mediadores químicos se liberan para interactuar con sus receptores específicos y desencadenar la respuesta, la acción de éstos debe ser terminada por un mecanismo eficiente que los inactive o los elimine del espacio sináptico, de manera que la célula pueda responder nuevamente cuando se presenta otro estímulo. Se revisan a continuación dichos mecanismos de inactivación.

## II.- Mecanismos de inactivación de los neuropéptidos.

Los mecanismos de inactivación de los NP pueden llevarse a cabo a 3 niveles : a) intracelularmente, antes o durante el proceso de liberación, b) en el medio extracelular, antes de que entre en contacto con su receptor, y c) después de que haya ejercido su actividad biológica.

Los mecanismos que se llevan a cabo intracelularmente podrían estar implicados en el ajuste de los niveles de péptido requerido en determinadas condiciones fisiológicas, en las cuales es imposible afectar los niveles del péptido liberable a través de cambios en su



Sin duda alguna, la biosíntesis de novo es uno de los mecanismos que determina los niveles intra-terminales. Sin embargo, éste es un proceso que se lleva a cabo en un periodo de tiempo relativamente largo, puesto que implica la síntesis y el empaquetamiento en gránulos de secreción y el transporte de éstos desde el soma hasta la terminal nerviosa. Por lo tanto, es lógico pensar que además existan otros mecanismos encargados de mantener determinados niveles de péptido, cuyos ajustes sean difíciles de regular desde el soma. Se antoja factible entonces que uno de estos mecanismos se lleve a cabo a través de variaciones en la tasa de inactivación intra-terminal del NP. Otro de los mecanismos podría estar relacionado a influencias axónicas que modifiquen la secreción de NP, así como la actividad misma de la neurona, o bien, a través de transporte retrógrado, de tal manera que se modifique el tamaño de las pozas de NP disponibles para liberarse.

En cuanto a los mecanismos extracelulares de inactivación, se proponen las siguientes opciones: 1) difusión y arrastre por el solvente, 2) internalización del complejo receptor-neuropéptido por endocitosis mediada por receptores, 3) modificación covalente del NP liberado, 4) captura del NP liberado por la célula pre- o post-sináptica o por células gliales vecinas, y 5) hidrólisis de enlaces peptídicos (degradación enzimática) (Fig. 4). Se sugiere que uno o varios de estos mecanismos podrían ser responsables de la inactivación de los NP. Se revisan a continuación algunos aspectos fundamentales.

#### 1) Difusión.

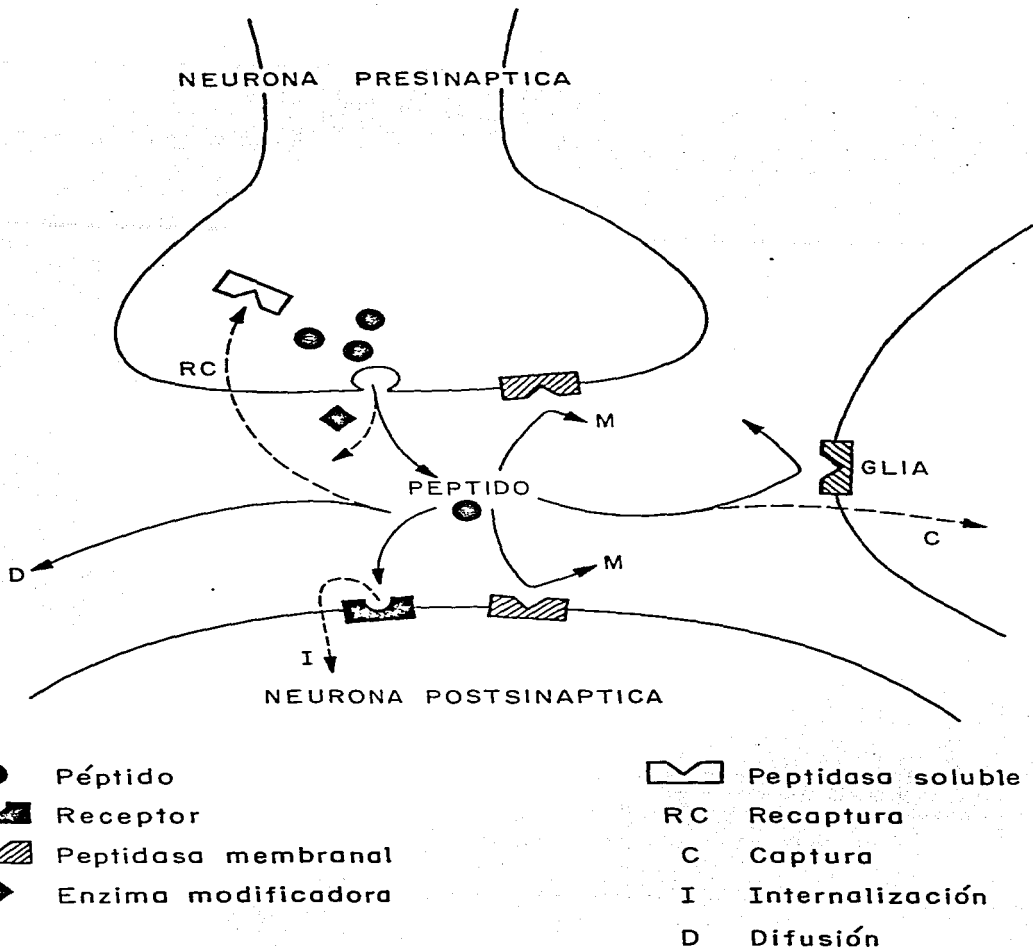


Fig. 4.- Mecanismo de inactivación de los neuropéptidos en sinapsis. (tomado de Méndez y col., en prensa)

En algunos casos se ha postulado que no es necesaria la existencia de un mecanismo adicional a la difusión para inactivar a los péptidos, debido a la prolongada respuesta que desencadenan en la célula blanco (Jan y Jan, 1983). Por otra parte, la acción de los NP a nivel de células irrigadas por el flujo sanguíneo o en contacto con otro fluido biológico podría simplemente ser terminada por arrastre por solvente.

## 2) Internalización.

Una vez que las hormonas polipeptídicas se unen a su receptor formándose el complejo hormona-receptor, éste puede entrar a la célula por un proceso llamado endocitosis mediada por receptores, que consiste en la internalización del complejo en vesículas de endocitosis. Una vez dentro de la célula blanco, el destino del receptor y de la hormona puede ser variable (degradación o recambio).

El fenómeno de internalización ha sido muy poco estudiado en el SNC y existen muy pocos reportes al respecto. En la adenohipófisis, Morel y col. (1985) han observado por inmunocitoquímica que TRH administrado exógenamente es internalizado en los tirotropos y en los lactotropos, y que el péptido se localiza intracelularmente en distintos compartimentos subcelulares. Los mismos resultados se han observado por medio de técnicas de fraccionamiento subcelular en células GH<sub>3</sub> (línea tumoral de células adenohipofisiarias que sintetizan y secretan prolactina) (Brunet y col., 1974). También se ha demostrado que una fracción de TRH internalizada es rápidamente liberada de células adenohipofisiarias. Asimismo, Duello y col. (1983) han mostrado que un agonista de la hormona liberadora de la

hormona luteinizante (LHRH) es internalizado en gonadotropos de rata y que éste se distribuye posteriormente en diversos compartimentos subcelulares.

Por lo tanto, existen algunas evidencias que apoyan la hipótesis de que algunos NP son internalizados en sus células blanco por un mecanismo de endocitosis vía receptores. Tal mecanismo pudiera corresponder a los fenómenos de acumulación que se han descrito en el cerebro (ver más adelante).

### 3) Modificación covalente.

Existe la posibilidad de que los NP liberados al espacio sináptico sean modificados covalentemente, de manera que se generen péptidos activos o inactivos. Dicha modificación puede ocurrir en el espacio extracelular o bien durante o inmediatamente antes de la liberación del péptido. Una de estas modificaciones es la acetilación. Por ejemplo, la  $\alpha$ -MSH liberada de la pars intermedia de la hipófisis de rana es la forma acetilada del péptido; esta modificación podría tener lugar durante la liberación o justo antes de que ésta ocurra (Martens y col., 1981). Esta hipótesis es apoyada por la existencia de dos actividades de acetiltransferasa en tejido nervioso (Chappell y col., 1982; O'Donohue y Chappell, 1982; O'Donohue, 1983; Gibson y Glembotski, 1985).

Esta modificación pudiera estar involucrada en el mecanismo de regulación de la actividad biológica de ciertos péptidos, activándolos o inactivándolos, ya que se ha observado que, por ejemplo, la forma acetilada de  $\alpha$ -MSH es más potente que la desacetilada, mientras que la acetilación de la  $\beta$ -endorfina inhibe su actividad biológica (Smyth y col., 1979; O'Donohue y col., 1981).

Finalmente, queda por determinar si estas modificaciones están ligadas al proceso de liberación, si es un fenómeno generalizado a otros NP y si se presentan en diversas áreas del SNC para postularlas como un mecanismo fisiológico de inactivación.

#### 4) Captura.

Los NP liberados al espacio sináptico pueden ser recaptados por la misma terminal nerviosa que los liberó, o bien, pueden ser captados por la neurona post-sináptica o por células gliales vecinas. En el caso de algunos NT clásicos este proceso ocurre por un sistema de transporte activo dependiente de energía y temperatura.

Actualmente existen pocas evidencias que apoyen la hipótesis de que la captura representa un mecanismo de inactivación fisiológico de NP. Sólo se ha podido demostrar inequívocamente la existencia de este fenómeno en el caso del dipéptido carnosina (Abraham y col., 1954). Para el resto de los NP estudiados, las evidencias sobre la existencia de tal proceso son poco convincentes. En el caso del TRH se ha mostrado la presencia de un mecanismo de acumulación por rebanadas de cerebelo (Pacheco y col., 1981) y de hipotálamo (Charli y col., 1984) y los resultados obtenidos en presencia de inhibidores metabólicos y del transporte de sodio indican que se trata de un sistema de transporte activo con una  $K_m$  de 1 a 10  $\mu M$ . Sin embargo, en el hipotálamo la  $V_{max}$  del fenómeno es muy baja, y la relación del péptido acumulado en el tejido con respecto al presente en el medio es muy pequeña. Por lo tanto, se sugiere que la recaptura de TRH no es el mecanismo fisiológico de inactivación de este péptido. En estos sistemas no se conoce cual es el sitio de acumulación, si

neuronal o glial. Sin embargo, Parker y col. (1977) y Torres y col (1986) han mostrado que sinaptosomas de cerebro no son capaces de captar <sup>3</sup>H-TRH. Por lo tanto, el TRH pudiera ser acumulado por otras células blanco.

Otros autores han observado que existe un mecanismo de acumulación de un producto de degradación de la sustancia P (el fragmento 5-11), generado por la acción de una peptidasa, la proil endopeptidasa (Nakata y col., 1981), y de las encefalinas (George y van Loon, 1981; La Bella y col., 1986). Sin embargo, en el caso de la sustancia P éste no es el mecanismo primario de inactivación, y en el de las encefalinas los resultados son ambiguos, ya que los autores no proporcionan datos sobre los valores de Km y Vmax del fenómeno (George y van Loon, 1981).

Las evidencias en conjunto sugieren que, si existe la recaptura, éste no es un mecanismo generalizado de inactivación de NP sintetizados por vía ribosomal.

##### 5) Degradación enzimática.

Dada la labilidad de los NP a hidrólisis enzimática in vitro, se considera que éste podría ser el mecanismo fundamental de inactivación. La mayor parte de la información con la que se cuenta actualmente proviene de estudios hechos con TRH, encefalinas, neurotensina, sustancia P y angiotensina.

Aunque en la sangre, el cerebro y otros tejidos de mamíferos se ha identificado un gran número de peptidasas capaces de degradar in vitro a muchos NP, es probable que un número relativamente limitado de ellas sea fisiológicamente importante (Lynch y Snyder, 1986). Cada una de estas peptidasas tiene especificidad por un número

limitado de enlaces peptídicos y se ha mostrado que la mayoría de ellas tiene varios sustratos naturales y sintéticos in vitro. Así, para cada NP existen varios enlaces que pueden ser hidrolizados por varias peptidasas. Los cortes de enlaces peptídicos pueden llevarse a cabo por enzimas solubles (presentes en el espacio extracelular o en compartimentos intracelulares como el citosol, el lumen del RE o de gránulos de secreción, etc) o por enzimas presentes sobre membranas celulares (plasmática, mitocondrial, etc).

#### A.- Mecanismos intracelulares de inactivación.

En algunos tipos celulares, las proteínas destinadas a ser secretadas se degradan intracelularmente por ~~mecanismos de~~ crinofagia, esto es, la fusión de gránulos de secreción con lisosomas y la destrucción de su contenido (Farquhar, 1977). Sin embargo, no existen evidencias de que tal mecanismo sea responsable de degradar intracelularmente a los NP en el SN. La otra posibilidad es que enzimas activas a pH neutro sean las responsables, y se ha sugerido que algunas peptidasas solubles podrían llevar a cabo esta función (Fig. 5). Por lo general, la actividad de estas enzimas es muy alta en la fracción soluble citosólica, mientras que en las terminales nerviosas es muy baja (Hui y col., 1981; White y col., 1985; Torres y col., 1986). Esto significa que la distribución subcelular de estas enzimas no coincide con la de los NP, ya que sólo un 5-10% de la actividad total enzimática se localiza en el sinaptoplasma (Torres y col., 1986), mientras que la concentración del péptido en esta fracción es mayor del 50% del contenido total (Winokur y col., 1977). Estas enzimas están ampliamente distribuidas en diferentes tejidos del organismo (Wilk, 1983; Prasad, 1985). En

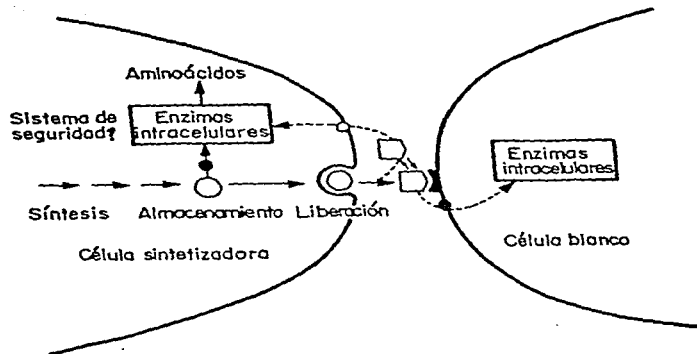


Fig. 5.- Degradación de los neuropeptidos por enzimas intracelulares.  $\circ$  = elementos de control regulatorio. (Tomado de Bauer 1987a).



el cerebro, su distribución regional es homogénea (Prasad, 1985) y están presentes tanto en glía como en neuronas (Koshiya y col., 1984, 1985; Cruz y col., no publicado). Ejemplos de estas peptidasas son la piroglutamato aminopeptidasa I (PGA<sub>I</sub>), que elimina el residuo pGlu en el extremo NH<sub>2</sub> terminal de muchos péptidos, la prolilendopeptidasa (PE), que hidroliza enlaces peptídicos con estructura péptido-pro-X (X = cualquier péptido o aminoácido, excepto prolina) de una gran variedad de péptidos, y una aminopeptidasa soluble sensible a puromicina que hidroliza el enlace <sup>1</sup> - <sup>2</sup> tir -gli de las encefalinas (Fig. 6) (Schwartz y col., 1981; McKelvy y col., 1982; Busby y col., 1982; Bauer, 1983; White y col., 1985). Si bien estas enzimas son específicas para un enlace peptídico, no lo son para un péptido determinado.

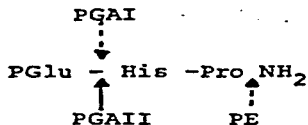
Las propiedades de las enzimas solubles sugieren que no tienen un papel específicamente asociado a la degradación extracelular de los NP. Más bien, se piensa que uno de sus papeles sea el de degradar intracelularmente a algunos NP.

#### B.- Mecanismos extracelulares de inactivación.

Las evidencias actuales postulan a algunas peptidasas asociadas a membranas como candidatos para la inactivación extracelular de los NP (White y col., 1985; Turner, 1986, 1987, 1988) (Fig. 7).

La identificación de una "neuropeptidasa" fisiológicamente relevante, esto es, una enzima que sea responsable de la inactivación de NP liberados sinápticamente, es una tarea difícil, ya que un NP generalmente es sustrato de diferentes peptidasas en tejido nervioso y, por lo tanto, una peptidasa determinada, que generalmente muestra especificidad química por un cierto tipo de

A: Vía metabólica del TRH



TIROLIBERINASA

PGAI: PIROGLUTAMATO AMINOPEPTIDASA SOLUBLE

PGAII: PIROGLUTAMATO AMINOPEPTIDASA MEMBRANAL

TIROLIBERINASA: PIROGLUTAMATO AMINOPEPTIDASA SERICA

PE: PROLINA ENDOPEPTIDASA SOLUBLE

B: Vía metabólica de encefalinas

aminopeptidasa (soluble)

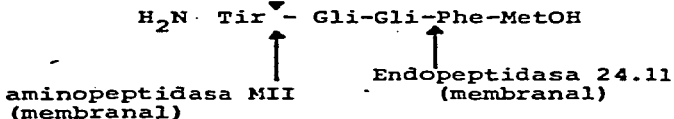


Fig 6.- Vía metabólica del TRH y las encefalinas.  
 Las flechas continuas indican los cortes que probablemente tienen lugar in vivo.  
 (tomado de Méndez y col., en prensa).

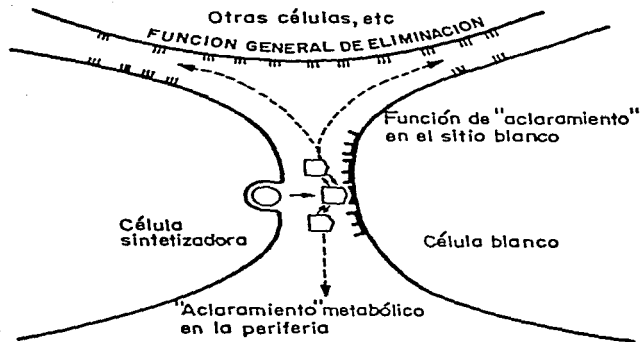


Fig. 7.- Degradación de los neuropéptidos por ectoenzimas.  
(Tomado de Bauer 1987a).

enlaces peptídicos, es capaz de hidrolizar diferentes péptidos endógenos. ¿Cómo identificar entonces sin ambigüedad a las enzimas relevantes? Con este propósito, Schwartz y col. (1981) han definido ciertos criterios:

- 1.- Los productos de hidrólisis deben ser biológicamente inactivos.
- 2.- La enzima debe estar localizada estratégicamente para hidrolizar a los NP liberados al espacio sináptico.
- 3.- La especificidad de sustratos explica la actividad biológica aumentada de análogos sintéticos.
- ~~4.- La actividad de la enzima debe exhibir cambios adaptativos a una neurotransmisión modificada.~~
- 5.- La inhibición selectiva de la enzima protege a los NP liberados sinápticamente.
- 6.- La inhibición de la enzima reproduce las acciones biológicas de los NP al interactuar con sus receptores.

Algunas peptidasas cumplen con alguno o varios de estos criterios. La aminopeptidasa MII y la endopeptidasa 24.11 (llamada anteriormente "encefalinas") pueden degradar a las encefalinas (Fig. 6) (Schwartz y col., 1981; White y col., 1985; Hersh, 1985), y la acción de ambas enzimas inactiva totalmente a estos NP (Turner, 1987, 1988). Su distribución en el cerebro correlaciona, aunque no estrictamente, con la distribución de las encefalinas y la de sus receptores (Hersh, 1985; Waksman y col., 1986b). A nivel celular ambas enzimas son neuronales (Hazum y col., 1979; Back y Gorenstein, 1985; Waksman y col., 1986a) y a nivel subcelular se encuentran en la membrana plasmática de sinaptosomas (Horsthemke y col., 1984) como ectoenzimas (Hazum y col., 1979; Turner, 1988) (Fig. 8), es

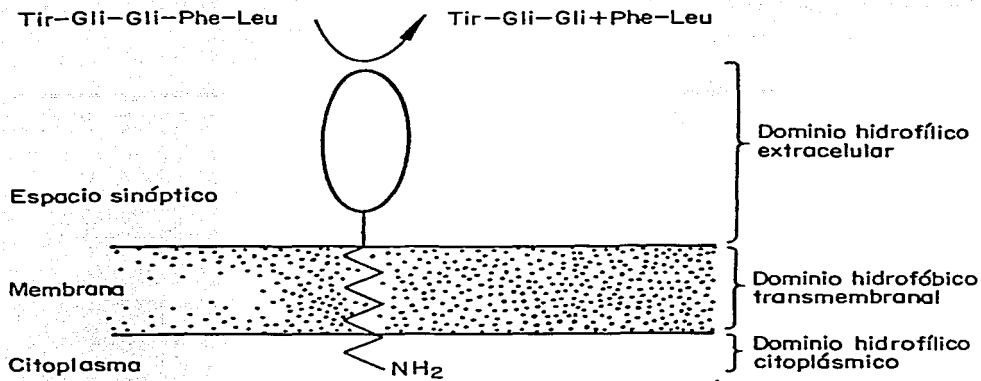


Fig. 8.- Organización topológica de la endopeptidasa 24.11 en la membrana plasmática como ectoenzima. El modelo ilustra la degradación de leu-encefalina. (Tomado de Turner, 1988).

decir, que su sitio activo está del lado externo de la membrana plasmática, sitio desde el que podrían degradar inmediatamente a las encefalinas liberadas al espacio sináptico.

Un derivado de las encefalinas (FK-33-824 : D-Ala<sup>2</sup>, MePhe<sup>4</sup>, Met-<sup>5</sup>O-ol)-encefalina) se une al receptor con una potencia 10 veces mayor a la de Met-enc, produciendo una actividad analgésica 30 000 veces mayor a la producida por las encefalinas, y es 420 veces más resistente a la degradación por la endopeptidasa 24.11 (Schwartz y col., 1981). Además, esta enzima muestra específicamente cambios adaptativos a morfina (Malfroy y col., 1978).

El uso combinado de inhibidores de la aminopeptidasa MII y de la endopeptidasa 24.11 produce una recuperación total de encefalinas liberadas al medio extracelular en condiciones depolarizantes (De la Baume y col., 1982; Turner, 1986). La inhibición específica de la endopeptidasa 24.11 aumenta además la recuperación de sustancia P (Littlewood y col., 1988) y de CCK (Rose y col., 1989) en otros sistemas, por lo que probablemente la enzima actúe sobre distintos sustratos dependiendo de la región.

Finalmente, la inhibición específica de la endopeptidasa 24.11 por tiorfano produce un efecto antinociceptivo sensible a naloxona (Roques y col., 1980), y la infusión in vivo de un inhibidor específico de la enzima aumenta la frecuencia de disparo espontáneo de un grupo de células en la sustancia nigra, respuesta que podría ser modulada por las taquininas y/o las encefalinas (Bier y col., 1987).

Si bien estas enzimas membranales cumplen con los criterios para definir una "neuropeptidasa", éstas no apoyan el concepto propuesto

inicialmente de una "neuropeptidasa" específica capaz de degradar un NP en particular (Schwartz y col., 1981), ya que se ha demostrado que in vivo pueden degradar varios NP. Actualmente, existe sólo una excepción a esta premisa : una piroglutamato aminopeptidasa capaz de degradar exclusivamente al TRH, que se encuentra en suero (Bauer, 1983; Friedman y Wilk, 1985) y en membranas sinaptosomales (O'Connor y O'Cuinn, 1984; Garat y col., 1985; Torres y col., 1986; Wilk, 1986; Wilk y Wilk, 1989), de la cual se hablará en la siguiente sección.

Por último, existe la posibilidad de que las peptidasas solubles participen en la inactivación extracelular de los NP si éstas se liberan al espacio sináptico junto con los NP. La liberación de enzimas capaces de inactivar NT ya se ha demostrado. La liberación de acetilcolinesterasa de la glándula adrenal (Chubb y Smith, 1975a, b) es el primero de estos casos. Esta enzima también es secretada de neuronas en el SNC al fluido cerebroespinal, por lo que se piensa que este fenómeno podría ser frecuente en el SN. Por otra parte, una de las formas de aminopeptidasas solubles que degradan a las encefalinas se libera in vivo en respuesta a estimulación (Greenfield y Shaw, 1982). Sin embargo, no se ha podido demostrar que esta peptidasa sea la responsable de la inactivación fisiológica de las encefalinas.

Surge entonces la pregunta acerca de si las proteínas que se secretan de neuronas tienen funciones extracelulares, es decir, si tienen un papel en la modulación de la neurotransmisión, además de inactivar sustancias neuroactivas. Se especula sobre la posibilidad de que algunas de estas moléculas puedan tener un papel en el cambio

de sensibilidad de las neuronas a determinadas señales. Sin embargo, para péptidos no hay evidencias fuertes (Greenfield, 1986).

En resumen, el punto de vista actual postula que la inactivación extracelular de los NP se lleva a cabo por un número limitado de peptidasas con especificidades por una diversidad de NP. Según esta hipótesis, lo que determina la acción de una peptidasa no es que sea específica para un determinado NP, sino más bien, que su localización celular y subcelular y sus propiedades catalíticas sean las apropiadas para actuar sobre el NP (Kenny, 1986).

### III.- TRH como modelo de estudio.

#### A. Características en el Sistema Nervioso.-

El TRH (hormona liberadora de tirotropina : pGlu-His-ProNH ) fue <sup>2</sup> aislado inicialmente de homogenados de hipotálamo de ovino (Schally y col., 1969; Boler y col., 1969) y de bovino (Burgus y col., 1970) y su función caracterizada en el eje hipotalámico-hipofisiario como el factor liberador de tirotropina (TSH). El TRH se libera de la eminencia media del hipotálamo a la sangre portal (Fig. 9) y es transportado hasta la adenohipófisis, en donde, a través de una interacción con receptores específicos de alta afinidad en la membrana plasmática (Labrie y col., 1972; Wilber y Seibel, 1973) estimula la síntesis y liberación de TSH de los tirotropos (Fraser y McNeilly, 1982; Fink y col., 1983) y de prolactina de los lactotropos (Tashjian y col., 1971; Grosvenor y Mena, 1980). Las hormonas adenohipofisiarias son entonces secretadas a la circulación general, a través de la cual alcanzan el órgano blanco



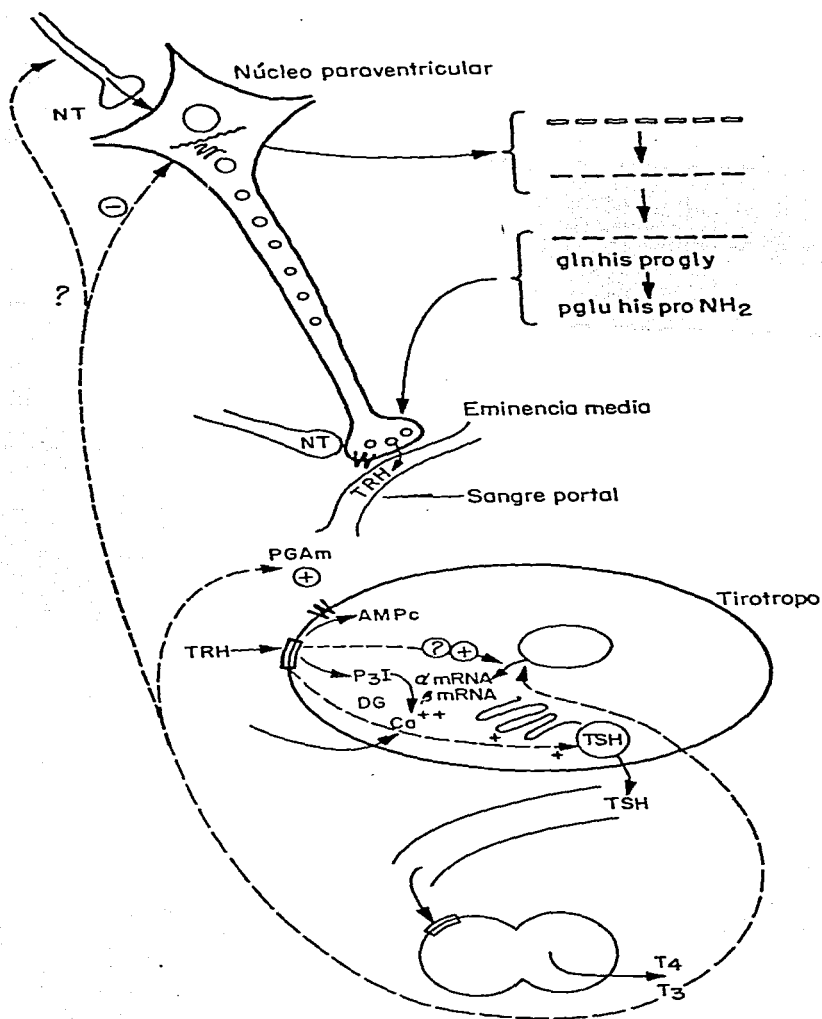


Fig. 9.- Representación esquemática del eje hipotalámico - hipofisiario- tiroideo. PGAm= PGA membranal (PGAII). (Tomado de Covarrubias y col., en prensa).

correspondiente. La TSH estimula la secreción de las hormonas tiroideas  $T_3$  y  $T_4$  (triiodotironina y tiroxina) de la tiroides (Dumont y Lamy, 1980), y éstas a su vez afectan diversos procesos metabólicos.

La liberación de TRH del hipotálamo es inhibida tanto in vivo como in vitro por somatostatina, péptido que se encuentra en altas concentraciones en el hipotálamo (Schally y col., 1978). La somatostatina inhibe también la secreción de TSH estimulada por TRH a nivel hipofisiario (Ridgway y col., 1983). La secreción de TSH y prolactina de la adenohipófisis es regulada por las hormonas tiroideas por un mecanismo de retroalimentación negativo. Estas hormonas regulan el número de receptores a TRH en los tirotropos: disminuyen el número de receptores sin cambiar la afinidad (Hinkle y Goh, 1982; Mori y col., 1988) y producen una disminución en la síntesis y secreción de TSH (Martin y col., 1970; Padmanabhan y col., 1981; Shupnik y col., 1986) (Fig. 9).

A nivel hipotalámico, en el núcleo paraventricular (que proyecta hacia la eminencia media), se ha observado que niveles altos de hormonas tiroideas disminuyen los niveles de RNAm de TRH (Segerson y col., 1987) y que regulan la expresión del gene de TRH (Dyess y col., 1988), mientras que existe controversia en cuanto al efecto que tienen estas hormonas sobre el nivel del péptido maduro. Por ejemplo, Childs y col. (1981) y Mori y Yamada (1987) han observado una disminución de este nivel, mientras que otros grupos no han observado efecto (Kardon y col., 1977). En otros tejidos también se ha observado la modulación de los niveles de precursor de TRH por hormonas tiroideas (Simard y col., 1989a,b).

Por otra parte, existe también la posibilidad de que las hormonas tiroideas puedan regular la liberación de TRH a nivel hipotalámico (Jackson y Lechan, 1983; Rondeel y col., 1988). Se desconoce si las hormonas adenohipofisiarias pueden regular la liberación de TRH in vivo a través de un flujo retrógrado hacia el hipotálamo por el sistema portal hipotalámico-hipofisiario. Por lo tanto, es evidente que el funcionamiento correcto de este eje está sujeto a regulación a varios niveles.

El TRH se localiza tanto dentro como fuera del SNC y su distribución en el cerebro de mamíferos es muy amplia. La mayor concentración se encuentra en la eminencia media del hipotálamo, el área que contiene el mayor número de terminales nerviosas de esta región. Sin embargo, el péptido se encuentra también en concentraciones apreciables en el cerebro anterior, el tallo cerebral y el diencéfalo posterior (Brownstein y col., 1974; Winokur y Utiger, 1974; Kizer y col., 1976). El TRH se encuentra también en el tracto intestinal, el páncreas, el líquido cerebrospinal y en la piel de los anfibios, no sólo en animales superiores, sino también en inferiores, en donde el TRH no tiene influencia sobre la función tiroidea (Jackson y Reichlin, 1974).

El uso de técnicas de inmunohistoquímica ha revelado la presencia de somas neuronales TRH-érgicos en muchas áreas del cerebro : en el hipotálamo (núcleos paraventricular, ventromedial, supraquiasmático, supraóptico e hipotálamo anterior), la médula oblongada (núcleos de raphé magnus, obscurus y pallidus) (Hökfelt y col., 1978; Lechan y Jackson, 1982; Johansson y col., 1983; Palkovits, 1984), el área preóptica, las capas glomerular y plexiforme del bulbo olfatorio, el

caudado-putámen, la amígdala, la sustancia gris central, los núcleos pontinos y cocleares, el nucleus solitarius, el flocculus del cerebelo, la capa II de la corteza cerebral (Lechan y col., 1985) y en la lámina II del asta dorsal y en la superficie de la lámina II a lo largo de toda la médula espinal (Harkness y Brownfield, 1985). En los núcleos de raphé el TRH coexiste con serotonina y sustancia P (Johansson y col., 1981, 1983).

Por otro lado, las fibras y terminales TRH-érgicas se encuentran también ampliamente distribuidas : en la eminencia media y otras áreas del hipotálamo, el organum vasculosum de la lamina terminalis (OVLT) del área preóptica, amígdala, septo lateral, tallo cerebral inferior, neurohipófisis (Lechan y Jackson, 1982; Palkovits, 1984; Harkness y Brownfield, 1985), y en la médula espinal, particularmente en el asta ventral, la sustancia gris central, la columna celular intermediolateral (Palkovits, 1984; Harkness y Brownfield, 1985), y en menor proporción en el asta dorsal (Harkness y Brownfield, 1985). En el asta ventral y en la columna intermediolateral de la médula espinal se ha observado la coexistencia de TRH y serotonina (Harkness y Brownfield, 1985).

Las vías TRH-érgicas conocidas a la fecha incluyen : 1) la que se encuentra en el hipotálamo, en el núcleo paraventricular, cuyas proyecciones llegan a la eminencia media y, 2) la que se encuentra en los núcleos de raphé en la médula oblongada, que proyectan al asta ventral de la médula espinal).

El TRH se sintetiza por vía ribosomal (McKelvy, 1977) a partir de un precursor de alto peso molecular (Rupnow y col., 1979) en el que se encuentra la secuencia de TRH 5 veces repetida, flanqueada por

pares de aminoácidos básicos (Lechan y col., 1986). Como ocurre con otros NP, el precursor de TRH es procesado post-traduccionalmente, siendo la etapa terminal la formación de TRH a partir de la secuencia TRH-Gli por la acción de la PAM, enzima que usa el amino de la Gli para amidar el COOH, para producir péptidos amidados en el extremo COOH terminal (Eipper y Mains, 1988). Esta enzima se encuentra en varios tejidos y en suero (Eipper y col., 1985) y en el cerebro su distribución es bastante heterogénea (Meng y Tsou, 1988). La actividad de la PAM se encuentra asociada a membranas (Eipper y col., 1988; May y col., 1988) y puede ser afectada por una gran variedad de efectores (Mains y col., 1985). La enzima tiene al ácido ascórbico como cofactor, el cual es capaz de aumentar los niveles de TRH en células hipotalámicas en cultivo (Glembotski y col., 1986) así como la liberación del péptido en condiciones depolarizantes (Faivre-Bauman y col., 1988).

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, las hormonas tiroideas son capaces de regular la síntesis del péptido (Segerson y col., 1987; Dyess y col., 1988), aumentando o disminuyendo los niveles de RNAm en el núcleo paraventricular del hipotálamo según la concentración de hormonas tiroideas circulantes. Aún más, los niveles de RNAm de TRH en el hipotálamo varían durante la ontogenia y el ciclo circadiano (Covarrubias y col., 1989) y se ha sugerido que existe un mecanismo compensatorio biosintético regulado que mantiene los niveles de TRH en la terminal nerviosa después de la liberación (Covarrubias y col., 1988).

Finalmente, el procesamiento del precursor de TRH puede llevarse a cabo diferencialmente, originándose formas extendidas en el extremo NH<sub>2</sub> o COOH terminales; la abundancia relativa de estas

formas es tejido-específica (Cockle y Smyth, 1986, 1987, 1988), lo que abre la posibilidad de que alguna(s) de ellas pudiera(n) tener funciones biológicas.

Las técnicas de fraccionamiento subcelular y de inmunocitoquímica han mostrado que más del 50% del TRH hipotalámico y extrahipotalámico se localiza en terminales nerviosas, y dentro de éstas en vesículas sinápticas (Barnea y col., 1976; Winokur y col., 1977; Johansson y col., 1983). El TRH almacenado en terminales nerviosas en el hipotálamo se libera por un mecanismo dependiente de

$Ca^{2+}$  (probablemente por exocitosis) en respuesta a depolarización (Joseph-Bravo y col., 1979; Maeda y Frohman, 1980; Warberg, 1982; Méndez y col., 1987), así como en respuesta a ciertos NT (Charli y col., 1978; Joseph-Bravo y col., 1979; Chen y Ramirez, 1981; Biggins y col., 1983). El TRH no se libera de sinaptosomas incubados en

medio Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB) en presencia de  $Ca^{2+}$  en respuesta a estímulos depolarizantes (Bennett y col., 1975; Joseph-Bravo y col., 1979; Warberg, 1982), pero sí en presencia de sacarosa (Joseph-Bravo y col., 1979; Warberg, 1982). Esta controversia se ha observado también en el caso de otros factores de liberación, como LHRH y somatostatina (Bennett y col., 1975; Warberg, 1982). Los primeros estudios en este sentido sugirieron que tales resultados se debían a que la sacarosa estabilizaba los sinaptosomas. Debe considerarse la posibilidad de que estos resultados se deban a un artefacto experimental. Por otra parte, la liberación de NP pudiera

ser regulada por  $Na^{+}$  extracelular, como se ha demostrado en el caso del GABA. A la fecha, no existen trabajos en los que se haya estudiado la dependencia de  $Na^{+}$  en la liberación de NP.

En contraste, la liberación de TRH de rebanadas o fragmentos de tejido sí responde a depolarización en medio KRB (Charli y col., 1978; Joseph-Bravo y col., 1979; Maeda y Frohman, 1980; Chen y Ramirez, 1981; Tapia-Arancibia y col., 1984; Méndez y col., 1987).

Existe una gran controversia acerca de los efectos producidos por varios NT, ya que dependiendo de la preparación utilizada, varios grupos han reportado efectos distintos para el mismo NT. En general, se ha propuesto que la liberación de TRH del hipotálamo mediobasal es controlada por fibras excitatorias (noradrenérgicas e histaminérgicas) y por fibras inhibitorias (somatostatinérgicas, serotoninérgicas y dopaminérgicas).

Por otra parte, en un trabajo previo (Méndez y col., 1987) se ha observado que el TRH se libera de algunas de las áreas del cerebro de rata en las que el péptido se encuentra en concentraciones desde intermedias hasta muy altas. La liberación basal de TRH de las áreas estudiadas es muy variable (1-20% del contenido en el tejido) (Tabla 1), lo que pudiera coincidir con la existencia de diferentes pozas del péptido. Las áreas cerebrales que responden a una estimulación con concentraciones depolarizantes de  $K^+$  (Tablas 1 y 2) son regiones con una alta densidad de terminales TRH-érgicas, con un gran número de receptores y en las que se han reportado efectos del TRH, por lo que estos resultados apoyan la hipótesis de que el TRH, además de su función hormonal en el eje hipotalámico-hipofisiario, tiene funciones como NT o NM en algunas regiones del SNC.

En todas las áreas del SNC en que se ha reportado la presencia de TRH se encuentran también receptores específicos sobre la membrana plasmática (Taylor y Burt, 1982; Ogawa y col., 1982; Rostène y col.,

Tabla 1.- Efecto de KCl 56 mM sobre la liberación de TRH endógeno de cerebro de rata.

Región	n	TRH liberado	% de TRH liberable
		(K <sup>+</sup> /basal)	(basal)
Eminencia media (0.13)	10	3.85 ± 0.84 $\zeta$	0.90 ± 0.33
Área preóptica (0.99)	5	4.62 ± 1.41*	1.32 ± 0.31
Hipotálamo total (1.63)	28	2.68 ± 0.37†	1.12 ± 0.18
Núcleo accumbens-septum lateral (7.19)	13	4.18 ± 0.65†	1.07 ± 0.32
Bulbo olfatorio (5.16)	6	1.06 ± 0.29	20.15 ± 5.38
Amígdala (3.96)	7	2.15 ± 0.55*	4.58 ± 1.34
Mesencéfalo (8.85)	8	2.29 ± 0.30†	4.89 ± 1.08
Puente (7.59)	8	2.21 ± 0.59	5.90 ± 1.51
Médula oblongada (12.7)	8	1.95 ± 0.31*	2.67 ± 0.38
Médula espinal cervical (4.97)	8	1.45 ± 0.21*	14.20 ± 2.50
Estriado (7.74)	7	1.23 ± 0.12	10.51 ± 1.50
Glándula pineal (1.22)	4	n.d.	n.d.
Hipocampo (9.02)	5	1.30 ± 0.21	14.24 ± 2.87
Corteza temporal (11.7)	5	n.d.	n.d.
Corteza frontal (11.2)	7	1.91 ± 0.67	5.76 ± 1.36
Vermis cerebelar (15.5)	10	2.05 ± 0.62	17.50 ± 4.55
Hemisferio cerebelar (6.1)	4	n.d.	n.d.
Retina (4.9)	4	n.d.	n.d.

Regiones completas (amígdala, glándula pineal, retina, eminencia media, área preóptica) o rebanadas de 250  $\mu$ m, se incubaron en KRB y el TRH liberado y el contenido de péptido en los tejidos se cuantificaron por RIA. Las disecciones de corteza se delimitaron por el quiasma óptico. Entre paréntesis se indica la cantidad de tejido (mg) usada en la incubación. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio del número de determinaciones indicado. (Tomado parcialmente de Méndez y col., 1987).

n = número de muestras.

n.d. = no detectado.

<sup>+</sup>  
K /basal = cociente de TRH liberado durante la estimulación contra el liberado basalmente.

% de TRH liberable (basal) = TRH liberado basalmente / contenido de TRH en el tejido después de la incubación.

\* p < 0.05

$\zeta$  p < 0.01

† p < 0.005



Tabla 2.- Porcentaje de TRH liberado por KCl 56 mM en diferentes regiones del cerebro de rata.

Región	n	% de TRH liberable en respuesta -- a KCl 56 mM --
Eminencia media	10	1.45 ± 0.54
Area preóptica	5	3.47 ± 1.03
Hipotálamo total	28	1.13 ± 0.27
Núcleo accumbens- septum lateral	13	1.71 ± 0.29
Amígdala	7	2.89 ± 1.13
Médula espinal cervical	8	5.80 ± 2.24
Mesencéfalo	8	4.58 ± 0.77
Médula oblongada	8	2.73 ± 1.10

Las regiones cerebrales se incubaron como se indica en la Tabla 2. Los datos se expresan como el promedio ± el error estándar del promedio del número de determinaciones indicado.

n = número de muestras.

% de TRH liberable en respuesta a KCl 56 mM = TRH liberado durante la estimulación menos TRH liberado basalmente / contenido de TRH en el tejido al final de la incubación x 100.

(Tomado de Méndez y col., 1987).

1984). En la adenohipófisis existe un solo tipo de sitios de unión a TRH, de alta afinidad (Labrie y col., 1972; Wilber y Seibel, 1973), mientras que en regiones de cerebro se han caracterizado dos poblaciones de receptores, una de alta y otra de baja afinidad (Taylor y Burt, 1982; Ogawa y col., 1982; Rostène y col., 1984). La constante de afinidad del sitio de alta afinidad en adenohipófisis, corteza cerebral, núcleo accumbens, retina o cerebro total de rata va de 4 a 50 nm (Burt y Snyder, 1975; Taylor y Burt, 1981; Ogawa y col., 1982; Rostène y col., 1984), mientras que el sitio de baja afinidad ( $K_d = 5 \mu M$ ) se encuentra en corteza cerebral y en cerebelo (Burt y Snyder, 1975). El número de receptores en estas áreas varía desde muy bajo, como en la neurohipófisis, intermedio como en el estriado, el tallo cerebral, el bulbo olfatorio, la amígdala y la adenohipófisis, hasta muy alto, como en la retina (Taylor y Burt, 1982).

Los sitios de unión detectados en diferentes áreas del cerebro son similares a los adenohipofisiarios, por lo que parecen representar el receptor fisiológico a TRH.

La interacción de TRH con su receptor produce, como ya se mencionó, la liberación de TSH de los tirotropos y la de prolactina de los lactotropos. Estas respuestas parecen ser mediadas por diferentes segundos mensajeros. En los tirotropos, se piensa que la acción de TRH está ligada a aumentos en AMPc, aunque esta estimulación no es directa sobre la actividad de la adenilato ciclasa, sino que parece ser regulada por un mecanismo dependiente de proteína cinasa C y/o  $Ca^{2+}$  /calmodulina (Martin, 1989), ya que el  $Ca^{2+}$  proveniente del medio extracelular y de pozas intracelulares (Geras y col., 1982) tiene un efecto estimulador sobre el sistema.

En los lactotropos, el  $\text{Ca}^{2+}$  de pozas intracelulares parece ser uno de los mediadores (Geras y col., 1982; Ronning y col., 1982). Además, en estas células el TRH estimula la hidrólisis de fosfatidilinositol (Baird y col., 1983), evento que produce inositol trifosfato, el cual aparentemente es el segundo mensajero en este sistema (Martínez de la Escalera y col., 1988; Martínez de la Escalera y Weiner, 1988; Gershengorn, 1989). En el cerebro no se conocen aun los mediadores de la acción de TRH.

El TRH exhibe una multitud de efectos en el SNC, tanto neuroquímicos como electrofisiológicos, y es capaz de afectar algunos patrones del comportamiento. El TRH estimula el recambio de catecolaminas (Kerwin y Pycocok, 1979; Horst y col., 1979; Heal y col., 1983), aumenta la liberación de dopamina de hipotálamo y núcleo accumbens de rata (Kerwin y Pycocok, 1979; Sharp y col., 1982; Miyamoto y col., 1984) y la de noradrenalina de hipotálamo (Sharp y col., 1982), potencia la liberación de glutamato, aspartato, GABA y glicina estimulada por depolarización en tallo y corteza cerebral (Biggins y col., 1983), potencia las acciones excitatorias de acetilcolina en algunas neuronas corticales (Yarbrough, 1976; Braitman y col., 1980) y deprime la excitación inducida por ácido glutámico en algunas neuronas corticales (Renaud y col., 1979; Braitman y col., 1980). El TRH y algunos análogos tienen acción excitatoria sobre motoneuronas espinales en anfibios (Nicoll, 1977; Yarbrough y Singh, 1979) y actúa como factor trófico en neuronas motoras del asta ventral de la médula espinal en cultivo (Schmidt-Achert y col., 1984), sistema en el que el péptido aumenta la actividad de colinacetiltransferasa y creatina cinasa, haciendo que

las neuronas sean más numerosas y con procesos más largos y desarrollados.

Cuando se le administra in vivo, el péptido tiene un amplio espectro de efectos sobre el comportamiento. El TRH aumenta la actividad locomotora espontánea (Sharp y col., 1982; Heal y col., 1983; Bennett y col., 1983; Miyamoto y col., 1984); revierte la narcosis (Kalivas y Horita, 1983; Sharp y col., 1984) y la hipotermia (Sharp y col., 1984) inducidas por pentobarbital; antagoniza los efectos de etanol y algunos depresivos (Prange y col., 1979); aumenta la tasa respiratoria (Sharp y col., 1984); potencia las respuestas de comportamiento a serotonina (Green y Grahame-Smith, 1974); potencia los efectos de inhibidores de la monoamino oxidasa (MAO) cuando se le administra junto con L-DOPA o metanfetamina (Spirtes y col., 1976); antagoniza algunos de los efectos de la neurotensina (Osbahar y col., 1981) y algunos de los de los opiáceos (Holaday, 1984). El TRH también posee efectos termoreguladores en la rata consciente (Yehuda y Kastin, 1980) y tiene un efecto protector contra el shock producido por trauma en la médula espinal (Holaday, 1984; Faden y col., 1989). Además, el péptido se ha implicado en el tratamiento de algunas enfermedades, como la esclerosis amiotrófica lateral (Brooks, 1989) y parece actuar como antidepresivo (Prange y col., 1979).

Regiones cerebrales específicas están implicadas en los efectos descritos. Por ejemplo, el núcleo accumbens y el hipotálamo están involucrados en la respuesta locomotora a TRH (Sharp y col., 1982; Bennett y col., 1983; Miyamoto y col., 1984), la cual es mediada a través de la liberación de dopamina (Kerwin y Pycock, 1979; Sharp y col., 1982; Bennett y col., 1983). Algunos núcleos hipotalámicos y

también el núcleo accumbens, son sensibles a TRH en cuanto a la reversión de la narcosis inducida por pentobarbital (Kalivas y Horita, 1983). Esta acción podría estar mediada por vías catecolaminérgicas, ya que los antagonistas de estas aminas previenen la reversión de la narcosis por TRH, aunque la catecolamina implicada no es dopamina (Kalivas y Horita, 1983; Sharp y col., 1984). El área preóptica, conectada con el núcleo accumbens y el septum, está directamente relacionada con los efectos termoreguladores del TRH (Yehuda y Kastin, 1980), y algunas áreas del tallo cerebral parecen estar ligadas al efecto de TRH sobre la tasa respiratoria (Sharp y col., 1984).

Muchas de las características mencionadas del TRH cumplen con los criterios que postulan a las sustancias neuroactivas como posibles NT y/o NM en el SNC. Sin embargo, la acción del TRH liberado al espacio sináptico ha de ser terminada por algún mecanismo que lo inactive eficientemente.

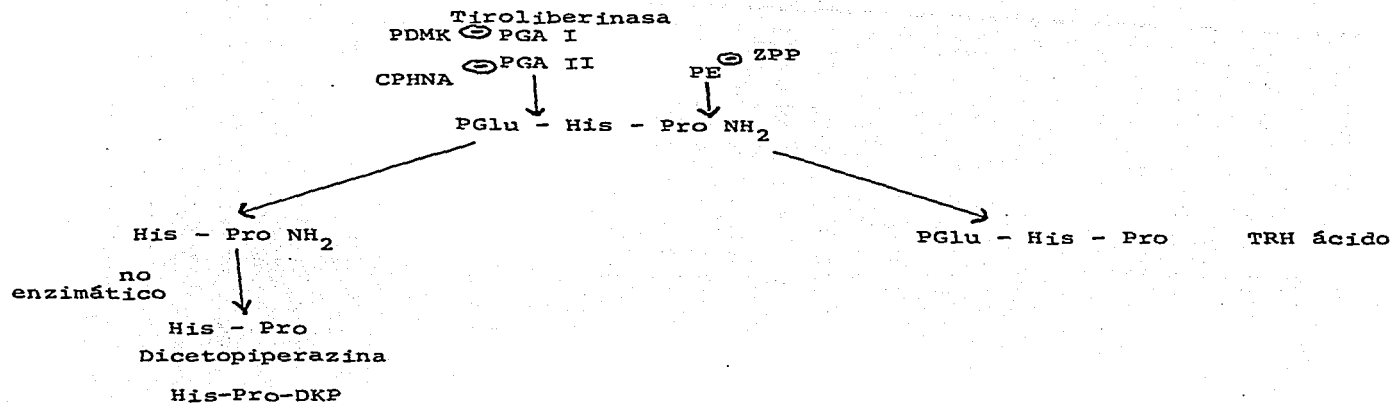
En la sección anterior se describieron los mecanismos de inactivación propuestos para los NP y se comentaron algunos de ellos en relación al TRH. Se analizan a continuación los aspectos relacionados con la degradación enzimática del TRH, mecanismo actualmente propuesto como el responsable de su inactivación.

## B. Degradación enzimática del TRH.

### Propiedades de las peptidasas que lo degradan.

Ya que el TRH (hormona liberadora de tirotrópina : pGlu-His-  
PronH ) es una molécula pequeña que puede ser sustrato de un número  
2  
limitado de enzimas, y ya que se conocen algunas de sus propiedades

VIA METABOLICA DEL TRH.



PGA I - Piroglutamato aminopeptidasa I (soluble)

PGA II - Piroglutamato aminopeptidasa II (membranal)

Tiroliberinasa - Piroglutamato aminopeptidasa sérica.

PE - Prolil endopeptidasa (soluble)

PDMK - piroglutamil diazo metilcetona (inhibidor específico de la PGA I)

CPHNA - N-1-carboxi-2-feniletíl (N<sup>im</sup> benzil) histidil-β-naftilamida (inhibidor específico de la PGA II)

ZPP- N-benziloxicarbonil prolil prolinal (inhibidor específico de la PE)

Fig.10.- Vía metabólica del TRH. Se indican los cortes primarios de la molécula y la generación de dos de sus metabolitos, así como los inhibidores específicos de las enzimas.

en el SNC, este péptido constituye un buen modelo para estudiar los mecanismos de inactivación de los neuropéptidos.

El TRH es degradado in vitro por 3 peptidasas presentes en el cerebro de roedores (Figs. 6 y 10). Dos de ellas se encuentran enriquecidas en la fracción soluble citosólica de homogenados de cerebro total : la piroglutamato aminopeptidasa I (PGAI) y la prolil endopeptidasa (PE). La tercera enzima, la piroglutamato aminopeptidasa II (PGAI), se encuentra en membranas de cerebro y en suero.

La PGAI (E.C.3.4.19.3) es una enzima que rompe el enlace pGlu-X (X = aminoácido, péptido o proteína, excepto prolina) (Bauer y Kleinkauf, 1981; Bauer, 1983) de una gran variedad de péptidos naturales y sintéticos, entre otros, TRH, LHRH, neurotensina y bombesina. La afinidad de la enzima por sus sustratos conocidos es variable. Por ejemplo, la Km para TRH, TRH-OH, LHRH, pGlu-His-Gli (péptido anorexogénico) y neurotensina es, respectivamente, 0.74, 0.67, 0.59, 0.58 y 1.02 mM (Brown y O'Cuinn, 1983). La acción de la enzima sobre TRH produce His-ProNH<sub>2</sub>, el cual puede ciclizarse

espontáneamente a His-Pro-Dicetopiperacina (His-Pro-DKP) (Bauer y Kleinkauf, 1980), metabolito que es estable en el SNC y que tiene efectos tanto similares como opuestos a los de TRH (Prasad, 1985).

La PGAI es una tiol proteasa de 28 000 daltones de peso molecular (Bauer, 1983), activa a pH neutro (Prasad y Peterkofsky, 1976). La enzima requiere de protectores de grupos -SH (mercaptoetanol, ditiotreititol) y EDTA para expresar su máxima actividad, y es

inhibida por agentes -SH reactivos, como iodoacetamida y N-etilmaleimida.

La enzima se encuentra ampliamente distribuida en varias especies y tejidos. En el cerebro, su distribución es muy homogénea (Wilk, 1983), encontrándose la máxima actividad en la adenohipófisis (Friedman y Wilk, 1986).

La PE (E.C.3.4.21.26) es una endopeptidasa que hidroliza el enlace Pro-X (X = cualquier aminoácido o péptido, excepto prolina) de una gran variedad de sustratos, como TRH, LHRH, bradiquinina,  $\alpha$ -MSH, neurotensina y sustancia P (Koida y Walter, 1976; Orłowski y col., 1979; McKelvy y col., 1982). La hidrólisis de TRH produce TRH-OH como metabolito (Prasad y Peterkofsky, 1976). Como en el caso de la PGAI, el TRH no parece ser el mejor sustrato de la enzima. Por ejemplo, Brown y O'Cuinn (1983) reportan una Km de 0.54 mM para TRH y una de 0.15 mM para LHRH. Por otra parte, los resultados de Busby y col. (1982) indican que el TRH es mejor sustrato de la PGAI que de la PE, aunque la actividad de esta última enzima en el cerebro excede la de PGAI, resultados observados también por nosotros (M. Méndez y C. Cruz, no publicado).

La PE es una serina proteasa con grupos -SH y -OH reactivos (Bauer, 1983), con un peso molecular de 70 000 - 75 000 daltones (Wilk, 1983). Su actividad es máxima a pH neutro o ligeramente alcalino.

La PE se encuentra en muchos tejidos, y en el cerebro su distribución es homogénea (Wilk, 1983). La PGAI y la PE están presentes tanto en neuronas como en glía (Koshiya y col., 1984, 1985; Cruz y col., no publicado). Su distribución subcelular indica



que son enzimas netamente citosólicas. y que sólo una pequeña proporción de su actividad (5-10%) está presente en las terminales nerviosas (Torres y col., 1986), en contraste con la distribución del TRH, el cual se encuentra concentrado en esta fracción (Winokur y col., 1977). Sin embargo, estas enzimas podrían estar localizadas preferentemente en terminales TRH-érgicas y participar en la regulación de los niveles del péptido.

La PGAI (E.C.3.4.19.-) es una enzima localizada en la membrana plasmática de sinaptosomas (O'Connor y O'Cuinn, 1984; Garat y col., 1985; Friedman y Wilk, 1986; Torres y col., 1986), en la cara externa de la membrana, es decir, es una ectoenzima (Charli y col., 1988) y se encuentra también en suero (Taylor y Dixon, 1978; Bauer y Nowak, 1979). A esta enzima Bauer la ha llamado "Tiroliberinasa" y es la única enzima responsable de la inactivación del TRH en suero (Wilk y Friedman, 1985).

La PGAI es una metalopeptidasa (O'Connor y O'Cuinn, 1984; Garat y col., 1985) cuyos requerimientos son completamente diferentes a los de la PGAI. Es activa a pH neutro (O'Connor y O'Cuinn, 1985a) e inhibida por quelantes como la 1-10 fenantrolina. O'Connor y O'Cuinn (1985b) han purificado la enzima a homogeneidad usando papaina para solubilizarla y han determinado un peso molecular de 230 000 daltones, peso muy semejante al de la tiroliberinasa (260 000 daltones) (Wilk, 1986). Los mismos autores (1987) han mostrado que en el sitio activo de la enzima hay residuos de tirosina, arginina e histidina, necesarios para la actividad catalítica.

La PGAI es altamente específica para hidrolizar TRH (Wilk, 1986) y no rompe el enlace pGlu-His de otros péptidos, como LHRH (Bauer y

col., 1981; O'Connor y O'Cuinn, 1985b). siendo la Km de 40  $\mu$ M para TRH (O'Connor y O'Cuinn, 1984). Sin embargo, es inhibida preferencialmente por LHRH, y en menor grado por otros péptidos (O'Connor y O'Cuinn, 1985b). Sus propiedades, por lo tanto, son muy parecidas a las de la "Tiroliberinas" y es posible que provengan del mismo gene.

La PGaII es una enzima que se encuentra preferentemente en el cerebro (Friedman y Wilk, 1986), en el que su distribución es muy heterogénea (Vargas y col., 1987) (Tabla 3). A nivel celular, se encuentra en neuronas en una alta proporción (Cruz y col., sometido).

Por lo tanto, las propiedades y la localización regional, celular y subcelular de la PGaII hacen pensar en esta enzima como un fuerte candidato para inactivar extracelularmente al TRH.

#### Regulación de la actividad de las enzimas que degradan al TRH.

Como se señaló en la sección II, una de las etapas del metabolismo de las neuronas peptidérgicas que podría estar sujeta a regulación es la inactivación. Esto permitiría controlar de manera fina las concentraciones de NP. En el caso de la degradación del TRH, algunas de las peptidasas que lo degradan pueden ser reguladas, en particular por el estado hormonal del organismo.

La actividad de la "Tiroliberinas" es regulada por los niveles de hormonas tiroideas (Bauer, 1976; Emerson y Wu, 1987; Ponce y col., 1988), de manera que en condiciones de hipertiroidismo la actividad de la enzima aumenta, mientras que el hipotiroidismo la disminuye. Probablemente, estos cambios contribuyen a reducir el efecto del TRH liberado a la sangre portal y por consiguiente, a la

Tabla 3.- Distribución regional de la PGaII en el cerebro de rata.

Región	PGaII (fmolas His-ProNH <sub>2</sub> / min/mg proteína)	TRH (pg/mg peso húmedo)
Bulbo olfatorio	261 ± 55 (5)	32 ± 4 (12)
Hipocampo	223 ± 45 (3)	5 ± 0.6 (12)
Núcleo accumbens- septum lateral	178 ± 28 (3)	143 ± 29 (12)
Corteza cerebral posterior	142 ± 12 (4)	2.6 ± 0.7 (6)
Hipotálamo	135 ± 22 (4)	197 ± 21 (12)
Corteza cerebelar	67 ± 7 (4)	n.d.
Neurohipófisis	54 ± 5 (4)	118 ± 18 (15)
Mesencéfalo	47 ± 6 (3)	16 ± 3 (4)
Médula oblongada	36 ± 10 (4)	14 ± 3 (7)
Adenohipófisis	31 ± 6 (4)	4.3 ± 0.8 (17)
Puente	28 ± 4 (3)	10 ± 1 (8)
Médula espinal cervical	24 ± 1 (3)	20 ± 3 (8)

Las regiones cerebrales fueron disecadas, pesadas y procesadas para RIA o bien para el ensayo enzimático de la PGaII, como se describe en Vargas y col. (1987) y en Méndez y col. (1987). Los datos se expresan como el promedio ± el error estándar del promedio del número de determinaciones que se indican entre paréntesis. (Tomado de Vargas y col., 1987). n.d. = no determinado.

disminución de la liberación de TSH observada en estas condiciones. Paralelamente, se ha observado que la actividad de la PGAI en la adenohipófisis es regulada por las hormonas tiroideas en el mismo sentido, aunque la cinética de respuesta es más rápida en el caso de la PGAI (Fig. 9) (Bauer, 1987b, 1988; Ponce y col., 1988; Suen y Wilk, 1989a), por lo que la regulación de las concentraciones de TRH liberado que llega a la adenohipófisis pudiera darse también a este nivel.

Por otro lado, la PGAI de algunas áreas del cerebro parecen responder también a estas hormonas. Por ejemplo, en condiciones de hipertiroidismo, la actividad de la enzima aumenta notablemente en la corteza frontal, mientras que en el tallo cerebral disminuye (Suen y Wilk, 1989a). En estas áreas se desconoce el significado fisiológico de esta regulación.

La PGAI también es regulada por hormonas tiroideas. La  $V_{max}$  de la enzima es aumentada hasta 3 veces por  $T_3$  en cultivos de células  $GH_3$  (Suen y Wilk, 1987), y se piensa que esta inducción se lleva a cabo a través de un aumento en la síntesis de novo de la enzima. Esta enzima también es inducida en estas células por butirato de sodio (Suen y Wilk, 1989b) y por 5-oxoprolinal (Friedman y col., 1986), un inhibidor específico de la PGAI. Estos resultados en conjunto indican que la PGAI es regulada en células  $GH_3$ , y que ésta podría ser la enzima limitante en la degradación de TRH en la adenohipófisis (Friedman y col., 1986; Suen y Wilk, 1987, 1989a,b).

En otras áreas, el papel de la PGAI es menos claro. Suen y Wilk (1989a) observaron un aumento en la actividad de esta enzima en el hipotálamo, el bulbo olfatorio, el hipocampo y el tálamo, en

respuesta a un tratamiento crónico con T<sub>3</sub>. No se sabe cual es el significado fisiológico de esta respuesta.

Finalmente, la actividad de la PE en cerebro de rata es inducida por poliaminas y Mg<sup>2+</sup> (Soeda y col., 1986) a través de un mecanismo que parece involucrar la desinhibición de la PE por su inhibidor endógeno. Sin embargo, no existen evidencias que indiquen que la PE podría representar un paso limitante de regulación de las concentraciones de algún NP en el SNC.

## OBJETIVOS Y METAS

Aunque los NP se consideran actualmente como mensajeros químicos en el SN y aunque se encuentran ampliamente distribuidos y se conocen algunos de sus efectos en el mismo, se cuenta con poca información acerca de los mecanismos que regulan las pozas intra-terminales de NP disponibles para liberarse, así como los mecanismos que controlan las concentraciones de los mismos en el espacio sináptico una vez liberados y que terminan su acción. Así, el objetivo de este trabajo es contribuir al entendimiento de los mecanismos que regulan los niveles pre-liberables y post-liberados de TRH en algunas áreas del cerebro de rata, y obtener la información bioquímica necesaria sobre estos procesos que pudiera generalizarse a otras sustancias neuroactivas. Esta información resulta de importancia fundamental para comprender como funciona el SN, y podría aplicarse al diseño de drogas específicas para el tratamiento de algunos desórdenes nerviosos. Por otra parte, el conocimiento de los mecanismos de inactivación de los NP es importante si se piensa que pueden generarse productos que son activos en el SNC, lo cual puede complicar las interpretaciones de los efectos fisiológicos de los NP.

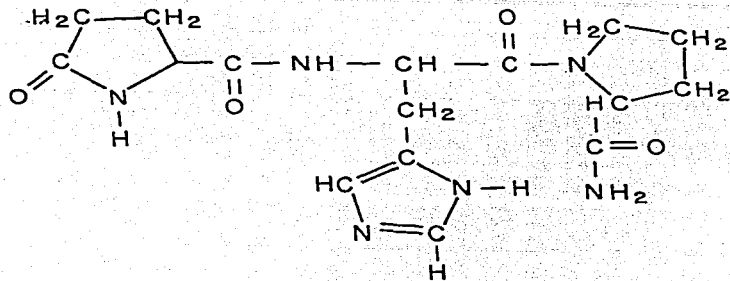
El presente proyecto consta de dos partes, una relacionada con los mecanismos de regulación de los niveles intracelulares de TRH, y otra relacionada con los mecanismos de inactivación del péptido liberado al medio extracelular. El propósito fundamental es determinar si la PGAI, la PE y la PGAII participan en estos mecanismos.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

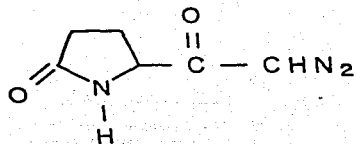
### I.- Regulación de los niveles endógenos de TRH en la terminal nerviosa.

Aunque la distribución subcelular de las peptidasas solubles PGAI y PE no coincide con la del TRH, existe la posibilidad de que éstas participen en la regulación de los niveles intra-terminales de este NP. Para ésto, utilizamos compuestos capaces de inactivar de manera específica y potente a estas dos enzimas. Estas moléculas, que actúan a nivel del sitio activo, son el N-Benziloxicarbonil-prolil-prolinal (ZPP), un inhibidor no competitivo de la PE ( $K_i=14$  nM), y la piroglutamil diazometilcetona (PDMK), que inhibe de manera irreversible a la PGAI ( $K_i=$  nM). Ambos inhibidores (Fig. 11) son muy eficientes en la inhibición de estas enzimas tanto in vitro como in vivo (Wilk y Orlowski, 1983; Friedman y col., 1984; Wilk y col., 1985; Wilk, 1989), y fueron donados por el Dr. S. Wilk para este estudio.

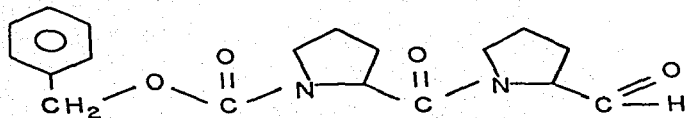
Con el objeto de determinar la posible relevancia fisiológica de la PGAI y de la PE, estudiamos el efecto in vivo de estos inhibidores específicos sobre los niveles endógenos de TRH en algunas regiones del cerebro de ratón, así como los efectos in vitro sobre la liberación y el contenido del péptido en rebanadas de hipotálamo y bulbo olfatorio de rata. Para ésto, utilizamos un sistema de incubación in vitro optimizado previamente (Méndez y col., 1987) y el TRH liberado al medio, así como el presente en el tejido se cuantificó por radioinmunoensayo (RIA). Por otra parte, con el objeto de estudiar el efecto de estos inhibidores in vitro



TRH: pGlu — His — ProNH<sub>2</sub>



Piroglutamil diazo metil cetona  
(PDMC)



N — Benziloxicarbonil — prolil — prolinal  
(ZPP)

Fig. 11. — Estructura de los inhibidores específicos de la PGA I — y — PE.



por un periodo de tiempo más prolongado. utilizamos un sistema de cultivo de órgano y un sistema de cultivo primario de células nerviosas (Charli y col., 1988).

Con el objeto de determinar si los resultados obtenidos pueden extenderse a otros NP activos, estudiamos también el efecto de estos inhibidores sobre la liberación in vitro y sobre el contenido in vivo e in vitro de LHRH, péptido que es mejor sustrato que TRH de estas enzimas (Busby y col., 1982; Brown y O'Cuinn, 1983). La cuantificación del LHRH liberado al medio y el presente en el tejido se llevó a cabo por RIA, utilizando un anticuerpo donado por la Dra. A. Barnea.

## II.- Regulación de los niveles extracelulares de TRH : mecanismo de inactivación del TRH liberado.

Ya que las evidencias actuales sugieren que las peptidasas membranales podrían ser las responsables de la inactivación fisiológica de los NP, y dadas las características de la PGAI, esta parte del proyecto está dirigida a determinar la relevancia fisiológica de esta enzima en la regulación de los niveles extracelulares de TRH. Para ésto, utilizamos inhibidores específicos y no específicos de la PGAI y estudiamos su efecto sobre la liberación de TRH en algunas regiones del cerebro de rata.

Inicialmente, utilizamos 4 péptidos descritos como inhibidores competitivos de la enzima (O'Connor y O'Cuinn, 1985b) : LHRH, LHRH (1-3) (pGlu-His-Trp), pGlu-His-Gli (péptido anorexogénico) y pGlu-His (Tabla 4), e intentamos comparar el orden de potencia relativa de estos péptidos sobre la recuperación de TRH liberado con su orden de potencia para inhibir a la PGAI.

Tabla 4.- Algunos inhibidores de la PGII.

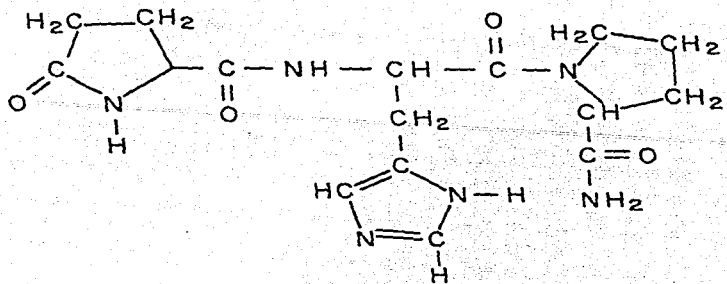
Inhibidor	Hidrólisis	Tipo de inhibición	Ki (mM)
LHRH	-	C	0.020
LHRH (1-3) (pGlu-His-Trp)	+	C	0.170
pGlu-His-Gli	+	C	1.65
pGlu-His	-	NC	4.5
t... t... pGlu His im (N bz1)O Bzl tioamida			
N-carboxil feniletíl His Bnaftilamida (CPHNA)			0.008-0.010

El valor de Ki de CPHNA se obtuvo en una preparación de enzima semipurificada (Vargas y col., 1987). Los valores de Ki de los péptidos se determinaron con la enzima purificada (O'Connor y O'Cuinn, 1985b).

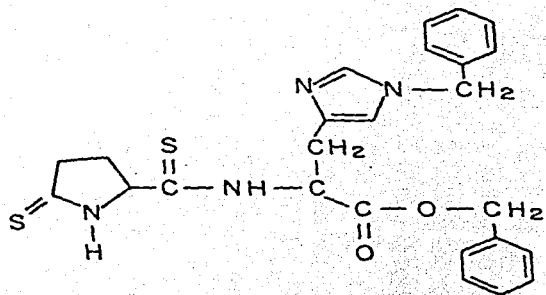
C = inhibición competitiva.

NC = inhibición no competitiva.

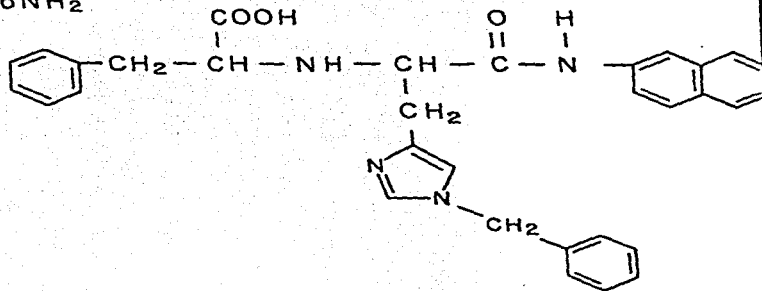
Posteriormente, contamos con dos inhibidores específicos de la PGIII, sintetizados y donados por el Dr. S. Wilk para este estudio : el N-1-carboxi-2-feniletil (N<sup>im</sup> benzil)-histidil-β-naftilamida (CPHNA) (K<sub>i</sub> = 8 - 10 μM) , y la t<sup>t</sup> pGlu t<sup>t</sup> His (N<sup>im</sup> bz1) O Bzl tioamida (Wilk, 1989) (Tabla 4 y Fig. 12) (este último con menor potencia para inhibir a la PGIII), y estudiamos el efecto de estos compuestos sobre la recuperación de TRH liberado de algunas regiones del cerebro de rata.



TRH: pGlu-His-ProNH<sub>2</sub>



† pGlu†His (Nim b<sub>3</sub>l) OB<sub>3</sub>l tioamida



CPHNA: N-carboxifeniletil His NA

Fig. 12.- Estructura de los inhibidores específicos de la PGA II.

## RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se encuentran en las siguientes publicaciones y en los resultados no publicados que se muestran a continuación.

1. Jean-Louis Charli, Milagros Méndez, Patricia Joseph-Bravo and Sherwin Wilk (1987). Specific inhibitors of pyroglutamyl peptidase I and prolylendopeptidase do not change the in vitro release of TRH or its content in rodent brain. *Neuropeptides* 9 : 373-378.
2. Milagros Méndez, Carlos Cruz, Patricia Joseph-Bravo, Sherwin Wilk and Jean-Louis Charli. Questionable role of prolylendopeptidase and pyroglutamate aminopeptidase I on peptide metabolism. *Neuropeptides (sometido)*.
3. Jean-Louis Charli, Carlos Cruz, Georgina Ponce, Miguel Angel Vargas, Milagros Méndez, Miguel Cisneros, Jorge Pasten and Patricia Joseph-Bravo (1989). Physiological Relevance of Pyroglutamate aminopeptidase II. In : Recent Advances in the Biomedical Significance of Thyrotropin Releasing Hormone (G. Metcalf and I. M. D. Jackson eds.), *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 553, New York, pp. 563-564.
4. Jean-Louis Charli, Milagros Méndez, Miguel Angel Vargas, Miguel Cisneros, Miguel Asai, Patricia Joseph-Bravo and Sherwin Wilk (1989). Pyroglutamyl peptidase II inhibition specifically increases recovery of TRH released from rat brain slices. *Neuropeptides* 14 : 191-196.

## I.- Regulación de los niveles endógenos de TRH en la terminal nerviosa.

El tratamiento combinado de PDMK y ZPP por inyección intraperitoneal de los compuestos por 3 y 13 hrs, no modificó los niveles de TRH en diversas regiones del cerebro de ratón (excepto una disminución inesperada en el bulbo olfatorio), ni en la hipófisis o el páncreas, si bien la PGAI y la PE se encontraban considerablemente inhibidas (70-95%) en el momento del sacrificio (Publicación # 1). La liberación de TRH in vitro de hipotálamo o hipotálamo mediobasal (MBH), basal o estimulada por alto  $K^+$ , o el contenido de TRH in vitro, tampoco fueron modificados, a pesar de una inhibición total de las enzimas en estas condiciones (Publicación # 1).

Existía la posibilidad de que estos resultados negativos se debieran a que los inhibidores no penetraran a las células y que la inhibición observada de las enzimas fuera el resultado de la exposición de éstas a los inhibidores al momento de romper el tejido y obtener el homogenado correspondiente para la evaluación de las actividades enzimáticas. Para resolver este punto, incubamos células corticales de ratón fetal en presencia de ambos inhibidores, descartamos el medio de incubación, lavamos las células de manera exhaustiva y las incubamos en presencia de la fracción soluble de un homogenado de cerebro total de ratón, para cuantificar posteriormente la actividad de las enzimas tanto en las células como en la fracción soluble expuesta a las mismas. Los resultados mostrados en la Fig. 13 indican que las enzimas intracelulares están inhibidas a pesar del lavado exhaustivo y que no queda inhibidor en el medio extracelular después de estos lavados. Por lo tanto, se

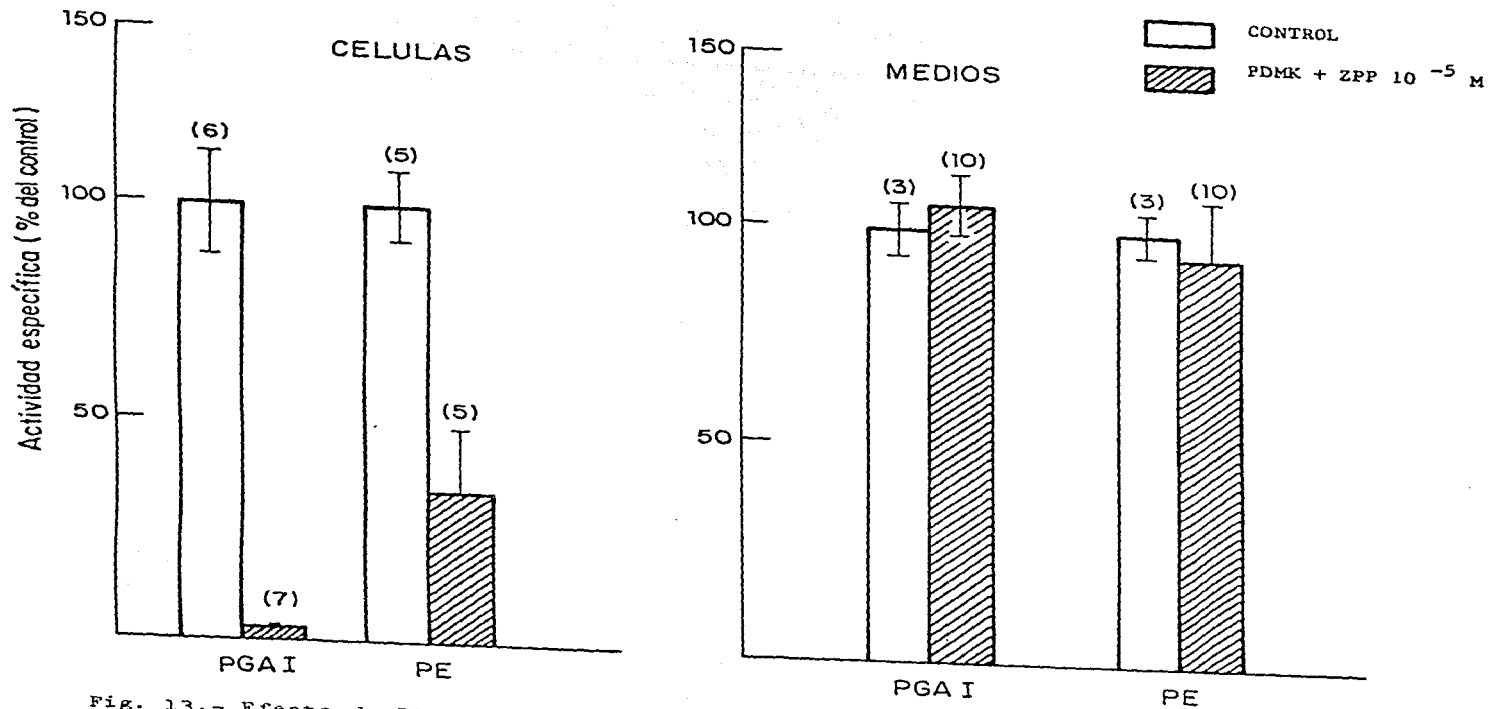


Fig. 13.- Efecto de PDMK y ZPP sobre la actividad de PGA I y PE en cultivo de células de corteza cerebral de ratón fetal.

puede concluir que los dos inhibidores atraviesan la membrana plasmática de las células.

Consideramos entonces la posibilidad de que el hecho de no haber observado efectos de los inhibidores se debiera a que la velocidad de recambio del TRH en las terminales nerviosas fuese muy lenta y se requiriera de tiempos prolongados de tratamiento para poder observar cambios. Por otro lado, el grupo de Faivre-Bauman (1986), utilizando un inhibidor común a ambas enzimas, ha encontrado que este compuesto es capaz de aumentar el contenido y la liberación de TRH de células hipotalámicas en cultivo. Por lo tanto, utilizamos un sistema de cultivo de órgano (eminencia media) y un cultivo primario de células hipotalámicas, los cuales nos permiten mantener a las células por tiempos prolongados y en condiciones controladas bajo el tratamiento deseado.

La incubación de eminencias medias en cultivo hasta por 24 hrs en presencia de PDMK y ZPP  $10^{-5}$  M no modificó el contenido de TRH (Publicación # 2). De igual manera, el tratamiento de células hipotalámicas y corticales en cultivo con ambos compuestos no afectó ni el contenido ni la liberación basal o estimulada de TRH, aún cuando la PGAI y la PE se encontraban notablemente inhibidas después de 24 hrs en presencia de los inhibidores (Publicación # 2). Como se observa, nuestros resultados son opuestos a los de Faivre-Bauman (1986).

Con el propósito de determinar si las enzimas solubles son capaces de regular las concentraciones de algún otro NP en el SNC, estudiamos el efecto de estos inhibidores sobre el contenido y la liberación de LHRH, mejor sustrato que TRH de estas enzimas. La incubación in vitro de hipotálamo total o MBH (que contiene la mayor



parte de las terminales nerviosas del hipotálamo, es decir, la eminencia media) en presencia de PDMK y ZPP 10<sup>-5</sup> M, tampoco modificó el contenido y la liberación basal o estimulada por alto K<sup>+</sup> de LHRH (Publicación # 2). El tratamiento prolongado (13 hrs) con ambos compuestos in vivo tampoco modificó el contenido de este péptido en una gran variedad de regiones del cerebro y en la hipófisis, excepto en el bulbo olfatorio, región en la que observamos una disminución significativa en el contenido de LHRH (Publicación # 2).

La observación de una disminución en el contenido de TRH y LHRH únicamente en el bulbo olfatorio nos llevó a considerar la posibilidad de que en esta zona particular del cerebro la PGAI, la PE o ambas posean un papel regulatorio de las pozas de algunos NP diferente al del resto del cerebro. Por lo tanto, evaluamos el efecto de PDMK y ZPP sobre el contenido de TRH y la actividad de ambas enzimas en esta región a distintos tiempos de tratamiento. La hipótesis de trabajo que manejamos fue que una disminución en el contenido de TRH y LHRH podría deberse a la inducción de alguna de las dos enzimas solubles. En este sentido, Friedman y col. (1986) han demostrado la inducción de la PGAI por uno de sus inhibidores específicos (el 5-oxoprolinal) en células GH<sub>3</sub>.

El tratamiento in vivo con ambos inhibidores produce una inhibición de la PGAI en el bulbo olfatorio menos pronunciada que en el resto del cerebro. La PE, por otra parte, no se inhibe en el bulbo olfatorio a ninguno de los tiempos de tratamiento estudiados (Publicación # 2). El hecho de que el ZPP no inhiba a la PE en el bulbo olfatorio no se debe a la presencia de una isoenzima insensible al inhibidor en esta región, puesto que estudios in vitro

muestran que la PE de bulbo olfatorio, hipotálamo y cerebro frontal de ratón es igualmente inhibida por ZPP (Tabla 5). Por otra parte, no observamos la inducción de ninguna de las enzimas en ninguna condición experimental, así como tampoco efectos cruzados de PDMK y ZPP sobre las actividades de PGAI y PE (datos no mostrados).

El efecto de los inhibidores sobre los niveles de TRH en el bulbo olfatorio sólo se observó después de una exposición prolongada a los inhibidores, y nuevamente resultó en una disminución en el contenido del péptido. Tratamientos cortos in vivo o in vitro no modificaron el contenido y la liberación de TRH en esta región (Publicación # 2).

En conclusión, nuestros resultados muestran que las enzimas solubles PGAI y PE no regulan las concentraciones intracelulares de TRH o LHRH en el cerebro de roedores. Por otra parte, el hecho de que los inhibidores específicos de la PGAI y de la PE no modifiquen los niveles recuperables de TRH liberado al medio (Publicaciones 1 y 2), sugiere que estas enzimas tampoco participan en la inactivación extracelular del TRH. Esta hipótesis se ve apoyada por resultados que muestran que estas enzimas no se liberan al medio en respuesta a una depolarización (J. Miranda, P. Joseph-Bravo y J. L. Charli, no publicado; Faivre-Bauman y col., 1936).

## II.- Regulación de los niveles extracelulares de TRH : mecanismo de inactivación del TRH liberado.

Dado que la PGAI se encuentra como una ectoenzima en membranas plasmáticas sinaptosomales, pensamos que la enzima se localiza de manera adecuada para inactivar al TRH liberado al espacio sináptico. Para confirmar esta hipótesis, medimos la liberación de TRH de

Tabla 5.- Efecto de PDMK y ZPP in vitro sobre la actividad de PGAI y PE en cerebro de ratón.

Región		PGAI Actividad especifica	PE Actividad especifica
BO	C	0.17 ± 0.05	2.47 ± 0.24
	I	-	0.065 ± 0.04
H	C	0.14 ± 0.04	1.22 ± 0.08
	I	-	-
CF	C	0.14 (2)	3.46 ± 0.47
	I	-	-

Rebanadas de bulbo olfatorio (BO), hipotálamo (H) o cerebro frontal (CF) se incubaron en KRB por 30 min en presencia de PDMK y ZPP 10<sup>-5</sup> M, se reemplazó el medio por otros 30 min con los inhibidores, se hizo un lavado exhaustivo con medio fresco y se preparó un homogenado a partir de las rebanadas correspondientes para posteriormente determinar la actividad de PGAI y PE. La actividad específica se expresa como nmolas/min/mg proteína soluble. El límite de sensibilidad del ensayo fue de 1.25 nmolas de β-naftilamina en la curva estándar.  
n = 3 en todos los casos, excepto donde se indica entre paréntesis.  
C = control.  
I = inhibidores.

rebanadas de hipotálamo de rata en presencia de una serie de inhibidores de la PGAI (O'Connor y O'Cuinn, 1985b) (Tabla 4). De los 4 péptidos probados, sólo el LHRH tuvo un efecto sobre los niveles recuperables de TRH liberado (Fig. 14), lo cual coincide con el hecho de que este péptido es el mejor inhibidor competitivo de la enzima. Una concentración de LHRH igual al valor de la  $K_i$  por la enzima purificada (20  $\mu$ M) produce un aumento de 10 veces en los niveles recuperables de TRH liberado (Publicación # 3 y Figs. 14 y 15). Tal efecto no se debe a una inhibición de la PGAI o de la PE (Publicaciones 1 y 2), sino posiblemente a la inhibición de la PGAI. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que tal efecto pueda involucrar la interacción de LHRH con sus receptores sobre neuronas TRH-érgicas. Por otra parte, el contenido de TRH en hipotálamos incubados en presencia de estos inhibidores no se modificó (Tabla 6), a excepción de una disminución inesperada en presencia de pGlu-His-Gli, resultado difícil de interpretar, ya que ésto sólo ocurrió en un experimento (Tabla 6).

Un análisis más profundo de estos estudios reveló que los 4 péptidos usados tienen un grado importante de cruce en el RIA de TRH (Tabla 7 y Fig. 16). El análisis de las curvas de desplazamiento de los péptidos en el RIA de TRH, comparadas con la curva de TRH auténtico, así como el análisis de Scatchard de la asociación de TRH y LHRH al anticuerpo de TRH, revelaron una diferencia de 10 000 veces entre estos dos péptidos ( $K_a$  TRH = 0.54 nM,  $K_a$  LHRH = 5.26  $\mu$ M), así como un cruce muy fuerte en el RIA de TRH, cuyo orden correlaciona con el orden de potencia de los péptidos para inhibir a la PGAI.

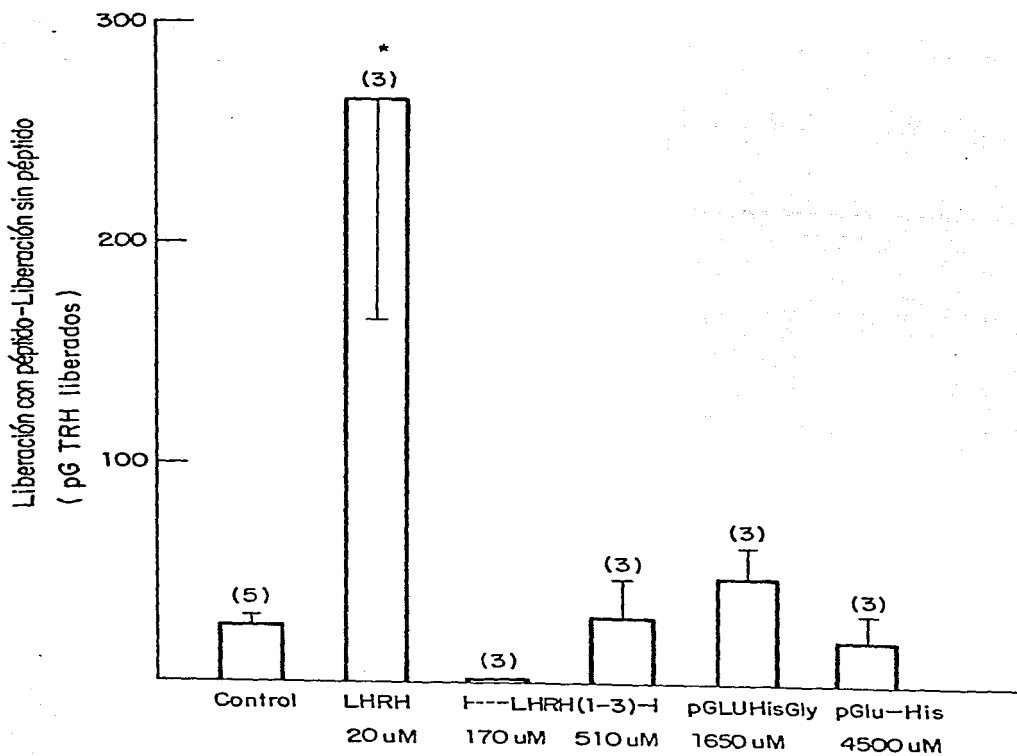


Fig. 14.- Efecto de algunos competidores de PGAI1 sobre la recuperación de hipotálamo de rata *in vitro*. Las condiciones de incubación son similares a las de la figura 16. \* p 0.025

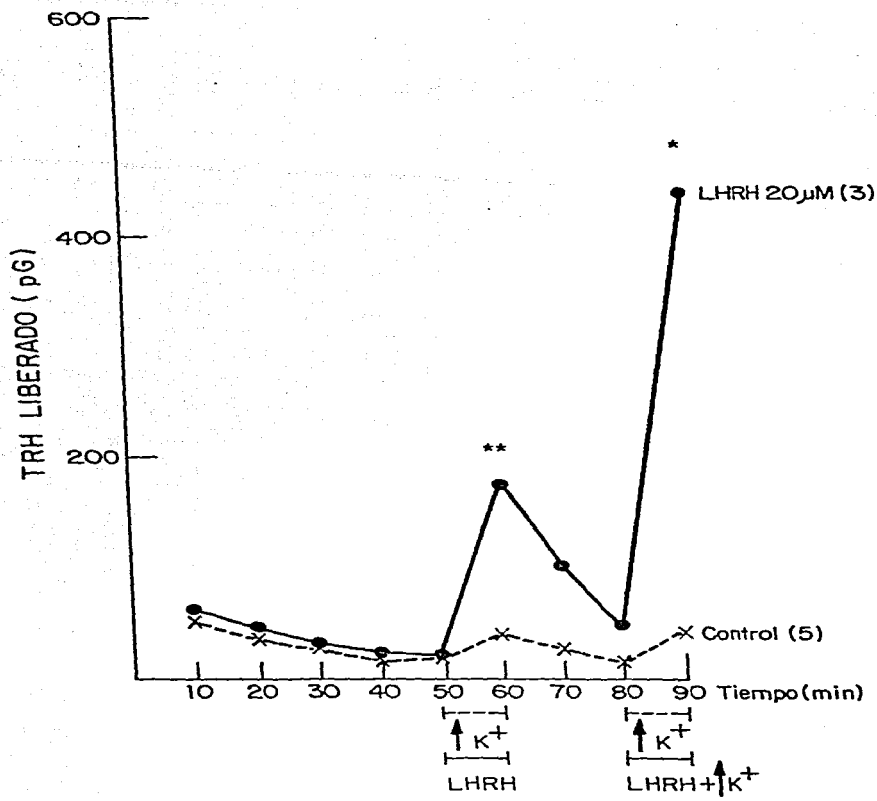


Fig. 15.- Efecto de LHRH sobre la recuperación de TRH liberado de hipotálamo de rata in vitro.

\* p 0.025  
 \*\* p 0.005

Tabla 6.- Efecto in vitro de algunos inhibidores de la PGIII sobre el contenido de TRH en hipotálamo de rata.

Péptido	Concentración ( $\mu$ M)	TRH total (pg)	pg TRH/mg proteína
Control	KCl 56mM	6747 $\pm$ 466 (4)	3473 $\pm$ 190 (4)
		6327 (2)	3116 (2)
LHRH	20	8823 $\pm$ 1049 (3)	3791 $\pm$ 355 (3)
		6483 $\pm$ 1327 (4)	3485 $\pm$ 1007 (4)
	60	5759 $\pm$ 900 (3)	2694 $\pm$ 58 (3)
		7663 $\pm$ 1813 (4)	3395 $\pm$ 716 (4)
	200	6715 $\pm$ 471 (3)	2908 $\pm$ 280 (3)
	8544 $\pm$ 2424 (4)	3764 $\pm$ 988 (4)	
LHRH (1-3)	170	10398 $\pm$ 2788 (3)	4174 $\pm$ 149 (3)
	510	12067 $\pm$ 3055 (3)	4861 $\pm$ 981 (3)
pGlu-His-Gli	1650	7652 $\pm$ 1798 (3)	3083 $\pm$ 921 (3)
		4486 $\pm$ 2155 (3)*	1439 $\pm$ 545 (3)*
pGlu-His	4500	8519 $\pm$ 2999 (3)	3660 $\pm$ 639 (3)

El contenido de TRH se midió por RIA en los tejidos después de la incubación con los péptidos por 90 min. El número de determinaciones se indica entre paréntesis y corresponde a dos experimentos diferentes. \*  $p < 0.01$

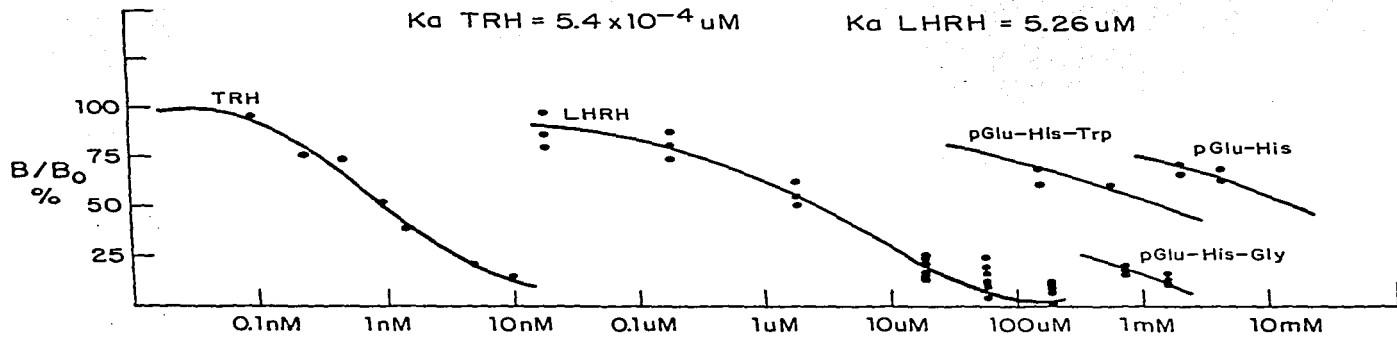


Fig. 16.- Curvas de desplazamiento de algunos inhibidores de PGaII en el RIA de TRH.



Tabla 7.- Valores de cruce de los inhibidores de la PGAI en el RIA de TRH.

Péptido	Concentración final ( $\mu$ M)	Material inmunoreactivo (pg)
LHRH	20	313
	60	738
	200	1000
LHRH (1-3)	170	67
	510	79
pGlu-His-Gli	1650	284
pGlu-His	4500	37
pGlu His OBzl tioamida	100	18
CPHNA	100	43

Probablemente los valores de cruce de los inhibidores hidrofóbicos (pGlu His OBzl tioamida y CPHNA) están sobrevalorados, ya que cierta proporción se pega al tejido; en esta tabla los valores están determinados en KRB sin tejido. Por ejemplo, hemos determinado que aproximadamente un 35% de CPHNA se pega al tejido (no se muestra).

Sin embargo, con el objeto de evaluar con precisión el efecto de LHRH sobre la recuperación de TRH liberado de hipotálamo de rata, separamos el inhibidor (LHRH) del TRH liberado por cromatografía en cartuchos de Sep-Pak C<sub>18</sub>, y posteriormente llevamos a cabo el RIA de TRH. En la Fig. 17 se muestra la dosis-respuesta aparente de LHRH sobre la recuperación de TRH liberado de hipotálamo de rata. Cuando analizamos el cruce de muestras de TRH y LHRH separadas cromatográficamente usando distintas concentraciones de los péptidos, observamos que la unión de LHRH al anticuerpo de TRH se satura rápidamente (Fig. 18), aún a concentraciones relativamente bajas de LHRH (1 y 4  $\mu\text{M}$ ). Por otro lado, el contenido de TRH en hipotálamo de rata incubado en presencia de distintas concentraciones de LHRH por 90 min no cambia (Fig. 19).

Estos resultados en conjunto demostraron que el método de separación utilizado no es lo suficientemente eficiente para separar el LHRH del TRH liberado, ésto es, una proporción importante del LHRH eluye junto con TRH, y este material cruza significativamente en el RIA de TRH, lo cual hace imposible evaluar de manera adecuada el efecto del LHRH sobre la recuperación de TRH liberado de diferentes áreas del cerebro, que pudiera estar ligado a una inhibición de la PG<sub>II</sub>. Por lo tanto, no sabemos que proporción del "efecto" se cruce en el RIA de TRH, que parte se debe a inhibición de la PG<sub>II</sub>, y que parte corresponde a un efecto sobre receptores a LHRH. Aunque estos estudios no fueron adecuados para responder a la pregunta que nos habíamos planteado, es evidente que esta información podría ser importante en estudios de estructura-función en relación al anticuerpo de TRH y su interacción con péptidos estructuralmente semejantes al TRH.

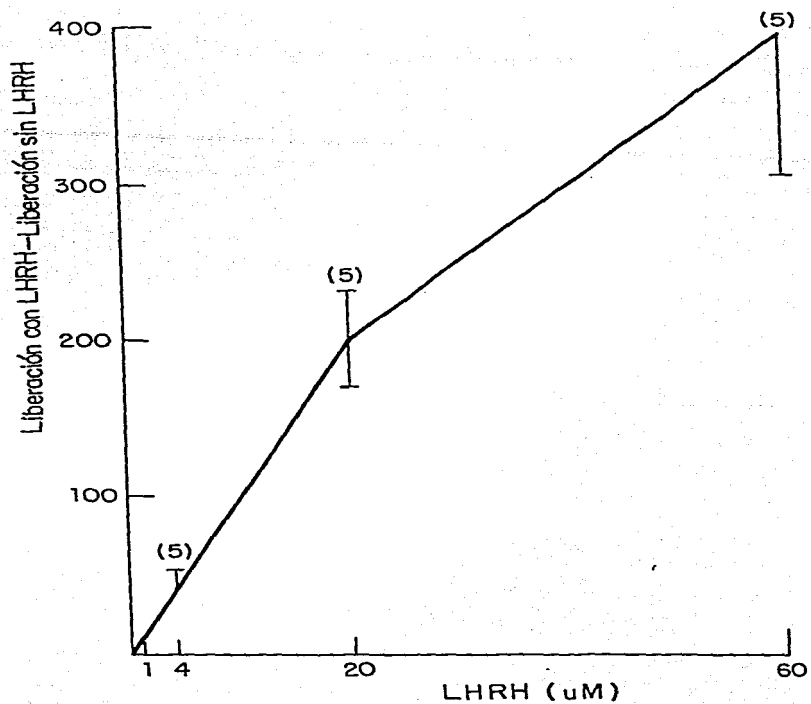


Fig. 17.- Efecto de LHRH sobre la recuperación de TRH liberado de hipotálamo de rata in vitro. Dosis- respuesta.

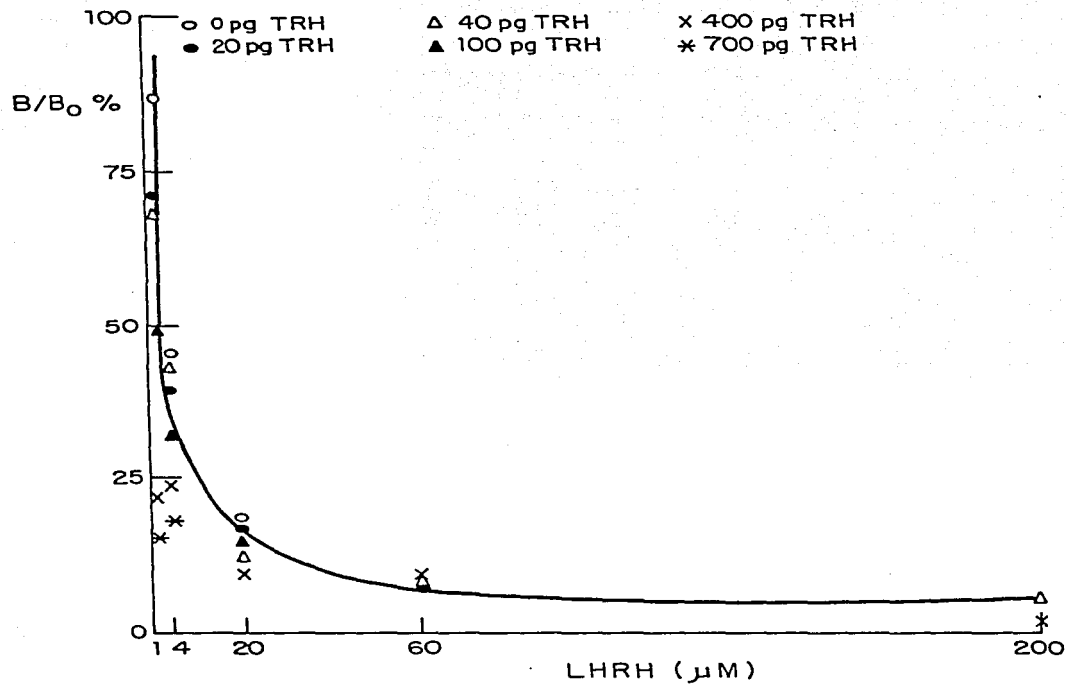


Fig. 18. Curva de cruce de LHRH en el RIA de TRH a distintas concentraciones de TRH

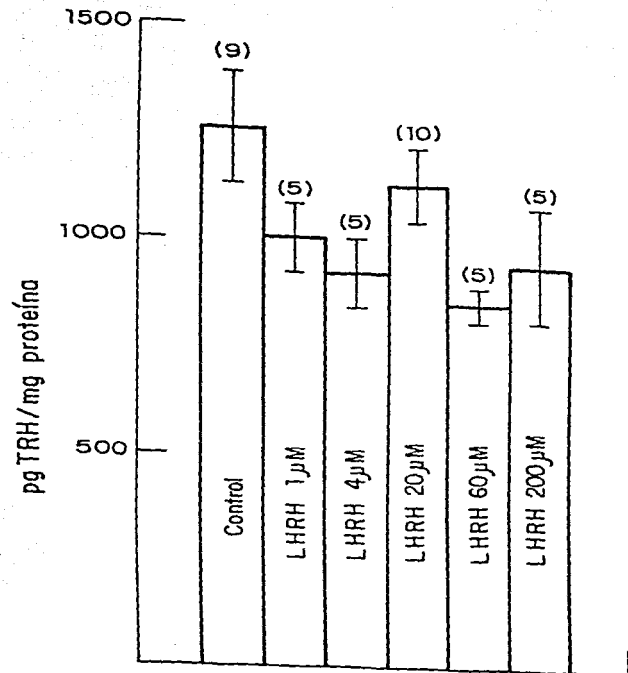
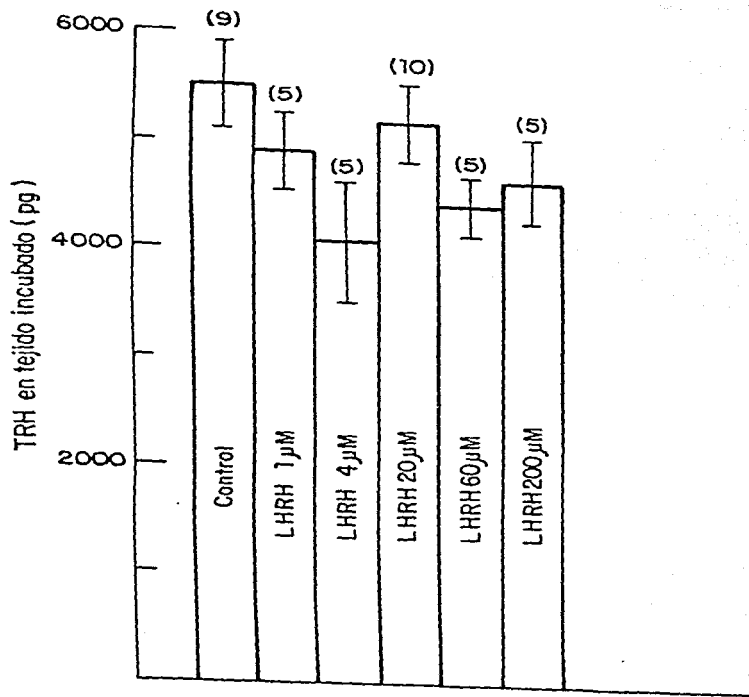


Fig. 19.- Efecto de varias concentraciones de LHRH sobre el contenido de TRH en hipotálamo de rata incubado

Paralelamente a estos estudios, el Dr. S. Wilk sintetizó en su laboratorio dos inhibidores específicos de la PGAI, el pGlu His OBz1 tioamida y el CPHNA (Fig. 12). Sólo el CPHNA tuvo efecto sobre la recuperación del TRH liberado de hipotálamo de rata (Fig. 20 y Publicación # 4), lo cual está de acuerdo con el hecho de que este inhibidor es el más potente sobre la enzima purificada ( $K_i = 8-10 \mu\text{M}$ ). Ninguno de los dos compuestos modificó el contenido de TRH en el hipotálamo incubado (Tabla 8).

Por otra parte, el CPHNA no interactúa con receptores a TRH y no inhibe ni a la PGAI ni a la PE (Publicación # 4). Aunque este compuesto inhibe casi totalmente a la PGAI a una concentración de  $10^{-4}$  M en una preparación homogénea, la actividad de la enzima es inhibida sólo un 40% en preparaciones crudas de cerebro. Sin embargo, a esta concentración el inhibidor es capaz de aumentar 2 veces el nivel recuperable de TRH liberado basalmente y en respuesta a estimulación con alto  $K^+$  de hipotálamo de rata (Publicación # 4), sin cambiar el contenido de péptido en el tejido en diferentes condiciones de incubación (Tabla 9).

El CPHNA aumenta 3 y 5 veces la recuperación de TRH liberado de núcleo accumbens-septum lateral y bulbo olfatorio, respectivamente, sin modificar el contenido del péptido en los tejidos incubados (Publicación # 4).

Por otra parte, una concentración mayor de CPHNA ( $2 \times 10^{-4}$  M) no tiene un efecto distinto al producido por una concentración de  $10^{-4}$  M (Fig. 21).

El efecto de CPHNA observado sobre la recuperación de TRH liberado al medio en las regiones estudiadas, correlaciona con la actividad específica de la PGAI medida en estas mismas áreas

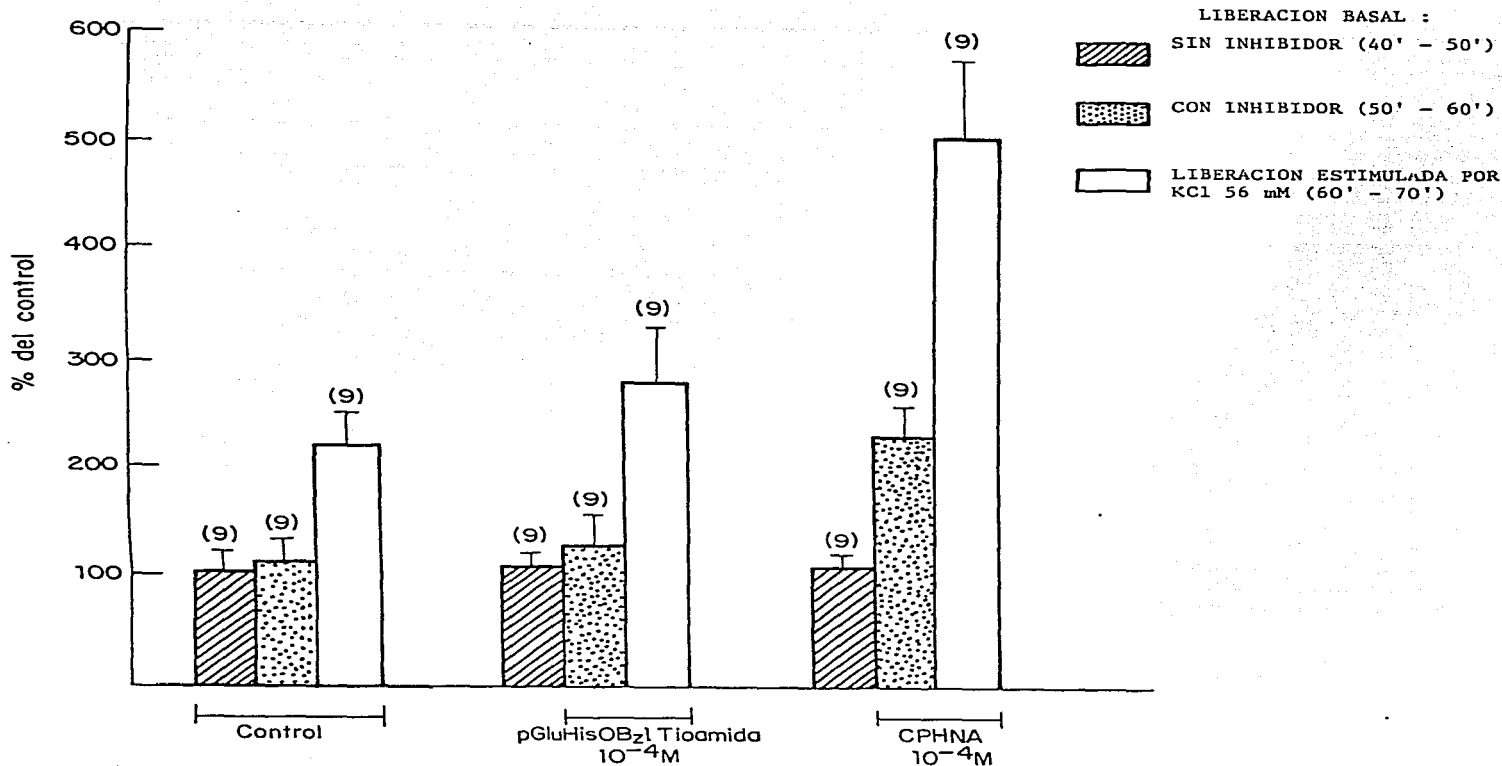


Fig. 20.- Efecto de tíoamida y CPHNA sobre la recuperación de TRH liberado de hipotálamo de rata in vitro. Los datos se expresan como porcentaje de TRH liberado en relación a la liberación basal con inhibición.

Tabla 8.- Efecto in vitro de pGlu His OBzl tioamida y CPHNA sobre el contenido de TRH en hipotálamo de rata.

Condición	TRH total (pg)	pg TRH/mg proteína
Sin incubar	11 729 ± 587 (5)	2 152 ± 195 (5)
Control	9 544 ± 505 (9)	2 138 ± 189 (9)
pGlu His OBzl tioamida	9 771 ± 370 (10)	2 214 ± 126 (10)
CPHNA	8 311 ± 1268 (10)	1 818 ± 248 (10)

El contenido de TRH se midió por RIA en los tejidos incubados por 70 min en presencia o ausencia de los inhibidores, los cuales estuvieron presentes a una concentración final de  $10^{-4}$  M durante el periodo de incubación 50 - 70 min.



Tabla 9.- Efecto de CPHNA in vitro sobre el contenido de TRH en hipotálamo de rata.

Condición	TRH total (pg)	pg TRH/mg proteína
A	5 688 ± 289 (7)	1 868 ± 90 (7)
B	5 084 ± 479 (8)	1 667 ± 209 (8)
C	6 308 ± 540 (7)	1 957 ± 172 (7)
D	4 500 ± 461 (7)	1 304 ± 148 (7)
E	4 932 ± 803 (8)	1 493 ± 155 (8)

El contenido de TRH se determinó por RIA en los tejidos después de haber sido incubados por 90 min. El CPHNA se usó a una concentración

-4

final de 10 M. El número de determinaciones se indica entre paréntesis. Las condiciones de incubación fueron las siguientes :

A = liberación basal control.

B = liberación basal, CPHNA presente en el periodo 50 - 90 min.

C = liberación estimulada control, alto K<sup>+</sup> presente en el periodo 50 - 90 min.

D = liberación estimulada, CPHNA y K<sup>+</sup> presentes en el periodo 50 - 90 min.

E = liberación basal y estimulada, CPHNA presente en el periodo 50 - 90 min, y alto K<sup>+</sup> presente en el periodo 70 - 90 min.

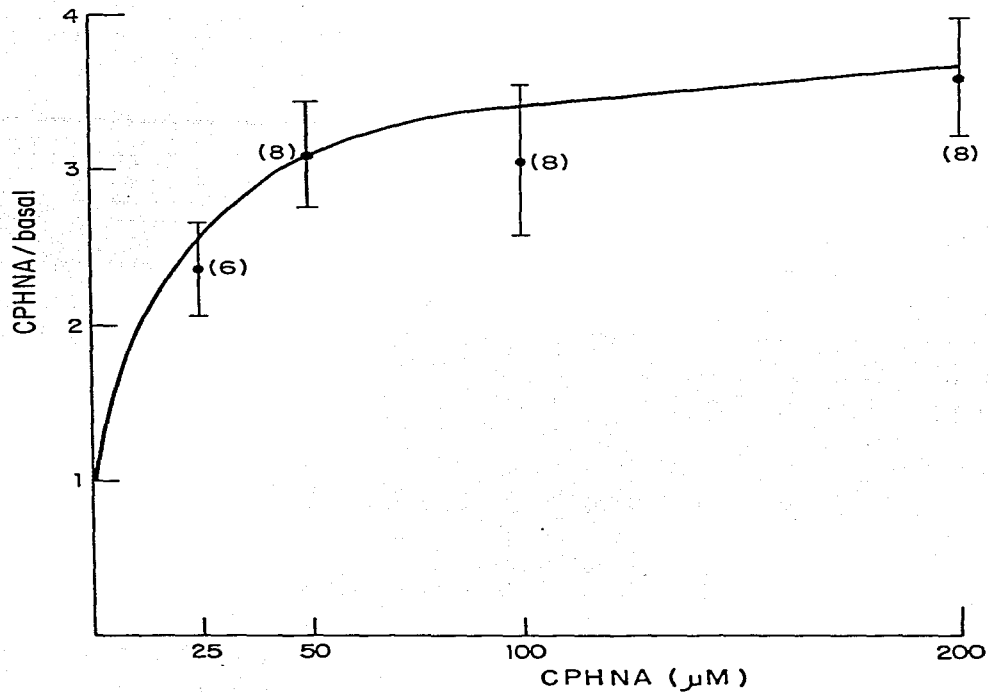


Fig. 21.- Efecto de CPHNA sobre la recuperación de TRH liberado de bulbo olfatorio de rata *in vitro*. Dosis- respuesta. Los datos se expresan como el cociente de TRH liberado en presencia del inhibidor con respecto al liberado en ausencia del compuesto.

(Publicación # 4). Además, el efecto de este inhibidor es específico para TRH, es decir, se da a nivel de la inhibición de la PGAI, ya que ni la liberación basal de <sup>3</sup>H-GABA o Met-enc (Publicación #4) y de <sup>3</sup>H-dopamina (Fig. 22) se modifican por la presencia del inhibidor, aunque la liberación estimulada por  $K^+$  en los dos primeros casos es disminuida significativamente. El contenido de Met-enc en tejido incubado en presencia del inhibidor no se ve modificado (Publicación # 4).

En conclusión, nuestros resultados con el inhibidor específico de la PGAI, el CPHNA, sugieren que esta enzima podría ser la responsable de la inactivación fisiológica del TRH liberado en sinapsis, ya que probablemente se encuentra localizada estratégicamente, cerca del sitio de liberación del TRH, para llevar a cabo esta función.

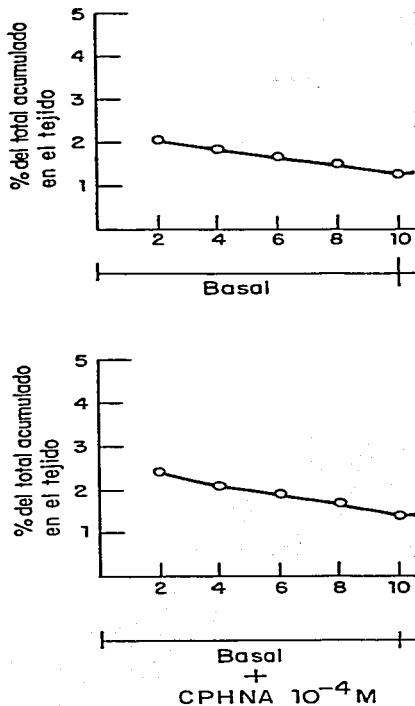


Fig. 22.- Efecto de CPHNA sobre la liberación basal de  $^3\text{H}$ -dopamina del núcleo accumbens de rata in vitro. La superfusión se llevo a cabo en condiciones similares a las descritas por Kerwin y Pycock (1979)/Los datos se expresan como el porcentaje de  $^3\text{H}$ -dopamina en el medio de superfusión en relación al total acumulado del tejido, el cual fue de 84% en condiciones control y de 83% en presencia del inhibidor. (n=2).

# NEUROPEPTIDES

SPECIFIC INHIBITORS OF PYROGLUTAMYL PEPTIDASE I AND PROLYL ENDOPEPTIDASE DO NOT CHANGE THE IN VITRO RELEASE OF TRH OR ITS CONTENT IN RODENT BRAIN

Jean Louis Charli<sup>†</sup>, Milagros Mendez<sup>†</sup>, Patricia Joseph-Bravo<sup>†</sup>  
and Sherwin Wilk<sup>\*</sup>

<sup>†</sup>Departamento de Bioquímica, Centro de Investigaciones sobre  
Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM  
Apartado Postal 70-479  
Mexico, D.F. 04510, Mexico

<sup>\*</sup>Department of Pharmacology  
Mount Sinai School of Medicine  
New York, NY 10029 U.S.A.  
[Reprint requests to J.L.C.]

## ABSTRACT

Pyroglutamyl diazomethyl ketone and N-benzyloxycarbonyl prolyl prolinyl, specific inhibitors of pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase respectively, were used to study the possible role of these enzymes in the regulation of thyrotropin releasing hormone turnover. In vitro thyrotropin releasing hormone release by male rat hypothalamic slices was studied. Combined in vitro treatment with  $10^{-5}$ M of both inhibitors totally inhibited both enzymatic activities. The treatment did not affect basal or 56 mM  $K^+$  induced thyrotropin releasing hormone release or thyrotropin releasing hormone levels in slices. Repeated combined intraperitoneal injections of the two inhibitors for up to 12 hours produced a 70%-95% reduction in mouse brain pyroglutamyl peptidase I specific activity and a 65%-85% reduction in prolyl endopeptidase specific activity. Thyrotropin releasing hormone levels were unaffected by this treatment in all regions tested. The data suggest that these two enzymes are not involved in the intra- or extracellular control of thyrotropin releasing hormone levels in brain or hypophysis.

## INTRODUCTION

Mechanisms that control neuropeptide concentration inside or outside the neuron are poorly understood. Recent evidence suggests that membrane-bound peptidases may be responsible for extracellular degradation (1). However, whereas a large number of soluble peptidases have been described, it is still unclear whether neuropeptides are degraded by these enzymes in vivo. With

Abbreviations used: TRH, thyrotropin releasing hormone; ZPP, N-benzylloxycarbonyl prolyl prolinal; KRB, Krebs Ringer Bicarbonate; RIA, radioimmunoassay; PDMK, pyroglutamyl diazomethyl ketone; MBH, medial basal hypothalamus, ZGPDMK, N-benzylloxycarbonyl glycyl prolyl diazomethyl ketone. respect to thyrotropin releasing hormone (TRH), two enzymes: pyroglutamyl peptidase I (E.C. 3.4.19.3) and prolyl endopeptidase (E.C. 3.4.21.26) can degrade this peptide in vitro (2). The subcellular distribution of these enzymes in rat brain however does not correlate with TRH hormone distribution, since they are mainly found in the cytosol whereas most of the peptide is in the nerve terminals (3). We decided to test whether these enzymes were able to regulate the levels of TRH by using specific inhibitors to each of them. Pyroglutamyl peptidase I is inhibited irreversibly by pyroglutamyl diazomethyl ketone (PDMK) and prolyl endopeptidase by N-benzylloxycarbonyl prolyl prolinal (ZPP) both in vivo and in vitro (4,5,6). We have studied the effect of these inhibitors on TRH content in different brain areas as well as on the in vitro release of TRH from hypothalamus under basal and stimulated conditions.

#### MATERIALS AND METHODS

Male Wistar rats (200-300 g) and male CD-1 mice (20-35 g) were fed a commercial Purina laboratory chow diet ad libitum and maintained on a 12 hr light-dark period.

In vivo treatment of mice was by intraperitoneal injections of the drugs dissolved in water (PDMK) or 10% methanol (ZPP). A volume of 100  $\mu$ l per 25g body weight was injected. Assay of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I specific activities was performed on the remainder of the brain not used for TRH RIA.

TRH release from rat hypothalamic slices was studied between 11 h and 14 h following inhibitor administration essentially as described (M. Mendez, P. Joseph-Bravo, M. Cisneros, M.A. Vargas and J.L. Charli, submitted): 250  $\mu$ m thick slices from one hypothalamus were deposited into a syringe, cut at the bottom, and melted onto a nylon mesh. The syringe was transferred into a vial containing 500  $\mu$ l KRB (pH 7.4) and incubated at 37°C for 10 min with gentle agitation under 95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> atmosphere. After this incubation period, the syringe was transferred to a second vial for 10 min and this was repeated up to a sixth transfer. TRH released during the sixth 10 min incubation period was termed "basal release of TRH". After this, the syringe was transferred into a vial containing KRB with 56 mM KCl and incubated for 10 min. TRH released in this vial was termed "stimulated release of TRH". Immediately after each transfer, ice cold acetic acid (20% final concentration) was added to the media. After the last incubation, the tissues were sonicated in 20% acetic acid.

The acidified media were centrifuged 30 min at 4°C (12100g) and the supernatant evaporated to dryness. The residue was extracted twice with 90% methanol and the dried supernatant used for RIA. The 20% acetic acid tissue homogenates were centrifuged at 12100g for 10 min at 4°C and the supernatant evaporated. The residue was extracted with 90% methanol, and centrifuged. The supernatant was removed, dried and the residue subjected to RIA which was performed as described (7).

For in vitro treatment, slices were incubated with PDMK and ZPP (10<sup>-5</sup>M final). The activities of pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase

were measured after 50 min incubation in the presence of the inhibitors. In order to eliminate the inhibitors present in the extracellular fluid, slices were repeatedly washed for 10 min at 37°C with KRB on a Millipore filtration apparatus. They were homogenized in 500  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2mM EDTA, 2 mM DTT, and centrifuged at 12,100 g for 10 min. Prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I activities were assayed using  $10^{-6}$ M [ $^3$ HPro]TRH (New England Nuclear) as a substrate essentially as described (8). Proteins were determined by the method of Lowry (9).

### RESULTS

TRH release from MBH or hypothalamic slices was significantly increased in response to 56 mM  $K^+$  stimulation (Table 1) as reported previously (7). Preincubation of slices with  $10^{-9}$ M PDMK and ZPP produced total inhibition of pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase activities (not shown). Neither the time course of TRH release during the stabilization period (from 0 to 50 min, (data not shown) nor the basal or stimulated release were modified by treatment of the hypothalamic slices with  $10^{-9}$ M PDMK and ZPP (Table 1). The same results were obtained whether the data were analyzed as the mean of all the experiments (Table 1) or by analyzing each individual experiment. If the hypothalamus was divided before slicing between MBH and rest of hypothalamus, TRH release from each of these regions was still unaffected by the inhibitors (Table 1). The TRH content of hypothalamic, MBH or extra MBH hypothalamic slices was not modified by inhibitor treatment (Table 1).

TABLE I

Effects of PDMK and ZPP on TRH content and release from rat hypothalamic slices

Region	Basal Release <sup>a</sup>	Stimulated Release <sup>b</sup>	Content <sup>c</sup>
<sup>A</sup> Hypothalamus			
Control	100 $\pm$ 8(19) <sup>d</sup>	2.14 $\pm$ 0.47(13)	10.6 $\pm$ 1.1(17)
Treated	98 $\pm$ 10(19)	1.94 $\pm$ 0.28(14)	9.5 $\pm$ 0.9(17)
<sup>B</sup> MBH			
Control	100 $\pm$ 9(5)	not determined	1.8 $\pm$ 0.3(5)
Treated	82 $\pm$ 8(5)	not determined	2.6 $\pm$ 0.4(5)
<sup>C</sup> Rest of Hypothalamus			
Control	100 $\pm$ 12(5)	2.06 $\pm$ 0.20(5)	3.7 $\pm$ 0.7(5)
Treated	129 $\pm$ 18(5)	2.42 $\pm$ 0.22(5)	3.4 $\pm$ 0.5(5)

<sup>a</sup>Data presented in part A are the mean of 4 independent experiments. Because basal release varied from experiment to experiment, the data was normalized to the mean of each experiment (taken as 100%). Mean basal release varied from 60 to 122 pg per 10 min for the hypothalamic slices and was 20 pg for MBH and 83 pg for "rest of hypothalamus" slices.

<sup>b</sup>Values are ratio of stimulated release over basal release.

<sup>c</sup>ng TRH per slice from one region after incubation.

<sup>d</sup>Mean  $\pm$  S.E.M. of the number of determinations indicated in parenthesis.

We also performed in vivo experiments with differing paradigms of inhibitor injection to male mice. In 2 of 3 experiments we determined at the time of sacrifice, the specific activities of pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase in brain. Although inhibition of the enzyme activities ranged from 65% to 95%, TRH levels in the various regions were not affected. One exception was the olfactory bulb where there was an unexpected decrease in the content of TRH (Table 2). These data were independent of the time of sacrifice (9 A.M., 12 A.M. or 9 P.M.).

TABLE 2

In Vivo Effects of PDMK and ZPP on TRH Levels in Male Mice

Experiment ID	TREATMENT		
	None <sup>a</sup>	Vehicle	Inhibitor
	Dg TRH/structure		
Median eminence-arcuate nucleus		1295 ± 121(5) <sup>c</sup>	1295 ± 290(5)
Rest of hypothalamus		8572 ± 727(5)	8211 ± 959(5)
Hypophysis		81 ± 6(5)	84 ± 16(5)
Brain stem		1675 ± 266(5)	1284 ± 135(5)
Nucleus accumbens-lateral septum		1992 ± 308(5)	1916 ± 229(5)
Pancreas		17 ± 1(4)	19 ± 1(5)
Experiment IID			
Median eminence-arcuate nucleus	700 ± 239(3)	887 ± 127(5)	759 ± 149(5)
Rest of hypothalamus	5627 ± 749(3)	7114 ± 982(5)	7288 ± 544(5)
Hypophysis	71 ± 19(3)	97 ± 17(5)	113 ± 43(5)
Brain stem	1804 ± 820(3)	1611 ± 122(5)	1264 ± 314(5)
Nucleus accumbens-lateral septum	868 ± 382(3)	979 ± 274(5)	837 ± 119(5)
Experiment IIIe			
Hypothalamus <sup>f</sup>	3656 ± 942(3)	2635 ± 68(2)	3109 ± 430(4)
Hypophysis	not detected	not detected	not detected
Brain stem	420 ± 115(4)	373 ± 97(5)	475 ± 40(5)
Nucleus accumbens-lateral septum	1525 ± 163(5)	1221 ± 161(4)	1390 ± 294(5)
Olfactory bulb	1282 ± 196(5)	1148 ± 42(5)	893 ± 86(4)g

Legend for Table 2

- <sup>a</sup>This group was maintained under the same conditions as vehicle and inhibitor groups except that animals were not injected. This group was included to determine whether repeated injections of vehicle could affect TRH levels.
- <sup>b</sup>ZPP (1.25 mg/kg) and PDMK (0.1 mg/kg) were injected twice simultaneously, at 9 and 11 A.M.. Sacrifice was at 12 A.M. At this time pyroglutamyl peptidase I specific activity was decreased by 95% and prolyl endopeptidase by 65%.
- <sup>c</sup>Mean ± standard error of the mean of the number of determinations indicated in parenthesis.



- <sup>d</sup>Intraperitoneal injections of ZPP (5 mg/kg) were at 8 P.M. and at 12 P.M., followed by 1.25 mg/kg at 2 A.M., 4 A.M., 6 A.M. and 8 A.M. PDMK (0.1 mg/kg) was injected at 8 P.M. and 2 A.M. Sacrifice was at 9 A.M. At time of sacrifice pyroglutamyl peptidase I specific activity was decreased by 79% and prolyl endopeptidase by 84%.
- <sup>e</sup>Intraperitoneal injections of ZPP and PDMK were as described for experiment II except that injections started at 8 A.M. and sacrifice was at 9 P.M.
- <sup>f</sup>These hypothalami were previously incubated as described for the release experiments before extraction and assay for TRH.
- <sup>g</sup> $p < 0.025$  compared to vehicle injected group.

#### DISCUSSION

The data presented in this communication demonstrate that potent and specific inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I have no effect on TRH levels in brain, hypophysis or pancreas or release of TRH from hypothalamic slices. They are in agreement with unpublished results of I.C. Friedman, who showed that after a single intraperitoneal injection into mice of ZPP or PDMK either alone or in combination there was no effect on brain TRH levels 15, 30, 60 min or 12 hr later. Accordingly our data are consistent with the hypothesis that pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase does not control intracellular or extracellular levels of TRH.

If extracellular control is occurring, TRH released from the slices should be increased in the presence of ZPP and PDMK. Our data are supported by the fact that [<sup>3</sup>H]Pro<sup>1</sup>TRH added to the incubation medium of washed hypothalamic slices is not substantially degraded by pyroglutamyl peptidase I or prolyl endopeptidase (J.L. Charli, A. Baez, M.A. Vargas, C. Cruz, and P. Joseph-Bravo, submitted) and with results showing that these enzymes cannot be released upon 56 mM KCl stimulation (10; J. Miranda, J.L. Charli and P. Joseph-Bravo, unpublished).

If intracellular control occurs, TRH in the tissue and/or TRH release should be increased in the presence of the inhibitors. Failure to detect any effect of the inhibitors is consistent with the subcellular distribution of the enzymes in rat brain which suggests that they are excluded from the synaptosomal compartment (3) where more than 50% of TRH is present.

Our data disagree with the results of faivre-Bauman et al., (10) who showed that ZGPDMK, a potent inhibitor of prolyl endopeptidase, which also inhibits pyroglutamyl peptidase I, increased TRH levels and release in hypothalamic cell cultures. The discrepancy between the two studies may be due to one or more of the following causes: (a) TRH subcellular distribution in neurons in culture is different from its distribution *in vivo* or in brain slices. In this regard it should be noted that ZGPDMK injected *in vivo* was without effect on TRH levels in the hypothalamus (K. Bauer, personal communication). (b) Intracellular TRH turnover is very slow (> 12 h). (c) prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I are not saturated by their substrates *in vivo* so that only a complete inhibition is necessary to see an effect. While this possibility exists, our *in vitro* data, where the enzymes were 100% inhibited do not support this argument. (d) The effect of ZGPDMK on TRH release and content in hypothalamic cell cultures may be due to a non-specific effect. The fact that ZGPDMK inhibits two enzymes with widely differing substrate specificities makes this a reasonable possibility. Further studies testing

the effect of our inhibitors on primary cell cultures are necessary to clarify these points.

In conclusion our data suggest that pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase do not control extra- or intracellular TRH levels in brain. On the contrary, the narrow specificity membrane-bound pyroglutamyl peptidase II (11) may be adequately localized for degrading extracellular TRH in brain (J.L. Charli, A. Baez, M.A. Vargas, C. Cruz and P. Joseph-Bravo, submitted).

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the excellent technical assistance of Dr. E. Mata and M. Cisneros and the skillful typing of this manuscript by V. Aldama and B.Y. Martin. This work was supported in part by grants from CONACYT (IIBXNA-021044) and Fundacion Miguel Aleman A.C. S.W. was supported by NIH grant NS-17392 and a Research Scientist Award MH-00350.

#### REFERENCES

1. White, J.D., Stewart, K.D., Krause, J.E. and McKelvy, J.F. (1985) Biochemistry of peptide-secreting neurons. 65: 553-606.
2. Bauer, K. (1983) Biochemical properties of TRH-inactivating enzymes in Griffiths, E.C. and Bennett G.W. (eds), Thyrotropin Releasing Hormone, Raven Press, New York pp. 103-107.
3. Torres, H., Charli, J.L., Gonzalez-Noriega, A., Vargas, M.A. and Joseph-Bravo P. (1986) Subcellular distribution of the enzymes degrading Thyrotropin Releasing Hormone and metabolites in rat brain, Neurochem. Intl. 9: 103-110.
4. Wilk, S., Friedman, T.C. and Kline, T.B. (1985) Pyroglutamyl diazomethyl ketone: potent inhibitor of mammalian pyroglutamyl peptide hydrolase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 130: 662-668.
5. Wilk, S. and Orłowski, M. (1983) Inhibition of rabbit brain prolyl endopeptidase by N-benzoyloxycarbonyl-prolyl-prolinal, a transition state aldehyde inhibitor. J. Neurochem. 41: 69-75.
6. Friedman, T.C., Orłowski, M. and Wilk, S. (1984) Prolyl endopeptidase: inhibition in vivo by N-benzoyloxycarbonyl-prolyl-prolinal. J. Neurochem. 42: 237-241.
7. Joseph-Bravo, P., Charli, J.L., Palacios, J.M. and Kordon, C. (1979) Effect of neurotransmitters on the *in vitro* release of immunoreactive Thyrotropin Releasing Hormone from rat mediobasal hypothalamus. Endocrinology 104: 801-806.
8. Bauer, K. and Kleinkauf, H. (1980) Catabolism of thyroliberin by rat adenohypophysial tissue extract. Eur. J. Biochem. 106: 107-117.
9. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, P. (1951) Protein measurement with the foelin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
10. Faivre-Bauman, A., Loudes, C., Barret, A., Tixier-Vidal, A. and Bauer, K. (1986) Possible role of neuropeptide degrading enzymes on thyroliberin secretion in fetal hypothalamic cultures grown in serum free medium. Neuropeptides 7: 125-138.
11. Wilk, S. (1986) Neuropeptide-specific peptidases: Does brain contain a specific TRH-degrading enzyme? Life Sciences 39: 1487-1492.

Received 12 April 1987  
Accepted 12 April 1987

Questionable role of prolylendopeptidase and pyroglutamate aminopeptidase I on peptide metabolism.

Milagros Mendez, Carlos Cruz, Patricia Joseph-Bravo, Sherwin Wilk\* and Jean-Louis Charli.

Departamento de Bioquímica de Proteínas, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM, Apdo. Postal 510-3 Cuernavaca Mor. 62271, Mexico.

\*Department of Pharmacology, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY 10029, USA.

Reprint requests to M. M.

ABSTRACT - We have studied the effect of specific inhibitors of the soluble enzymes PGA I and PE on TRH content in cell and organ cultures. We found that the enzyme inhibitors used did not change TRH content or release from hypothalamic cells and median eminences in culture. In addition, in vivo and in vitro treatment with these compounds did not modify content or release of another substrate of these enzymes, LHRH, from several brain regions, except in the olfactory bulb, where a decrease was observed as previously reported for TRH. In vivo time course experiments showed that although the enzymes are strongly inhibited, TRH only diminishes in this region. This work confirms that PGA I and PE do not control TRH and LHRH levels in vivo, and suggests that the inhibitors effect could be a non-specific one at some stage of the processing events of the peptide precursor.

Abbreviations used : ZPP, N-benzylloxycarbonyl prolyl prolinol; PDMK, pyroglutamyl diazomethyl ketone; Z-gly-proCNH, N-benzylloxycarbonyl glycyl prolyl diazomethyl ketone; RIA, radioimmunoassay.

## INTRODUCTION

Metabolic events that control intra and extracellular levels of physiologically active peptides have been extensively studied during the last decade. Current evidence suggests that some ectoenzymes located on the plasma membrane of nerve cells could be responsible for inactivating neuropeptides released at the synaptic cleft (1, 2). The narrow specificity membrane-bound pyroglutamate aminopeptidase II (PGAII) seems to fulfill this role in the extracellular degradation of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) (3, 4, 5, 6, 7).

Intracellular degradation is not as well understood. Although several cytosolic enzymes capable of degrading neuropeptides have been identified in vitro, their role *in vivo* remains to be proved. To soluble enzymes, pyroglutamate aminopeptidase I (E.C.3.4.13.2) (PGA I) and prolidase (E.C. 3.4.21.26) (PE) degrade TRH and other peptides in brain homogenates (8, 9, 10, 11). Subcellular distribution studies have shown, however, that only less than 10% of their total activity is present at the nerve terminal (12). Since neuropeptides are compartmentalized in granules it is unclear how these soluble enzymes could interact with them. Two specific inhibitors to these enzymes have been used to elucidate their role in

controlling TRH levels. Pyroglutamyl diazomethyl ketone (PDMK) irreversibly inhibits PGAI while N-benzyloxycarbonyl prolyl prolinal (ZPP) reversibly inhibits PE (13, 14, 15). We have reported that in vivo or in vitro treatment with these two inhibitors does not alter endogeneous or released TRH levels in brain, hypophysis or pancreas in spite of a strong enzyme inhibition (16). In contrast to our observation, Faivre-Bauman et al. (17), found that treatment of hypothalamic primary cell cultures with an inhibitor common to both enzymes does increase endogeneous and released TRH levels.

In order to test whether this controversy is due to low peptide turnover we decided to test PGAI and PE inhibitors in organ and cell culture. We also studied their effect on another peptide substrate of these enzymes, Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH), which has a lower  $K_m$  than TRH (18, 19). LHRH degradation has been shown to be regulated in different physiological conditions, e.g. in oestrus cycle (20, 21), although PE activity does not change (20). Finally, in olfactory bulb we performed further studies in an attempt to explain the lower TRH levels found after treatment with these inhibitors (16).

### MATERIALS AND METHODS

Materials TRH and LHRH were obtained from Peninsula Laboratories; pGlu-His-Pro-B-naphthylamide, Bachem Inc.; Na  $^{125}$ I (17 Ci /ml), ICN Radiochemicals. Media, sera, glutamine, antibiotic-mixture and vitamin mix were from Gibco Laboratories; cell culture plasticware from Costar and glucose from Difco Laboratories. All other chemicals were reagent grade from Sigma Chemical Co. or J.T. Baker. LHRH antiserum was a generous gift from Dr. A. Barnea.

Primary cultures Hypothalamic or cortical tissue was obtained from 14 day mice fetuses. Initiation of cultures was essentially that described by Charli et al. (6), except that cells were plated in poly D-lysine-coated 35 mm dishes at  $10^6$  cells/cm<sup>2</sup> in a total volume of 2 ml. In order to study the effects of PIM<sup>1</sup> and OPP on TRH content, hypothalamic cells were rinsed twice with phosphate buffered saline (PBS) and incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing glucose 10.25% with or without PIM<sup>1</sup> and OPP ( $10^{-8}$  M final) for up to 24 hr at 37°C. For release experiments, treated or control cells were rinsed twice with PBS and kept for 30 min in 300  $\mu$ l of Krebs-Ringer-Bicarbonate (KRB: 125 mM NaCl, 4.4 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 mM MgSO<sub>4</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM glucose, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) pH 7.5 at 37°C. This media considered as

6

basal TRH release, was withdrawn and replaced with 300  $\mu$ l KRB containing 56 mM KCl and incubated for additional 30 min period (stimulated TRH release). At the end of incubation both media and cells were processed and its TRH content was measured by RIA.

Organ culture of median eminences Male Wistar rats (200-300 g)

were killed by decapitation and median eminences were immediately removed and placed in IMEM with glucose (0.25%) at 4°C. They were rinsed twice with fresh medium and 2 or 3 median eminences pooled and transferred under sterile conditions to 16 mm wells in 500  $\mu$ l IMEM plus glucose (0.25%) and 1 mM glutamine. Tissue fragments were incubated with or without FIMM and DPP (10<sup>-7</sup> M final) for 0, 4, 8, 12, 16 and 24 hr and rinsed twice with PBS. Tissues and media were processed for TRH determination as primary cell cultures.

Release & receptors from brain slices TRH release from rat olfactory bulb slices and LHRH release from intact medial basal hypothalamus (MBH) or hypothalamic slices were studied between 11 and 14 hr as previously described (16, 22). FIMM and DPP were present since the beginning of incubation at 10<sup>-7</sup> M final concentration. Media and tissues were collected at the end of incubation and extracted for TRH or LHRH quantitation. Proteins were measured in tissue homogenates in 20% acetic acid.

In vivo experiments CD-1 male mice (20-30 g) were intraperitoneally injected with inhibitors (100  $\mu$ l/25 g bw)



dissolved in water (DMSO) or in 10% methanol (DPP) as described (16). Mice were killed by cervical dislocation and tissues were removed and immediately frozen. The hypothalamus and one olfactory bulb of each animal were used for TRH quantitation, while the other olfactory bulb and the rest of the brain were used for PGAI and PE assays. For LHRH determination other brain areas were studied.

Enzymatic assays PGAI and PE activities were measured spectrophotometrically by determining release of aromatic amines from appropriate chromogenic substrate (PGAI :  $\alpha$ -glu-B naphthylamide, PE :  $\alpha$ -glu-his-pro-B naphthylamide) according to the diazotization procedure of Brator and Marshall (23) as modified by Goldberg and Rutenburg (24). Chromogenic substrate release amount was calculated from a standard curve constructed with known amounts of chromogen. Under assay conditions, enzymatic activity was proportional to incubation time and amount of enzyme protein. PGAI and PE were measured at various time intervals after administration of anxiolytics. Extracted tissues were homogenized in 0.05 M phosphate buffer pH 7.5 (20% w/v) and homogenates centrifuged for 15 min 1000 g at 4°C. Recovered supernatant was centrifuged for 15 min 9000 g at 4°C and used as enzyme source. At the end of incubation, samples were kept at 4°C for 1 hr, centrifuged and a 250  $\mu$ l supernatant aliquot recovered and subjected to the diazotization procedure. Activities were calculated after subtracting zero time values.

TRH and LHRE extraction and radioimmunoassays Peptide extraction from media and tissue samples was performed as described (22). TRH RIA was performed as described (22) using the R<sub>1</sub> specific anti-TRH antibody previously characterized (25). LHRE RIA was performed using an antibody kindly donated by Dr. A. Barnes, essentially as described (24).

Protein concentration Proteins were measured by the method of Lowry et al (27).

Statistical analysis Statistical analysis were performed using the paired Student's t-test.

## RESULTS

### Effect of PDMK and ZPP in dispersed hypothalamic cells and median eminence organ cultures.

Hypothalamic and cortical cells in culture maintained for up to 24 hr in presence of 10-5M PDMK and ZPP, showed no morphological change as visualized by light microscopy. One hour incubation with inhibitors produced a significant inhibition of both enzymes (PGAI:  $97.2 \pm 0.2\%$  and PE:  $67.8 \pm 10.8\%$  of control values,  $n=7$ ). Moreover, after long term incubation (24 hr) with these compounds, PGAI and PE activities were still inhibited (PGAI:  $76.3 \pm 5.9\%$  and PE:  $71.9 \pm 8.7\%$  of control values,  $n=6$ ). Neither TRH release from hypothalamic cells nor peptide content remaining in cells were modified at any time tested (Table 1).

When median eminences were cultured for up to 24 hr with PDMK and ZPP, no effect on TRH content was observed (Fig 1).

### LHRH responses to PDI and ZPP treatment.

Medial basal hypothalamic (MBH) fragments or hypothalamic slices were incubated in presence of 10-5M PDMK and ZPP, in conditions that completely inhibited PGAI and PE activities

(16). Decalcifying concentrations of  $K^+$  caused an increased

release of LHRH, as previously reported (28, 29). The presence of inhibitors in the incubation media did not change either basal or stimulated release (Figs 2, 3A and 3B) nor LHRH tissue content (Fig 3A, B).

In vivo injection of PDMK and ZPP did not alter LHRH concentrations in hypothalamus, hypophysis, brain stem or n. accumbens-lateral septum after 13 hr of treatment (Fig 4). A significant reduction (40%) was observed however, in olfactory bulb, as previously described for TRH (16).

In vivo effect of PDMK and ZPP on enzyme activities and TRH levels.

That LHRH was also decreased in olfactory bulb led us to analyze the effect of these inhibitors on PGAI and PE activities in this particular region. As previously reported, 13hr treatment induced a strong inhibition in brain PGAI activity and 70% in PE (Fig 5), while in olfactory bulb inhibition was less pronounced for PGAI while not observed for PE (Fig 5).

The effect of inhibitors on enzyme activities at different times is shown on Figure 5: there was no effect on PE in olfactory bulb at any time, while PGAI time courses were similar in olfactory bulb and rest of the brain. Failure to detect ZPP effect on PE in olfactory bulb was not due to the presence of an isoenzyme insensitive to the inhibitor, since in vitro studies did not demonstrate any difference in the sensitivity of PE to

ZPP in the two regions (data not shown). Effect of inhibitors on TRH levels in olfactory bulb was only observed after prolonged exposure (Fig 5). Short time in vivo or in vitro treatment (Fig 6) did not produce any effect on TRH content and release.

DISCUSSION

The mechanisms responsible for controlling neuropeptide levels at the nerve ending are still unknown. Biosynthetic pathways have been clarified: TRH is formed as a precursor containing five copies of its parent sequence flanked by basic aminoacids (30): Processing enzymes recognize these pairs and generate  $\alpha$ -His-Pro-gly, which is further processed to TRH by a peptidyl glycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase (PAM) and a glutamyl cyclase (31). Moreover, TRH levels are subjected to effectors controlling its synthesis (32). Once formed, peptide concentration could also be modulated by intracellular degradation.

In a previous work (16) we reported that PAM and PE inhibition had no effect on TRH levels in any brain region examined, except for olfactory bulb, where an unexpected decrease was observed. Faivre-Bauman et al. (17) using the compound 3-gly-proDNH, capable of inhibiting both enzymes, found an increase in TRH content and release from hypothalamic primary cell cultures. Using two different culture systems and specific inhibitors for each enzyme we did not see any change in endogenous or released TRH. The discrepancy between PAM and PAMK with 3-gly-proDNH effects can not be explained by preferential availability of the inhibitors by cultured cells but only by a possible nonspecific effect of the later compound, since it is unable to alter TRH

levels when injected in vivo (33). These observations taken together support that the soluble enzymes PGAI and PE are not involved in controlling TRH levels in neuronal cells.

Although LHRH is a good substrate for PGAI and for PE in vitro, enzyme inhibition (in vitro or in vivo) had no effect on endogenous or released peptide levels. The initial cleavage of LHRH has been proposed to take place at the tyr<sup>3</sup>-glyc<sup>4</sup> bond by endopeptidase 24.15 (34). In vivo injection of a specific active site-directed inhibitor of this enzyme increases LHRH in brain (34). In addition, the activity of this enzyme shows endocrine regulation (21, 35). In contrast, no alteration in PE is observed during the oestrous cycle (20). If, however, LHRH could be degraded in vivo by PGAI and PE, its specific inhibition should increase peptide levels. As for TRH, it can be concluded that they are not involved in LHRH catabolism.

As we reported (16), TRH content in olfactory bulb showed an unexpected decrease following the in vivo administration of PDMK and DPP. Interestingly LHRH showed the same behaviour. In GR3 cells PGAI has been shown to be subjected to an unusual activation by its specific inhibitor E-6000 (36). A similar activation of PGAI by PDMK in olfactory bulb is ruled out since we observed a significant inhibition of the enzyme, although in less proportion as compared with the rest of the brain. DPP treatment did not inhibit PE at any time in vivo but was as efficient in vitro in olfactory bulb, as in the rest of

the brain, suggesting a different accessibility of the inhibitor to this region. However, because of the lipophilic nature of this compound this possibility seems unlikely and would still not explain the decrease in neurosteroid levels. The olfactory bulb behaves differently as compared with the hypothalamus in regard to TRH. This region, for instance, has been proposed to process the TRH precursor differently to other brain regions (37) and also contains the lowest PAM activity in the brain (40 times less as compared to the hypothalamus) (31). A nonspecific effect of these inhibitors at some of the processing events could be responsible for the lower levels of TRH and LHRH observed in in vivo experiments. Work is in progress to verify this hypothesis.

The work presented here confirms our hypothesis that PGAI and PE do not control TRH levels in vivo and shows similar behaviour of LHRH as reported for TRH: inhibition of PGAI and PE does not change the levels of LHRH in any of the regions studied, except also for olfactory bulb. In this later region long treatment with inhibitors cause a decrease of LHRH and TRH levels. Our data suggest that this effect is not mediated by alteration of PGAI or PE activities.



ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the excellent technical assistance of Dr. E. Mata, S. González and A. Uribe. This work was supported in part by grants from CONACYT (IIPMNA-021044) and Fundación Miguel Alemán A.C., S. Wilk was supported by NIH grants NS-17392 and a Research Scientist Award NR-00350.

REFERENCES

1. White, J.D., Stewart, K.D., Krauss, J.E. and McKelvy, J.F. (1985). Biochemistry of peptide-secreting neurons. *Physiol. Rev.* 65: 553-606.
2. Turner, A.J. (1988). Metabolism of Neuropeptides. *ISI Atlas of Science: Pharmacology*, 362-366.
3. Gerat, B., Miranda, J., Charli, J.L. and Joseph-Bravo, F. (1985). Presence of a membrane bound pyroglutamyl aminopeptidase degrading thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Neuropeptides* 6: 27-40.
4. O'Connor, E. and O'Quinn, G. (1984). Localization of a narrow specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea pig brain. *Eur. J. Biochem.* 144: 271-278.
5. Will, G. (1986). Neuropeptide specific peptidases: does brain contain a specific TRH degrading enzyme?. *Life Sci.* 39: 1487-1492.
6. Charli, J.L., Cruz, C., Vargas, M.A. and Joseph-Bravo, F. (1988). The narrow specificity pyroglutamate aminopeptidase degrading

TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochem. Int.* 13: 237-242.

- 7. Charli, J.L., Méndez, M., Vargas, M.A., Cisneros, M., Asai M., Joseph-Bravo, P. and Wilk, S. (1989). Pyroglutamyl Peptidase II inhibition specifically increases recovery of TRH released from rat brain slices. *Neuropeptides*
- 8. Hersh, L.B. and McKelvy, J.F. (1979). Enzymes involved in the degradation of thyrotropin releasing hormone (TRH) and luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) in bovine brain. *Brain. Res.* 169: 553-566.
- 9. Knisatschek, H. and Bauer, K. (1979). Characterization of "thyroliberin-deamidating enzyme" as a post-proline cleaving enzyme. *J. Biol. Chem.* 254: 10936-10943.
- 10. Bauer, K. and Kleinkauf, H. (1980). Catabolism of thyroliberin by rat adenohypophyseal tissue extract. *Eur. J. Biochem.* 106: 107-117.
- 11. Orłowski, M., Wilk, E., Pearce, S. and Wilk, S. (1979). Purification and properties of a prolyl endopeptidase from rabbit brain. *J. Neurochem.* 23: 461-469.
- 12. Torres, H., Charli, J.L., González-Noriega, A., Vargas, M.A. and Joseph-Bravo, P. (1986). Subcellular distribution of the

enzymes degrading thyrotropin releasing hormone and metabolites in rat brain. *Neurochem. Int.* 9: 103-110.

13. Wilk, S., Friedman, T.C. and Kline, T.B. (1985). Pyroglutamyl diazomethyl ketone: potent inhibitor of mammalian pyroglutamyl peptide hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130: 661-663.
14. Wilk, S. and Orłowski, M. (1983). Inhibition of rabbit brain prolyl endopeptidase by N-benzoyloxycarbonyl-prolyl-prolinal, a transition state aldehyde inhibitor. *J. Neurochem.* 41: 69-75.
15. Friedman, T.C., Orłowski, M. and Wilk, S. (1984). Prolyl endopeptidase: inhibition in vivo by N-benzoyloxycarbonyl-prolyl-prolinal. *J. Neurochem.* 42: 237-241.
16. Charli, J.L., Méndez, M., Joseph-Bravo, P. and Wilk, S. (1987). Specific inhibitors of pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase do not change the in vivo release of TRH or its content in rodent brain. *Neuropeptides* 9: 373-378.
17. Faivre-Bauman, A., Loudes, C., Barret, A., Tixier-Vidal, A. and Bauer, K. (1986). Possible role of neuropeptide degrading enzymes on thyroliberin secretion in fetal hypothalamic cultures grown in serum-free medium. *Neuropeptides* 7: 125-138.

18. Busby, W.H., Youngblood, W.W. and Kizer, J.S. (1982). Studies of substrate requirements, kinetic properties and competitive inhibitors of the enzymes catabolizing TRH in rat brain. *Brain Res.* 242 : 267-273.
19. Brown, P. and O'Quinn, R. (1983). An evaluation of the role of a pyroglutamyl peptidase, a post-proline cleaving enzyme and a post-proline dipeptidyl aminopeptidase, each purified from the soluble fractions of guinea-pig brain, in the degradation of thyrotiberin in vitro. *Eur. J. Biochem.* 137 : 75-87.
20. Advis, J.P., Krause, J.E. and McElvy, J.F. (1982). Luteinizing Hormone-Releasing Hormone peptidase activities in discrete hypothalamic regions and anterior pituitary of the rat : apparent regulation during the prepubertal period and first estrous cycle at puberty. *Endocrinology* 110: 1239-1245.
21. Lapp, C.A. and O'Connor, J.L. (1986). Hypothalamic and pituitary enzymatic degradation of Luteinizing Hormone-Releasing hormone during the 4-day estrous cycle of the rat. Assessment by high-performance liquid chromatography. *Neuroendocrinology* 49: 230-236.
22. Méndez, M., Joseph-Bravo, F., Cisneros, M., Vargas, M.A. and Charli, J.L. (1987). Regional distribution of in vitro release of thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Peptides* 8: 291-293.

23. Bratton, A.C. and Marshall, J.E.K. (1939). A new coupling component for sulfanilamide determination. *J. Biol. Chem.* 128: 537-550.
24. Goldbars, J.A. and Rutenburg, A.M. (1958). The colorimetric determination of leucine aminopeptidase in urine and serum of normal subjects and patients with cancer and other diseases. *Cancer* 11: 283-291.
25. Joseph-Bravo, P., Charli, J.L., Palacios, J.M. and Kordon, C. (1979). Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 104: 801-806.
26. Barnea, A. and Ono, G. (1984). Evidence that copper-amino acid complexes are potent stimulators of the release of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone from isolated hypothalamic granules. *Endocrinology* 115: 936-942.
27. Lowry, O.H., Rosenbrough, J.R., Farr, A.L. and Randall, R. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
28. Hartter, D.E. and Ramirez, V.D. (1980). The effects of ions, metabolic inhibitors, and colchicine on Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Release from Superfused rat hypothalamus. *Endocrinology* 107: 375-382.

29. Drouva, S.V., Epelbaum, J., Hery, M., Tapia-Arancibia, L., Laplante, E. and Kordon, C. (1981). Ionic channels involved in the LHRH and SRIF release from rat mediobasal hypothalamus. *Neuroendocrinology* 32 : 155-162.

30. Lechan, R.M., Wu, F., Jackson, I.M.D., Wolfe, H., Cooperman, S., Mandel, G. and Goodman, R.H. (1986). Thyrotropin-Releasing Hormone precursor : characterization in rat brain. *Science* 231: 159-161.

31. Jackson, I.M.D. (1989). Controversies in TRH Biosynthesis and Strategies towards the identification of a TRH precursor. In: Metcalf, G. and Jackson, I.M.D. (eds.) *Thyrotropin-Releasing Hormone : Biomedical Significance*. Annals of the New York Academy of Sciences Vol. 553. The New York Academy of Sciences, New York, p. 7-13.

32. Lechan, R.M. and Segerson, T.P. (1989). Pro-TRH gene expression and precursor peptides in rat brain. Observations by hybridization analysis and immunocytochemistry. *ibid.* p. 29-59.

33. Bauer, K. (1988). 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* 70: 69-74.

34. Molineaux, C.J., Lazard, A., Michaud, C. and Orlowski, M. (1988). Endopeptidase-24.15 is the primary enzyme that degrades Luteinizing Hormone Releasing Hormone both in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* 51: 604-609.
35. Krause, J.E., Advis, J.F. and Yabalzy, J.F. (1992). Characterization of the site of cleavage of LHRH under conditions of measurements in which LHRH degradation undergoes physiologically related changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109: 1475-1481.
36. Friedman, T.C., Davies, T.F. and Wilk, S. (1986). Evidence for regulation of a Thyrotropin-Releasing Hormone degradation pathway in GRG cells. *Endocrinology* 118: 562-566.
37. Lechan, R.M., Wu, P. and Jackson, I.M.D. (1987). Immunocytochemical distribution in rat brain of putative peptides derived from thyrotropin-releasing hormone prohormone. *Endocrinology* 121: 1879-1891.
38. Meng, F. and Teou, K. (1992). Biochemical Mapping of Peptidyl-Glycine  $\alpha$  - Amidation Activity in the rat CNS. *J. Neurochem.* 50: 1352-1355.



Figure Legends

**Fig 1** Effect of PDMP and IPP on TRH content of rat median eminence in organ culture.

Rat median eminences were incubated in presence or absence of  $10^{-7}$  M PDMP and IPP during the times indicated. Data are the mean  $\pm$  standard error of the mean of the number of independent determinations shown in parentheses.

**Fig 2** Time course of LHRH release from hypothalamic slices. Effect of PDMP and IPP.

Rat hypothalamic slices were incubated in presence or absence of  $10^{-7}$  M PDMP and IPP, which were present since the beginning of the incubation. Data are the mean of the number of independent determinations indicated in parentheses. Standard error of the mean was less than 10% in all cases.

**Fig 3** Effect of PDMP and IPP on LHRH release and content from hypothalamus and medial basal hypothalamus (MBH).

LHRH release was performed as indicated in Fig 2. Released LHRH and content from A) hypothalamus and B) MBH were measured by RIA. Basal release corresponds to the amount of LHRH released during the 50 - 60 min period, while stimulated release is that measured during the 60 - 70 min period. Data are the mean  $\pm$  standard error of the mean of the number of determinations indicated. Stimulated

release was evaluated as the ratio of LHRH released in presence of 56 mM KCl over that released in basal conditions. These ratios were : hypothalamus , control :  $2.9 \pm 0.6$  (n=9), inhibitors :  $1.9 \pm 0.4$  (n=13) ; MPR, control :  $2.7 \pm 0.5$  (n=11), inhibitors :  $2.3 \pm 0.2$  (n=12).

Fig 4 In vivo effect of PDMK and ZPP on LHRH content in mice brain.

An initial dose of 5 mg/kg of ZPP was intraperitoneally injected at 8 A.M., followed by 1.25 mg/kg at 12 P. M., 2 P. M., 4 P. M., 6 P. M. and 8 P. M. 0.1 mg/kg of PDMK was injected at 8 A. M. and 12 P. M. Mice were sacrificed at 9 P. M. PAAI and PE activities were measured in the brain (without hypothalamus) and were inhibited 79 % and 84 % respectively. Because of the seasonal variation of LHRH content observed in pine brain regions, data are expressed as the percent of pg LHRH present in vehicle group. Non significant differences were observed between vehicle and non injected groups. Data are the mean  $\pm$  standard error of the mean of the number of determinations indicated in parentheses.

\*  $p < 0.01$  as compared with vehicle group.

In olfactory bulb LHRH concentration (pg/mg protein) was : non injected group  $12.4 \pm 2.1$  (n=9), vehicle group  $14.1 \pm 2.1$  (n=10), inhibitors group  $9.5 \pm 1.1$  (n=9). The difference between this last group compared with vehicle is also significant ( $p < 0.025$ ).

Fig 5 In vivo effect of PDML and ZPP on PGAI and PE activities and TRH content in mice brain.

The 12 hr group was treated with inhibitors as indicated in Fig 4. The 6 hr group was injected with 0.1 mg/kg of PDML and 5 mg/kg of ZPP at 8 A. M., followed by the same dose of PDML and 1.25 mg/kg of ZPP at 12 P. M. The 3 and 1 hr groups received a single injection of 0.1 mg/kg of PDML and 5 mg/kg of ZPP at 8 A. M. Animals from the 12 and 6 hr groups were killed 1 and 2 hr after the last injection, respectively. All animals were sacrificed between 9 and 11 P. M. in order to avoid fluctuations in TRH content due to circadian changes. To verify that no stress was produced by injection, we included a 12 hr group which only received vehicles. As can be seen, there are no differences between this and the non-injected group (dotted bar). Enzyme activities are expressed as the percent of specific activity in the non-injected group. Specific activities were measured in olfactory bulb and brain (without hypothalamus), while TRH content was determined in hypothalamus and the other olfactory bulb of the same animal. Specific activities (moles/min/mg protein) in the non-injected and the 12 hr vehicle groups were respectively : Brain, PGAI :  $0.20 \pm 0.01$  and  $0.20 \pm 0.02$  ; PE :  $1.96 \pm 0.28$  and  $2.39 \pm 0.27$  ; Olfactory bulb, PGAI :  $0.21 \pm 0.03$  and  $0.18 \pm 0.04$  ; PE :  $1.71 \pm 0.34$  and  $1.34 \pm 0.20$  . (n=4). Data represent the mean  $\pm$  standard error of the mean of the number of independent determinations indicated in parentheses.

V = vehicle group. I = inhibitors group.

\*  $p < 0.025$

Fig 6 In vitro effect of BMM and BPP on TB content and release from rat olfactory bulb.

Rat olfactory bulb slices were incubated as described in Fig 2. Data are the mean  $\pm$  standard error of the mean of the number of independent determinations indicated in parentheses.

Table 1

Effect of PDMK and ZPP on TRH content and release from hypothalamic cells in culture.

	Cell content after release	TRH released in 30 min/dish		D/a	Total TRH
		a	b		
A (1h)					
C	52 + 8 (8)	33	64	1.9	149
I	49 + 9 (8)	29	78	2.7	150
B (6 h)					
C	38 + 7 (6)	22	47	2.1	107
I	33 + 8 (6)	34	62	1.8	130
C (24 h)					
C	44 + 16 (7)	41	53	1.3	129
I	36 + 11 (7)	37	54	1.5	126

Hypothalamic cell cultures (11 days in vitro) were rinsed twice with PBS, and incubated in presence or absence of PDMK and ZPP (10<sup>-7</sup> M) in DMEM-10% FBS, for 1 h (A), 6 h (B), or 24 h (C) at 37° C. At the end of incubation, the medium was discarded, the cells rinsed extensively with PBS and groups A and B maintained in DMEM-10%FBS for an additional period of time (12 and 18 h

respectively). C group cells were used immediately. After this period, cells were rinsed again in PBS and incubated in KR3 as described for release experiments (see Materials and Methods). Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean of the number of individual dishes indicated in parentheses. Total TRH : pg TRH released plus cell content after release.

a: Basal release  
b: Stimulated release

Fig. 1

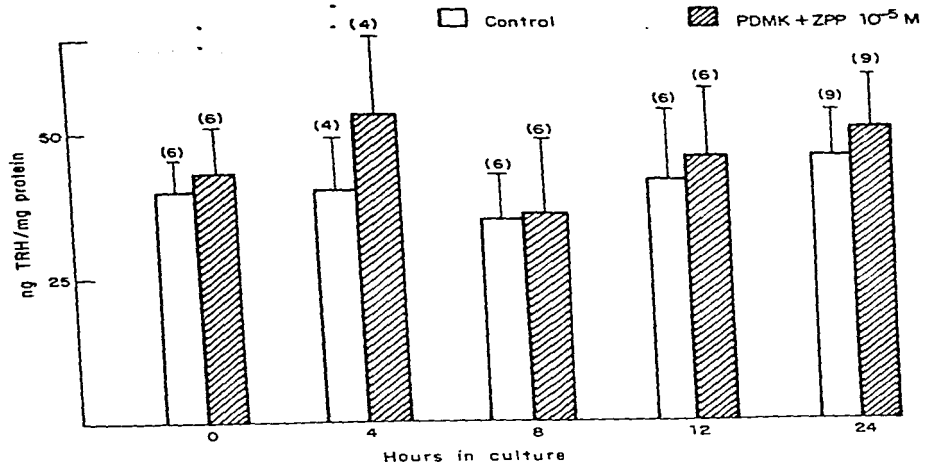
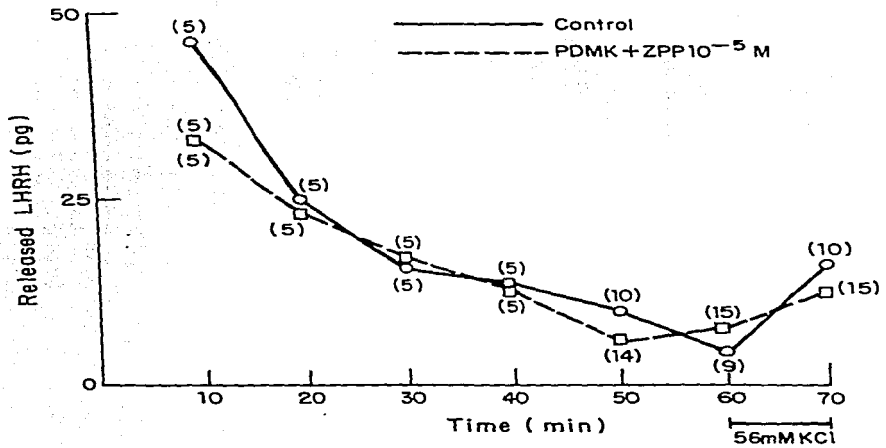
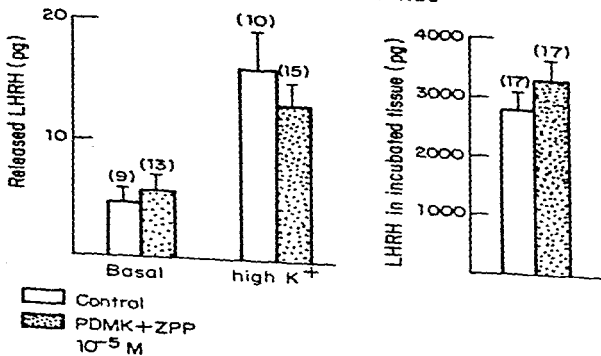


Fig. 2



## A Hypothalamus



## B MBH

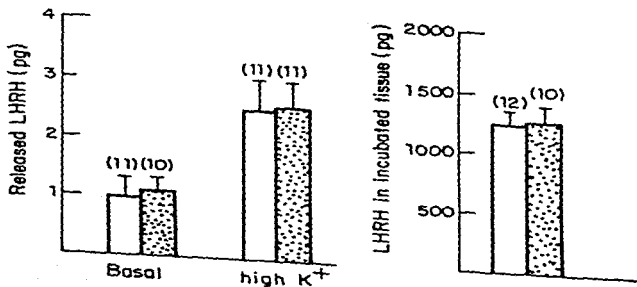
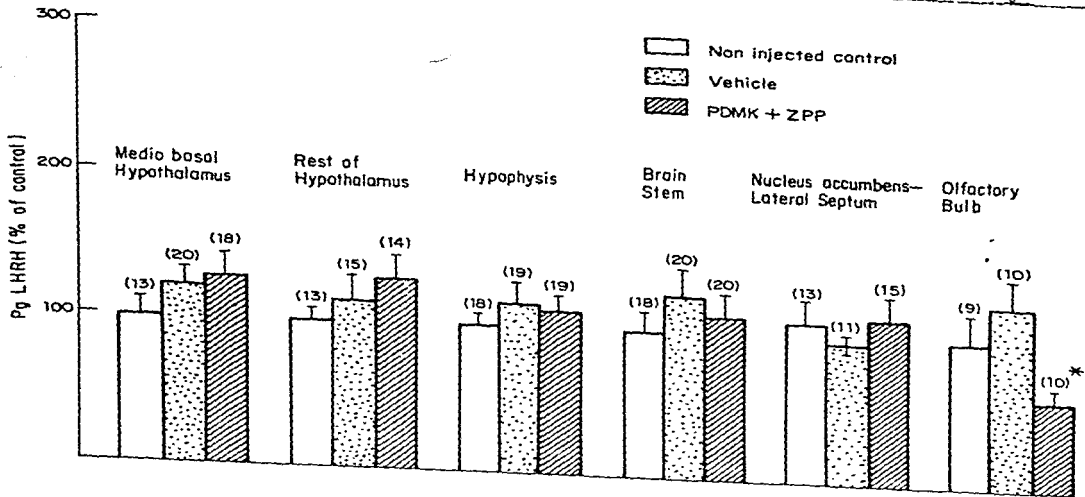




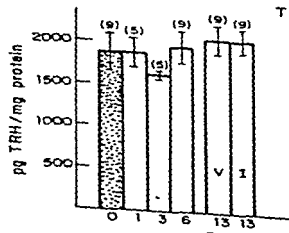
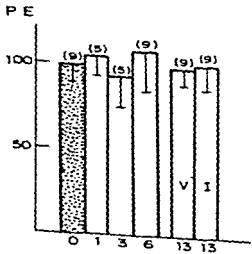
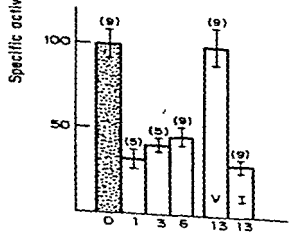
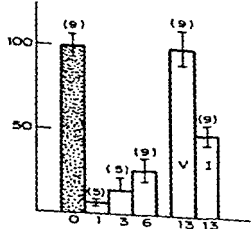
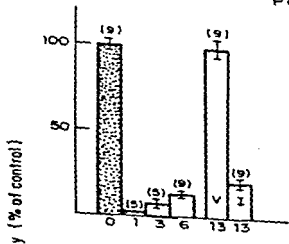
Fig. 4



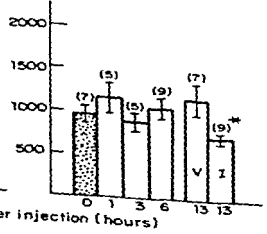
Hypothalamus

Olfactory bulb

PGA I

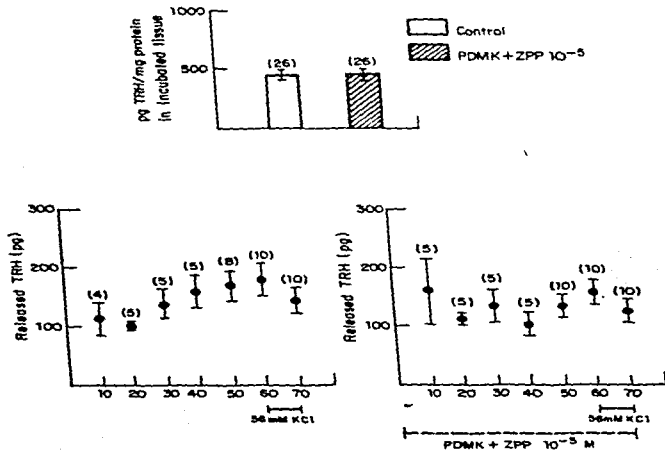


TRH Content



Time after injection (hours)

Fig. 6



## Physiological Relevance of Pyroglutamate Aminopeptidase II<sup>a</sup>

J. L. CHARLI, C. CRUZ, G. PONCE, M. A. VARGAS,  
M. MÉNDEZ, M. CISNEROS, J. PASTEN, AND  
P. JOSEPH-BRAVO

Departamento de Bioquímica  
Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y  
Biotecnología  
Universidad Nacional Autónoma de México  
A.P. 510-3  
Cuernavaca, Mor. 62270, Mexico

Mechanisms of chemical intercellular communication involve intra- and extracellular steps of inactivation of the messengers which are still poorly understood in the case of neuropeptides. Thyrotropin-releasing hormone (TRH: pyro-Glu-His-Pro-NH<sub>2</sub>), a neuropeptide that plays a neurohormonal and neuromodulatory role, can be degraded *in vitro* by four enzymes. These are prolylendopeptidase (PE), pyroglutamate amino-peptidase I (PGAI), pyroglutamate amino-peptidase II (PGAII), and thyroliberinase. PE and PGAI are two ubiquitous soluble enzymes that are not specific for TRH. Their concentrations in nerve endings are low,<sup>1</sup> and specific inhibitors of the enzymes do not modify TRH levels in brain and adeno-hypophysis or its *in vitro* release from hypothalamic slices.<sup>2</sup> These data suggest that they do not degrade TRH *in vivo*. Consequently, the pathways of intraterminal TRH degradation are still unknown.

On the other hand, thyroliberinase and PGAII are two peptidases degrading TRH to hisproNH<sub>2</sub> with a narrow specificity.<sup>3,4</sup> Thyroliberinase is present in serum, whereas PGAII is present on brain synaptosomal plasma membranes<sup>1,4</sup> and adeno-hypophyseal plasma membranes. PGAII is mainly a brain enzyme; in this organ, its distribution is not homogeneous.<sup>5</sup> In order to determine if PGAII is involved in TRH inactivation *in vivo*, we have initiated studies on its topographical localization in the synaptosomal plasma membranes. We have shown that the main pathway of inactivation of exogenous TRH by extensively washed hypothalamic slices is through action of PGAII. Moreover, treatment of brain synaptosomes by trypsin reduces PGAII activity up to 74% without reducing synaptosomal lactate dehydrogenase. Osmotic shock or detergent treatment of synaptosomes enhances PGAII activity 40% at most. Finally, primary cultures of mouse brain cells express PGAII. The activity is detected in intact cells, is reduced by trypsin treatment to one third of control value, and is not increased by saponin treatment. Together, these results suggest that most PGAII is an ectoenzyme in the brain and may be involved in TRH inactivation in the synaptic cleft. In agreement with this hypothesis, we have obtained preliminary data that show that luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH), a competitive inhibitor of PGAII, increases TRH recovery in media from hypothalamic slices (TABLE I).

<sup>a</sup> This work was supported in part by Grants from CONACYT, Fondo R. J. Zevada, and Fundación Miguel Alemán.

Feedback effects of thyroid hormones on thyrotropin secretion involve regulation of TRH metabolism in addition to direct pituitary effects. We have now shown that these feedback effects include regulation of the activity of PGAll. PGAll activity is enhanced 3-4-fold by T3 injections and reduced in hypothyroid animals. This effect is tissue-specific, being detected only in adenohypophysis. Because of the subcellular localization of PGAll, our data suggest that this narrow specificity peptidase may be involved in the regulation of the hypophysiotropic action of TRH.

TABLE 1. Effect of LHRH on TRH Release from Male Rat Hypothalamic Slices<sup>a</sup>

Treatment	Basal Release (pg TRH)	$\Delta^b$ (pg TRH)
Control	18 $\pm$ 3(5)	26 $\pm$ 4(5)
LHRH	162 $\pm$ 1(3)	265 $\pm$ 112(3) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Slices from one hypothalamus were incubated as described.<sup>1</sup> After 50 min preincubation, slices were transferred to incubation vials containing LHRH (20  $\mu$ M, K<sub>1</sub> of LHRH for the purified PGAll) or control medium and incubated for 10 min. (TRH released during this period corresponds to basal release.) After two further 10 min incubations in vials containing control medium, they were transferred to vials containing medium with 56 mM KCl with or without 20  $\mu$ M LHRH and incubated for 10 minutes. Values were corrected for RIA cross-reactivity of LHRH. Values are mean  $\pm$  SEM.

<sup>b</sup>  $\Delta$  = 56 mM KCl-induced release minus basal release.

<sup>c</sup> p < 0.005.

<sup>d</sup> p < 0.025.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank E. Mata and V. Aldama for technical and secretarial assistance.

### REFERENCES

1. TORRES, H. *et al.* 1986. *Neurochem. Int.* 9: 103.
2. CHARLI, J. L. *et al.* 1987. *Neuropeptides* 9: 373.
3. BAUER, K. & P. NOWAK. 1979. *Eur. J. Biochem.* 99: 239.
4. GARAT, B. *et al.* 1985. *Neuropeptides* 6: 27.
5. VARGAS, M. A. *et al.* 1987. *Neurosci. Lett.* 79: 311.
6. MENDEZ, M. *et al.* 1987. *Peptides* 8: 291.

## Pyroglutamyl Peptidase II Inhibition Specifically Increases Recovery of TRH Released from Rat Brain Slices

J.-L. CHARLI, M. MENDEZ, M.-A. VARGAS, M. CISNEROS, M. ASSAI\*, P. JOSEPH-BRAVO and S. WILKT

*Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Mor., México, \*Instituto Mexicano de Psiquiatría, México D.F., México and †Department of Pharmacology, Mount Sinai School of Medicine of the City University of New York, NY, USA (reprint requests to SW)*

**Abstract**—Pyroglutamyl peptidase II (EC 3.4.19-) is a highly specific membrane-bound thyrotropin releasing hormone (TRH) degrading enzyme. To study the functional significance of pyroglutamyl peptidase II in TRH degradation, we synthesized the reversible inhibitor N-1-carboxy-2-phenylethyl (N<sup>100</sup>benzyl)-histidyl-β-naphthylamide (CPHNA). CPHNA inhibited the enzyme with a K<sub>i</sub> of 8 μM, but had no effect on TRH receptors or on prollyl endopeptidase (EC 3.4.21.26). It weakly inhibited cytosolic pyroglutamyl peptidase I (EC 3.4.19.3). CPHNA at a concentration of 10<sup>-6</sup>M increased both the basal and potassium stimulated recovery of TRH released from hypothalamic slices by approximately two-fold. An even higher recovery was observed in slices from brain regions with relatively high levels of pyroglutamyl peptidase II. CPHNA had no effect on the basal recovery of γ-aminobutyric acid or Met-enkephalin released from brain slices but decreased the potassium stimulated recovery of both Met-enkephalin and γ-aminobutyric acid. These data further support the involvement of pyroglutamyl peptidase II in the extracellular inactivation of brain TRH.

### Abbreviations

TRH: thyrotropin releasing hormone

GABA: γ-aminobutyric acid

CPHNA: N-1-carboxy-2-phenylethyl(N<sup>100</sup>benzyl)-histidyl-β-naphthylamide

RIA: radioimmunoassay

HPLC: high performance liquid chromatography

KRB: Krebs Ringer Bicarbonate

### Introduction

Extracellular inactivation of biologically active peptides has been primarily attributed to the action of membrane-bound peptidases (1). Thyro-

tropin releasing hormone (TRH, pGlu-His-ProNH<sub>2</sub>) can be degraded in vitro by three enzymes (2). Two of these enzymes, pyroglutamyl peptidase I (EC 3.4.19.3) and prollyl endopeptidase (EC 3.4.21.26) are cytosolic, widely distributed, and act on a variety of neuropeptide substrates. The third enzyme, pyroglutamyl pepti-

Date received 10 May 1989

Date accepted 10 May 1989

dase II (EC 3.4.19.-) is found in brain membranes (3, 4) and in serum (5, 6). It is highly specific for TRH (2) and does not cleave the pGlu-IIis bond of luteinizing hormone releasing hormone (7, 8). Highest levels of pyroglutamyl peptidase II occur in brain (9) where its distribution is not homogeneous (10). It has been localized to the synaptic plasma membrane (3, 11) where it exists as an ectoenzyme (12). On the basis of its substrate specificity and its localization, pyroglutamyl peptidase II may terminate the biological activity of neuronally released TRH.

To confirm a role for pyroglutamyl peptidase II in the inactivation of TRH in the synaptic cleft, we have synthesized an inhibitor of this enzyme and have studied its effect on the recovery of TRH released from brain slices.

### Materials and Methods

Male Wistar rats (200-300g) kept under controlled lighting conditions (light on: 7:00-19:00h), and fed ad libitum a Purina chow diet, were used in all experiments. [L-2,3,4,5-<sup>3</sup>H-proline]-TRH ([<sup>3</sup>H]-Pro]-TRH; 107 Ci/mmol) and [<sup>2</sup>,3-<sup>3</sup>H(N)]-aminobutyric acid ([<sup>3</sup>H]-GABA; 35 Ci/mmol) were purchased from New England Nuclear Co., Boston, MA. TRH was obtained from Peninsula Laboratories, Belmont, CA. t-Boc-(N<sup>10</sup>-benzyl)-histidine was obtained from Bachem Co., Torrance, CA. Ion exchange chromatography was performed on Whatman cellulose phosphate P81 sheets. Analytical thin layer chromatography was carried out on 40 × 80mm Polygram silica gel G/UV sheets, Brinkmann Instruments Westbury, NY. Preparative thin layer chromatography was carried out on 20 × 20cm 1000 micron silica gel G plates obtained from Analtech, Inc., Newark, DE. All other reagents were of reagent grade from either Sigma Chemical Co., St. Louis, MO or J.T. Baker Co., Phillipsburg, NJ.

### Synthesis of CPHNA

Boc-N<sup>10</sup>-benzyl histidine (5 mmol) and β-naphthylamine (5 mmol) were dissolved in 35 ml dimethylformamide. After cooling to 0°C, 5 mmol each of dicyclohexylcarbodiimide and

1-hydroxybenzotriazole were added. The reaction continued for 18h allowing the mixture to come to room temperature. The solution was filtered, the filtrate evaporated to dryness and the residue dissolved in chloroform. The chloroform solution was sequentially washed with sat NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 10% citric acid and H<sub>2</sub>O and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Evaporation of the chloroform gave an orange solid which when triturated with ether yielded a white precipitate Boc-N<sup>10</sup>-benzyl histidyl β-naphthylamide (1) (56% yield). TLC 95 CHCl<sub>3</sub>/5 ethanol, single UV spot R<sub>f</sub> = 0.30.

Treatment with trifluoroacetic acid for 15 min followed by evaporation and trituration with ether yielded the trifluoroacetate salt of N<sup>10</sup>-benzyl histidyl β-naphthylamide (II) in essentially 100% yield. TLC ethyl acetate/methanol/NH<sub>4</sub>OH 7:3:0.75 single UV spot R<sub>f</sub> = 0.73.

2.5 mmol phenylpyruvate-Na salt was dissolved in 15 ml H<sub>2</sub>O and the pH adjusted to 7.8. 1 mmol of (II) was dissolved in 10 ml tetrahydrofuran and added to the above solution together with 1 mmol triethylamine. 5 mmol NaCNBH<sub>3</sub> in 5 ml H<sub>2</sub>O was added over a 10h period by means of a syringe pump and the reaction allowed to proceed an additional 6h. A small amount of the tetrahydrofuran was removed by evaporation. Chloroform and water were added and the product extracted into chloroform. The chloroform extract was washed sequentially with sat NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 10% citric acid and H<sub>2</sub>O and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Evaporation yielded a crystalline material which was further purified in 100mg portions by preparative thin layer chromatography (ethyl acetate/methanol/NH<sub>4</sub>OH 80:20:7.5). The product (R<sub>f</sub> = 0.67) was visualized under a UV lamp. It was eluted from the silica gel with a solution of 40% ethanol in chloroform. Anal. Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O: C, 71.64; H, 5.97; N, 10.45. Found: C, 72.06; H, 5.89; N, 10.07.

### Measurement of enzyme inhibition

For inhibition studies an essentially homogeneous preparation of pyroglutamyl peptidase II was used (13). Enzyme activity was determined with the substrate pGlu-IIis-Pro-NA as previously described (9). Inhibition constants were obtained graphically by the method of (4).

### Release experiments

**A: TRH:** These were performed between 11:00 and 14:00 essentially as described (15, 16). 250  $\mu$ m slices from one hypothalamus, 3 nucleus accumbens-lateral septum or one olfactory bulb (left side) were used. CPHNA was added to the incubation medium after a 50 min preincubation.

In one experiment, incubation media were injected on an analytical high performance liquid chromatography (HPLC) column and fractions analyzed by radioimmunoassay (RIA) as described (15).

**B: GABA:** GABA release was studied in a manner similar to that of TRH. Slices were washed, transferred  $3 \times$  (10 min each incubation) from vial to vial containing 500  $\mu$ l Krebs Ringer bicarbonate (KRB) +  $10^{-4}$ M oxyacetic acid (KRBOA). Thereafter they were transferred to a vial containing 250,000 dpm [ $^3$ H]-GABA and further incubated for 10 min. They were next transferred to a vial containing 4 ml KRBOA and maintained for 2 min. Finally they were transferred for 3 additional 10 min periods in 500  $\mu$ l KRBOA including a 10 min period with 56mM KCl in KRBOA as the last step. CPHNA was added during the last two 10 min periods. Radioactivity present in tissues and media was determined by liquid scintillation counting.

**C: Met-Enkephalin:** Met-enkephalin release from striatum was studied between 10 and 12h according to (17). Briefly striatum from 3 rats were sliced (300  $\mu$ m in 2 perpendicular directions), preincubated for 15 min and perfused with KRB saturated with 95%  $O_2$ /5%  $CO_2$  at 37°C (1 ml/min) for 25 min before a 20 min perfusion in KRB containing 1mM Phe-Ala (to inhibit Met-enkephalin degradation). Slices were depolarized with 22mM KCl during the last 20 min perfusion period. CPHNA was added during the last 20 min. Perfused medium from the last two 10 min periods were collected into tubes containing 1 ml 1N HCl. Tissues were transferred into 4ml HCl. Tissues and media were boiled, purified by XAD-2 chromatography and oxidized with hydrogen peroxide. Oxidized Met-enkephalin was quantitated by RIA using a specific antiserum (18).

### Results

CPHNA reversibly inhibited pyroglutamyl peptidase II with a  $K_i$  of 8  $\mu$ M as determined by the method of (14). Tested at a concentration of 0.4mM CPHNA failed to inhibit either prolyl endopeptidase, dipeptidyl peptidase IV or aminopeptidase M. At this concentration, CPHNA inhibited pyroglutamyl peptidase I (EC 3.4.19.3) by 24% but negligibly at 0.1 mM. CPHNA had no effect on the binding of  $^3$ H-methyl TRH to rat brain membranes (C.S. Suen, unpublished observations).

It was observed that CPHNA was a much more potent inhibitor of pure pyroglutamyl peptidase II than of less purified enzyme preparations. Since there is no evidence of inhibitor breakdown during incubation, it is likely that CPHNA binds non-specifically to other proteins. Whereas 10  $^{-4}$ M CPHNA virtually totally inhibits homogeneous pyroglutamyl peptidase II, the activity of this enzyme was decreased only by 40% in crude brain preparations. Nonetheless at this concentration, treatment of hypothalamic slices with CPHNA led to a 2-fold increase in the recovery of TRH from the medium under basal or  $K^+$ -stimulated conditions (Figs 1-3). A somewhat greater effect was observed in the nucleus accumbens-lateral septum (Figs 2, 3). However when CPHNA was added to olfactory bulb slices, a region relatively rich in pyroglutamyl peptidase II (10) (Fig. 3), the recovery of basal and  $K^+$ -stimulated TRH release was enhanced approximately 5-fold (Figs 2, 3).

A quantitatively similar effect was observed if TRH was purified by HPLC previous to RIA determination (not shown). Tissue TRH content was not altered by a 20 min CPHNA treatment in any of the regions studied. Mean values  $\pm$  SEM were: hypothalamus: control 9544  $\pm$  505 (9) pg/structure, CPHNA 8311  $\pm$  1268 (10); nucleus accumbens-lateral septum: control 4492  $\pm$  275 (10) pg/3 structures, CPHNA 4534  $\pm$  266 (10); olfactory bulb: control 715  $\pm$  108 (10) pg/left side bulb, CPHNA 683  $\pm$  93 (9). In cerebellar hemispheres we had previously shown that TRH levels were undetectable in medium. CPHNA did not induce detectable levels of TRH (not shown).

CPHNA had no effect on the basal release of [ $^3$ H]-GABA or of Met-Enkephalin whereas the



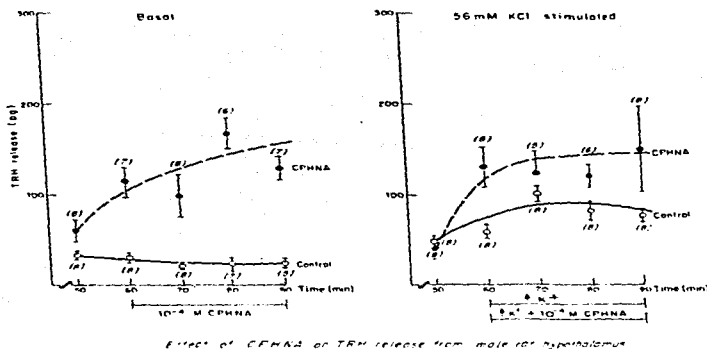


Fig. 1 Release of TRH from hypothalamic slices under basal conditions (left panel) or after stimulation with 56mM KCl (right panel). Numbers in parentheses represent number of experiments at each time point. Bars correspond to mean  $\pm$  SEM.

potassium stimulated release of these substances was depressed (Table). Met-enkephalin content of slices incubated in the presence of CPHNA was not different from control values (not shown).

### Discussion

Our data demonstrate that treatment of brain slices with CPHNA, an inhibitor of pyroglutaryl peptidase II leads to an enhanced recovery of TRH released from brain slices under basal or  $K^+$ -stimulated conditions. CPHNA has no effect on TRH receptors and does not inhibit prolyl endopeptidase. Its weak inhibition of pyroglutaryl peptidase I is unlikely to contribute to its effect since we

have previously shown that the potent pyroglutamyl peptidase I inhibitor pyroglutamyl diazomethyl ketone did not affect the recovery of TRH released from brain slices (16). Moreover at the concentration used in these experiments, (0.1mM) inhibition of pyroglutamyl peptidase I was negligible. A non-specific effect of CPHNA can also be ruled out since this compound did not enhance the recovery of either GABA or Met-enkephalin released from brain slices. The involvement of pyroglutaryl peptidase II in controlling the amount of TRH released is further supported by the observation that the effect of CPHNA was greater in regions with greater activity of this enzyme (Figs 2, 3). Since the slices are

Table Effect of CPHNA ( $10^{-4}$ M) on Met-enkephalin or [ $^3$ H]-GABA release from brain slices

Treatment	[ $^3$ H]-GABA release <sup>a</sup>		Met-enkephalin release <sup>b</sup>	
	basal (percentage of total radioactivity)	56mM KCl	basal	22mM KCl
Control	2.6 $\pm$ 0.2 (5)	8.4 $\pm$ 0.8 (5)	1.4 $\pm$ 0.3 (8)	10.4 $\pm$ 1.8 (8)
CPHNA	2.6 $\pm$ 0.5 (5)	5.8 $\pm$ 0.9 (5)*	1.3 $\pm$ 0.2 (8)	6.5 $\pm$ 1.5 (8)*

Slices from hypothalamus (a) or striatum (b) were incubated as described in materials and methods. Data are mean  $\pm$  SEM (number of independent determinations in parentheses). \*  $p < 0.025$  compared to control.

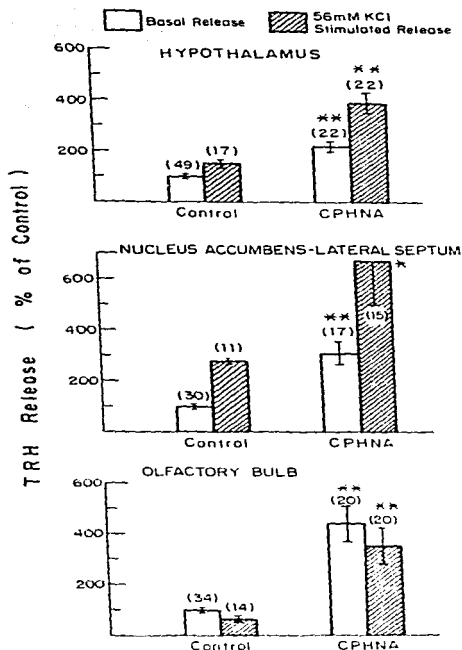


Fig. 2 Basal and  $K^+$  stimulated release of TRH from various brain regions in the presence or absence of CPHNA. For each region, a 50 min stabilization period was followed by a 10 min period (basal release) in KRB followed by a 10 min period in KRB containing 56mM  $KCl$ . These experiments were performed with or without  $10^{-6}M$  CPHNA. Various experiments have been pooled. Because basal release can be variable from experiment to experiment, values are expressed in % of basal release for the control group. For hypothalamus basal release fluctuated between 38 and 67 pg; for olfactory bulb from 15 to 65 pg and for nucleus accumbens-lateral septum from 15 to 37 pg. Data are mean  $\pm$  SEM (number of independent determinations in parentheses). Statistical analyses were performed by Student's *t* test, values in the presence of CPHNA were compared to control values. \*  $p < 0.025$ , \*\*  $p < 0.005$ .

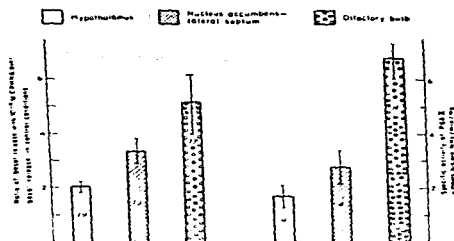


Fig. 3 Comparison of potency of CPHNA effect on TRH recovery with pyroglutamylpeptidase II specific activity. Left Panel: Bars represent basal release of TRH in the presence of  $10^{-6}M$  CPHNA for 10 min divided by the basal release of TRH under control conditions. When no CPHNA is added, the value of this ratio is 1.0. Number of experiments represented within each bar. Data are mean  $\pm$  SEM.

Right Panel: Bars represent the specific activity of pyroglutamylpeptidase II determined as described in Vargas et al., 1987, except that the substrate concentration was  $10^{-6}M$ . Number of determinations represented within each bar. Data are mean  $\pm$  SEM.

thoroughly washed before addition of CPHNA it is highly unlikely that serum pyroglutamylpeptidase II could contribute to the degradation of TRH. Therefore the changes observed are best explained as due to an inhibition of pyroglutamylpeptidase II. Since the tissue levels of TRH are unaltered and since pyroglutamylpeptidase II has been shown to be an ectoenzyme, the increased recovery of TRH must be due to inhibition of an extracellular inactivating mechanism.

This study presents the first evidence demonstrating the action of an enzyme responsible for TRH catabolism in brain extracellular fluid. The exact topographical localization of pyroglutamylpeptidase II and its relationship to sites of TRH release remains to be established. Pyroglutamylpeptidase II should now be added to the list of peptidases presumed responsible for extracellular neuropeptide inactivation. Its high specificity suggests that one can determine from the functional consequences of its inhibition, the physiological role of TRH in brain.

It is notable that a significant effect was seen despite only a 40% inhibition of the enzyme.

These studies should stimulate the search for other more potent and selective inhibitors of pyroglutamyl peptidase II.

#### Acknowledgements

We gratefully acknowledge the technical assistance of E. Mata and S. Gonzalez. We also thank V. Aldama and G. Felix for help in preparing this manuscript. This work was partly supported by grants from Funcion Miguel Aleman, and NIH grants NS-17392 and a Research Scientist Award MH00350 to S.W.

#### References

- Turner, A. J. (1986). Processing and metabolism of neuropeptides. *Essays Biochem.* 22: 69-119.
- Wilk, S. (1986). Neuropeptide-specific peptidases: does brain contain a specific TRH-degrading enzyme? *Life Sci.* 39: 1487-1492.
- O'Connor, B. and O'Cuinn, G. (1984). Localization of a narrow specificity thyroliberin hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain. *Eur. J. Biochem.* 144: 271-278.
- Garat, B., Miranda, J., Charli, J. L. and Joseph-Bravo, P. (1985). Presence of a membrane bound pyroglutamyl aminopeptidase degrading thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Neuropeptides* 6: 27-40.
- Taylor, W. L. and Dixon, J. E. (1978). Characterization of a pyroglutamate aminopeptidase from rat serum that degrades thyrotropin releasing hormone. *J. Biol. Chem.* 253: 6933-6940.
- Bauer, K. and Nowak, P. (1979). Characterization of a thyroliberin-degrading serum enzyme catalyzing the hydrolysis of thyroliberin at the pyroglutamyl-histidine bond. *Eur. J. Biochem.* 99: 239-246.
- Bauer, K., Nowak, P. and Kleinkauf, H. (1981). Specificity of a serum peptidase hydrolysing thyroliberin at the pyroglutamyl histidine bond. *Eur. J. Biochem.* 118: 173-176.
- O'Connor, B. and O'Cuinn, G. (1985). Purification and kinetic studies on a narrow specificity synaptosomal membrane pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Eur. J. Biochem.* 150: 47-52.
- Friedman, T. C. and Wilk, S. (1986). Delineation of a particulate thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in rat brain by the use of specific inhibitors of prokyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase. *J. Neurochem.* 46: 1231-1238.
- Vargas, M., Mendez, M., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P. and Charli, J. L. (1987). Regional distribution of the membrane bound pyroglutamate aminopeptidase-degrading thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Neurosci. Lett.* 79: 311-314.
- Torres, H., Charli, J. L., Gonzalez Noriega, A., Vargas, M. A. and Joseph-Bravo, P. (1986). Subcellular distribution of the enzymes degrading thyrotropin releasing hormone and metabolites in rat brain. *Neurochem. Int.* 9: 103-110.
- Charli, J. L., Cruz, C., Vargas, M. A. and Joseph-Bravo, P. (1988). The narrow specificity pyroglutamate aminopeptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochem. Int.* 13: 237-242.
- Wilk, S. and Wilk, E. K. (1989). Pyroglutamyl peptidase II. A thyrotropin releasing hormone degrading enzyme: Purification and specificity studies of the rabbit brain enzyme. *Neurochem. Int.* (In Press).
- Dixon, M. (1953). The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* 55: 170-171.
- Mendez, M., Joseph-Bravo, P., Cisneros, M., Vargas, M. A. and Charli, J. L. (1987). Regional distribution of in vitro release of thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Peptides* 8: 291-298.
- Charli, J. L., Mendez, M., Joseph-Bravo, P. and Wilk, S. (1987). Specific inhibitors of pyroglutamyl peptidase I and prokyl endopeptidase do not change the in vitro release of TRH or its content in rodent brain. *Neuropeptides* 9: 373-378.
- Zubieta, M., Vindrola, O., Talavera, E., Asai, M., Masarini, A. and Linares, G. (1985). Pentylentetrazol-induced seizures produce an increased release of ir-met-enkephalin from rat striatum in vitro. *Brain Res.* 360: 101-107.
- Vindrola, O., Briones, R., Asai, M., Fernandez-Guardiola, A. (1981). Amipalofidol binding enhances the enkephalin content in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 21: 39-43.

## DISCUSION

Aunque actualmente se cuenta con una gran cantidad de información concerniente a las vías de biosíntesis de muchos neuropéptidos, se conoce relativamente poco acerca de los mecanismos por los cuales son liberados en el SNC y sobre los mecanismos que controlan la liberación de neurotransmisores y hormonas polipeptídicas. Los mecanismos que controlan la disponibilidad de péptido para su liberación o su inactivación intracelular son prácticamente desconocidos. Resulta de particular interés determinar cuales son los mecanismos que controlan los niveles de péptido en la terminal nerviosa : si es degradado por enzimas intra-vesiculares, enzimas citoplásmicas o a través de la fusión de vesículas con lisosomas.

En cuanto a los mecanismos que inducen la liberación de péptido a la llegada de un potencial de acción, se sabe que éste abre canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, probablemente del tipo N (Miller, 1987) y que su entrada al citoplasma induce la exocitosis por un proceso que aún no se conoce perfectamente.

La modificación de la liberación es solamente uno de los eventos que puede ser afectado en las neuronas peptidérgicas. Recientemente, el interés se ha enfocado en la biosíntesis de los neuropéptidos y en los factores que la regulan. Los niveles de RNAm pueden ser regulados por las condiciones hormonales (Roberts y col., 1983), por la actividad transináptica (Eiden y col., 1984) o por la actividad eléctrica de la neurona (LaGamma y col., 1985). Generalmente, las modificaciones en las tasas de RNAm se deben a una alteración en la velocidad de transcripción del gene, o bien en los mecanismos de transporte o en la estabilidad del RNAm involucrado.

Las modificaciones en el metabolismo intracelular no se limitan a los niveles de RNAm, sino que pueden darse también a nivel de la velocidad de traducción o de la ruptura del precursor en una forma acoplada a la transcripción (Shiomi y col., 1986). La actividad de las enzimas responsables de las modificaciones post-traduccionales también pueden estar reguladas, por ejemplo, la amidación (Lynch y Snyder, 1986). Resulta razonable pensar que también los mecanismos de degradación intracelular de los péptidos están regulados, como ha sido demostrado para algunos mecanismos de inactivación extracelular. Por lo tanto, resulta evidente que bajo la influencia de uno o varios efectores extracelulares, la neurona peptidérgica puede modificar su capacidad de interpretar los mensajes externos y regular diversas etapas intracelulares del metabolismo de los neuropéptidos para adaptarse a una nueva situación fisiológica. Estos eventos pueden estar acoplados a las modificaciones del catabolismo extracelular del péptido y a las de la célula blanco.

Una vez liberado, el péptido se difunde o es transportado hasta la célula blanco. A este nivel, el péptido interactúa con receptores de alta afinidad. Entre los eventos que pueden afectar al receptor, parecería razonable pensar que el reciclaje de los receptores por internalización indujera simultáneamente la eliminación de una parte del péptido. El péptido no internalizado podría ser degradado entonces por enzimas solubles (en la sangre) o por enzimas membranales (ectoenzimas) situadas cerca de los sitios de liberación.

Los neuropéptidos representan una clase de sustancias extremadamente potentes, que pueden actuar como neurohormonas,

neuromoduladores, neurotransmisores o como sustancias efectoras parácrinas sobre una gran variedad de células blanco. Como para otras sustancias biológicamente activas y de gran potencia, para los neuropéptidos también deben existir mecanismos altamente eficientes de degradación y/o eliminación, por una razón muy importante : a concentraciones inapropiadas, las sustancias biológicamente activas son altamente tóxicas. Esto es especialmente cierto para los factores de comunicación neuronal que transmiten una señal química, y es claro que para aquellos neuropéptidos que son liberados a altas frecuencias, estos mecanismos tienen que ser no sólo altamente eficientes, sino también muy rápidos.

Pueden visualizarse, sin embargo, varios esquemas de inactivación dependiendo de la concentración del péptido a proximidad del receptor y de las propiedades del receptor. Aunque los efectos de los neuropéptidos son rápidos y de corta duración, algunos de ellos producen efectos retardados y de larga duración (del orden de minutos) que no requieren de un mecanismo de inactivación más rápido que la difusión. Por otro lado, las enzimas implicadas en estos procesos podrían tener especificidades limitadas según el neuropéptido a inactivar o la localización anatómica. El conjunto de factores bioquímicos y topográficos definen la especificidad funcional de las ectoenzimas (Schwartz y col., 1986). La comunicación intercelular peptidérgica podría ser modificada al menos en parte por variaciones en estos factores. Por lo tanto, es necesario establecer modelos adecuados en los cuales pueda estudiarse el efecto de la manipulación de la inactivación sobre las propiedades electrofisiológicas de la transmisión peptidérgica, para aumentar así los conocimientos sobre tales mecanismos. Queda claro

entonces que, aunque uno de los aspectos importantes de la inactivación extracelular de los neuropéptidos es la degradación por las ectoenzimas, deben analizarse también los demás mecanismos.

La inactivación de los neuropéptidos liberados al espacio sináptico o a otros fluidos extracelulares parece ser un evento necesario para transmitir información de una manera rápida, ya que la difusión aparentemente es insuficiente para disminuir la concentración del péptido en la vecindad de sus receptores. La inactivación de señales intercelulares es un proceso complejo que lleva a la eliminación del mensajero del área que contiene los receptores correspondientes. Aunque este proceso puede llevarse a cabo por difusión, captura, internalización, degradación, modificación covalente o la combinación de algunos de estos mecanismos, la hipótesis actual es que la inactivación de los neuropéptidos se lleva a cabo por la acción de neuropeptidasas, peptidasas membranales específicas localizadas en sitios cercanos a los receptores sobre la célula blanco (Schwartz, 1983). El papel primordial de las peptidasas en la inactivación extracelular de los neuropéptidos resulta de mayor importancia que en el caso de las neuronas aminérgicas, en las que la captura parece ser el mecanismo fundamental de inactivación.

Para muchos neuropéptidos, se ha demostrado que su degradación in vitro ocurre muy rápidamente en la sangre y en muchos tejidos. En el caso de TRH su degradación se observó aún antes de que su estructura fuera dilucidada. Además, se encontró que el TRH era resistente a una gran variedad de enzimas proteolíticas: generales, así como a la acción de enzimas inespecíficas como pepsina, papaina

o termolisina. Este hecho es explicado por las características estructurales del tripéptido : debido a su extremo amino terminal ciclizado y a su extremo COOH terminal amidado, el TRH es resistente a la acción de exopeptidasas, y debido al residuo interno de prolina, el péptido no es susceptible a la degradación por enzimas hidrolíticas generales. La amidación COOH terminal acoplada a la ruptura del enlace X-gli (Bradbury y Smyth, 1985), la acetilación N-terminal (Glembotski, 1982) o la ciclización de la glutamina N-terminal a piroglu (Busby y col., 1987), son modificaciones post-traduccionales que reducen la susceptibilidad de los péptidos al ataque de exopeptidasas y que influyen en su actividad biológica. Estas transformaciones se llevan a cabo según una secuencia específica, lo que sugiere que existen señales que la controlan. Tales señales podrían formar parte de la estructura del precursor.

Con el objeto de comprender la función biológica de las enzimas que degradan a los neuropéptidos, un requisito primordial es delinear primero las vías de fragmentación de los neuropéptidos y evaluar las propiedades bioquímicas de las enzimas individuales capaces de hidrolizar a estas sustancias. La información obtenida de estos estudios proporciona entonces, las herramientas necesarias para resolver preguntas más específicas sobre la función de las enzimas individuales en sitios específicos. Además, es importante determinar si el neuropéptido y las enzimas que lo degradan entran en contacto in vivo. En el caso del TRH, el conocimiento de los cortes primarios de la molécula, así como la caracterización de las enzimas que llevan a cabo estas rupturas, ha permitido seguir adelante con estudios relacionados al papel fisiológico que



desempeñan estas enzimas en el control de las concentraciones intra- y extracelulares de TRH en el SNC, así como determinar su posible regulación en condiciones fisiológicas determinadas.

Degradación de TRH por enzimas intracelulares.- Debido a su localización intracelular, ni la PGAI ni la PE podrían ser relevantes en la inactivación del TRH después de su liberación, a menos que se liberen junto con el péptido. Si la captura de TRH por un proceso dependiente de energía ocurre en el SNC, las enzimas solubles parecerían no ser importantes en la inactivación de TRH ni siquiera a niveles de control secundarios. En este caso, el proceso de captura representaría el paso limitante y, por lo tanto, regulatorio, pero no las actividades de las enzimas intracelulares. En el caso de la inactivación del TRH y otros neuropéptidos por enzimas intracelulares en sus sitios blanco, otros mecanismos (por ejemplo, procesos de endocitosis mediada por receptores) representarían los elementos biológicamente importantes sujetos a control (Fig.5) (Bauer, 1987a).

No se conocen los mecanismos que regulan las concentraciones intracelulares de los neuropéptidos en las terminales nerviosas. Una posibilidad es que algunas peptidasas pudieran llevar a cabo este control de manera que pudieran afectar las pozas intracelulares del péptido, en particular, la(s) disponible(s) para liberarse. Para las células que sintetizan neuropéptidos, la degradación pudiera representar un sistema de seguridad que regule las concentraciones del péptido que se produce en exceso, por ejemplo bajo condiciones en que la secreción es suprimida. Sin embargo, aún en este caso, parecería que las enzimas solubles tampoco podrían jugar un papel

directo en la regulación de las concentraciones intracelulares de péptido, puesto que los sitios de síntesis, almacenamiento y liberación necesariamente están separados del sitio de degradación y porque la distribución del TRH y de las enzimas no coincide. Por lo tanto, otros mecanismos que determinen la translocación del péptido del sitio de almacenamiento al sitio de degradación constituirían los elementos importantes de control, pero no las enzimas por sí mismas. Sin embargo, existe la posibilidad de que las enzimas solubles PGAI y PE, aunque muy poco concentradas en la terminal nerviosa, estuvieran presentes en las neuronas TRH-érgicas o en neuronas que contengan otro péptido en particular. Desafortunadamente, tales mecanismos de translocación para los neuropéptidos son aún desconocidos y muy difíciles de evaluar experimentalmente.

Si tales mecanismos de translocación existen y juegan un papel biológicamente importante, se esperaría que los niveles intracelulares de TRH aumentaran cuando su degradación es bloqueada por el uso de inhibidores específicos. Idealmente, estos inhibidores deberían ajustarse a ciertos criterios (Bauer, 1987a) : 1) no ser tóxicos, 2) ser permeables al menos en membranas celulares y de preferencia deberían de poder atravesar la barrera hematoencefálica, 3) ser relativamente estables, 4) ser altamente reactivos, y 5) selectivos. De preferencia, estos inhibidores deberían de estar dirigidos contra el sitio activo de las enzimas en cuestión, produciendo una inhibición irreversible de las mismas.

Los inhibidores específicos de la PGAI y la PE utilizados en este estudio se ajustan a estos criterios (Wilk, 1989). Sin embargo.

nuestros resultados muestran que ni el contenido in vivo e in vitro ni la liberación basal o estimulada de TRH y LHRH cambian en respuesta al tratamiento con estos compuestos en varias áreas del cerebro, la hipófisis o el páncreas de roedores, excepto el contenido de ambos péptidos en respuesta a un tratamiento prolongado in vivo en el bulbo olfatorio. Tratamientos prolongados in vitro utilizando cultivo de órgano (eminencia media) o cultivos primarios de células hipotalámicas, tampoco modifican el contenido y la liberación basal o estimulada de TRH.

Nuestros resultados están de acuerdo con los de T. C. Friedman (no publicados), quien observó que después de una sola inyección intraperitoneal de PDMK y ZPP, administrados individualmente o en combinación, no había efecto sobre los niveles de TRH cerebrales aún 12 horas después del tratamiento.

Por otro lado, nuestros resultados no concuerdan con los de Faivre-Bauman y col. (1986), quienes observaron que un inhibidor específico de la PE (Z-Gli-ProCHN<sub>2</sub>) inhibe también a la PGAI y aumenta el contenido de TRH y la liberación basal y estimulada por concentraciones depolarizantes de KCl en células hipotalámicas en cultivo. Utilizando dos sistemas de cultivo diferentes e inhibidores específicos de cada enzima, nosotros no observamos ningún cambio sobre el TRH endógeno o liberado. La discrepancia de estos resultados podría deberse a un efecto inespecífico del inhibidor usado por el grupo de Faivre-Bauman, ya que las enzimas poseen especificidades diferentes por sus sustratos. Es posible que además de inhibir a la PGAI y a la PE este compuesto modifique otras actividades enzimáticas intracelulares y que ésto tenga un efecto indirecto sobre los niveles de TRH, o bien que, dada su naturaleza

lipofílica, pueda afectar las membranas celulares de manera inespecífica y, por lo tanto, modificar la liberación, como se ha sugerido en otros casos (Jochen y Berhanu, 1987). Además, este inhibidor no modifica los niveles de TRH in vivo en el hipotálamo (Bauer, 1988). Estas observaciones en conjunto sugieren que las enzimas solubles PGAI y PE no están involucradas en la regulación de los niveles de TRH en células neuronales.

Aunque el LHRH es un buen sustrato de la PGAI y de la PE in vitro, la inhibición de la enzima in vivo o in vitro no tuvo efecto sobre los niveles endógenos o liberados de LHRH. Se ha propuesto que el sitio inicial de corte del LHRH es el enlace tir<sup>5</sup>-gli<sup>6</sup> y que éste se lleva a cabo por la acción de la endopeptidasa 24.15 (Krause y col., 1982; Molineaux y col., 1988). La inyección in vivo de un inhibidor dirigido contra el sitio activo de esta enzima aumenta los niveles de LHRH en el cerebro (Molineaux y col., 1988). Además, la actividad de esta enzima está sujeta a regulación endócrina (Krause y col., 1982; Lapp y O'Conner, 1986). En contraste, no se observa ninguna alteración en la actividad de la PE durante el ciclo estral (Advis y col., 1982). Sin embargo, si el LHRH pudiera ser degradado in vivo por la PGAI y la PE, su inhibición específica debería aumentar los niveles del péptido. Como en el caso de TRH, podemos concluir que estas enzimas tampoco participan en la regulación de los niveles intra-terminales de LHRH.

El hecho de que los niveles de TRH y LHRH hayan disminuido en el bulbo olfatorio en respuesta al tratamiento in vivo con los inhibidores por 13 horas fue un resultado contrario a lo esperado.

La posibilidad de que este cambio pudiera deberse a la inducción de una o ambas enzimas por efecto del(los) inhibidor(es), como se ha observado en el caso de la PGAI en células GH<sub>3</sub> por su inhibidor específico (5-oxoprolinal) (Friedman y col., 1986), puede descartarse, ya que la PGAI de bulbo olfatorio está notablemente inhibida, aunque en menor proporción que en el resto del cerebro. El tratamiento con ZPP no inhibió a la PE a ninguno de los tiempos estudiados in vivo. Sin embargo, la inhibición de la enzima in vitro en el bulbo olfatorio fue comparable a la obtenida en el resto del cerebro, lo cual descarta la posibilidad de que en el bulbo olfatorio existiera una forma de PE distinta a la del cerebro (isoenzima).

La diferencia en los patrones de inhibición de la PGAI y la PE en el bulbo olfatorio y en el cerebro podría deberse a una accesibilidad diferente de los compuestos en ambos tejidos. Sin embargo, el hecho de que estos compuestos sean de naturaleza lipofílica y que al menos para el caso de la PGAI se haya observado una inhibición pronunciada a tiempos cortos, parece descartar esta posibilidad. Alternativamente, las tasas de metabolismo de estos compuestos podrían ser diferentes en ambas regiones. Se ha sugerido que algunas enzimas del tipo de las deshidrogenasas aldehídica y alcohólica podrían intervenir en el catabolismo del ZPP, transformándolo a sus derivados ácido y alcohólico respectivos (Friedman y col., 1984), los cuales poseen una potencia inhibitoria varios órdenes de magnitud menor al compuesto original (Wilk y Orlowski, 1983). La actividad de estas deshidrogenasas es diferente dependiendo del tejido, y en este sentido, la única posibilidad es

que en el bulbo olfatorio la actividad catalitica de estas enzimas fuera extraordinariamente alta.

Por lo tanto, la disminucion en el contenido de TRH y LHRH en el bulbo olfatorio no parece estar relacionada directamente con la actividad de las enzimas solubles.

Ademas de los sistemas degradativos, la secrecion y/o el procesamiento de los precursores podrian afectar los niveles de los péptidos en las terminales nerviosas. La posibilidad de que PDMK y/o ZPP aumenten la liberacion de TRH in vivo (y probablemente de LHRH), de manera que disminuya el péptido en el tejido, no parece ser el caso, puesto que los inhibidores no tienen efecto sobre la liberacion in vitro.

Por otra parte, el bulbo olfatorio se comporta de manera diferente al hipotálamo en cuanto a TRH. Por ejemplo, se ha propuesto que en el bulbo olfatorio el precursor de TRH se procesa de manera diferente al resto del cerebro (Lechan y col., 1987). Ademas, esta region contiene la menor actividad de PAM en el cerebro (alrededor de 40 veces menos que en el hipotálamo) (Meng y Tsou, 1988). Si PDMK o ZPP tienen efectos inespecificos sobre otras actividades enzimáticas, como por ejemplo sobre la PAM, la inhibicion de esta enzima por alguno de estos compuestos resultaria en una disminucion en el contenido de los péptidos. La presencia de una baja actividad de PAM en el bulbo olfatorio podria representar uno de los pasos limitantes en el procesamiento terminal de los péptidos, de tal manera que la inhibicion de esta produciria efectos considerables sobre su contenido. Por otra parte, la disminucion en

el contenido pudiera deberse a un efecto de los compuestos en otra etapa del procesamiento de los precursores. Además, la liberación basal de TRH en esta región es muy alta y el tejido no responde a una estimulación por  $K^+$  (Méndez y col., 1987). La actividad de la PGAI es de las más altas medidas en el cerebro (Vargas y col., 1987). La PGAI es inhibida in vivo en menor proporción que la enzima de cerebro y la PE no es inhibida in vivo por sus inhibidores específicos (este trabajo). La PGAI es regulada por hormonas tiroideas (Suen y Wilk, 1989a). Estos datos en conjunto hacen pensar que el bulbo olfatorio representa una región en la que el proceso de síntesis y secreción de TRH pudiera ser diferente al que ocurre en otras regiones del cerebro y, por lo tanto, constituye un objeto de estudio atractivo para futuras investigaciones en esta dirección.

En conclusión, nuestros datos confirman la hipótesis de que las enzimas solubles PGAI y PE no controlan los niveles endógenos de TRH o LHRH, ya que probablemente las enzimas nunca entran en contacto con los péptidos in vivo y están de acuerdo con la distribución subcelular de las enzimas y los péptidos en las terminales nerviosas. Estas enzimas tampoco regulan los niveles extracelulares de los péptidos, ya que no se liberan en respuesta a una estimulación, aunque existe la posibilidad de que las enzimas solubles se secreten por la vía constitutiva, como se ha mostrado para algunas proteínas (Kelly, 1985, 1988). En este sentido, cabe mencionar que en líquido cefaloraquídeo de muchos mamíferos se ha detectado una actividad de PGA (Prasad y col., 1987a), que en el hombre disminuye con la edad (Prasad y col., 1987b). La actividad de esta enzima en el líquido cefaloraquídeo probablemente es el

resultado de la enzima liberada de muchas áreas del SNC, especialmente de la médula espinal, evento que pudiera reflejar una secreción constitutiva de la enzima a este nivel.

Nuestros resultados no se contraponen con el hecho de que los metabolitos producidos por estas enzimas, el His-Pro-DKP y el TRH-OH, están presentes en muchas áreas del SNC (Prasad y col., 1982; Emerson y col., 1980) y que exhiben efectos en estas regiones (Prasad, 1985; Boschi y col., 1980). Aunque se ha demostrado que el His-Pro-DKP se libera en respuesta a alto  $K^+$  y que este evento es dependiente de  $Ca^{2+}$  extracelular (Iriuchijima y Wilber, 1987), no se ha podido demostrar la presencia de receptores al dipéptido cíclico en tejido nervioso, pero sí en médula adrenal y en hígado (Prasad, 1989). Por otra parte, tampoco existen evidencias que apoyen que el dipéptido se metaboliza (Prasad, 1989). Los niveles de His-Pro-DKP en sangre, líquido cefaloraquídeo y cerebro no correlacionan con los de TRH (Mori y col., 1982a,b; Yamada y Wilber, 1989; Prasad, 1989). Tampoco hay correlación con la actividad de PGA que lo produce, ni durante el desarrollo ni durante el envejecimiento o en estados farmacológicos alterados (Prasad y col., 1987a). Estas observaciones han llevado a especular sobre el origen del His-Pro-DKP, y el grupo de Jackson ha sugerido que no todo el His-Pro-DKP proviene de TRH, sino que una parte podría derivarse del precursor de TRH a partir de la secuencia Gln-His-ProNH<sub>2</sub> (Lechan y col., 1986), ya que este precursor se localiza en el cerebro en las mismas áreas en las que se encuentra el dipéptido cíclico, lo cual proporciona las bases bioquímicas para postular que el dipéptido podría originarse directamente a partir del precursor de TRH sin la formación de éste como paso intermediario (Lechan y col., 1986;



Lechan y Jackson, 1986). Alternativamente, otro precursor distinto al de TRH podría originar His-Pro-DKP (Yamada y Wilber, 1989) o bien, a través de la síntesis de novo del dipéptido a partir de los aminoácidos que lo constituyen (Prasad, 1987a, 1989).

Puesto que la secuencia precursora inmediata de His-Pro-DKP es His-Pro-NH<sub>2</sub>, y ya que existe en el cerebro una enzima membranaral capaz de producir His-Pro a partir de esta secuencia, la dipeptidil dipeptidasa IV (E.C.3.4.14.5), existe la posibilidad de que la formación de His-Pro compita con la ciclización no enzimática de His-Pro-NH<sub>2</sub>, evento que ya ha sido demostrado in vitro con membranas sinaptosomales (O'Connor y O'Cuinn, 1986; O'Cuinn y col., 1990). Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que existen receptores a His-Pro en cerebro (Coggins y col., 1987) y porque este dipéptido tiene efectos en el SN cuando se le administra intracerebroventricularmente (Coggins y col., 1986).

Ya que las enzimas solubles no están implicadas en la degradación intracelular del TRH y el LHRH, otros mecanismos podrían llevar a cabo esta función, tales como la fusión de las vesículas que contienen los péptidos con lisosomas. Alternativamente, otra enzima soluble podría ser la responsable, como lo han sugerido Kreider y col. (1981), quienes suponen la existencia de una tercera enzima soluble en el cerebro que puede degradar al TRH directamente hasta ProNH<sub>2</sub>. Sin embargo, esta enzima no ha sido caracterizada.

Finalmente, habría que considerar la posibilidad de que la PGAI<sub>1</sub> intragranular pudiera regular los niveles de TRH intracelularmente mientras la enzima es transportada hacia su sitio de anclaje en la membrana plasmática.

Aunque no se ha identificado un papel fisiológico para las enzimas solubles en la inactivación de TRH o LHRH, éstas podrían representar un mecanismo a través del cual los péptidos liberados de células dañadas o vesículas viejas regresarían a la poza de aminoácidos, como han sugerido O'Cuinn y col. (1990).

Degradación del TRH por enzimas extracelulares. - La rápida inactivación del TRH liberado en distintas áreas del SNC parece ser un evento de capital importancia y un requisito para que el péptido pueda funcionar como un factor de comunicación neuronal (Fig. 7). Con respecto a los procesos enzimáticos, existen esencialmente dos posibilidades (Bauer, 1987a): en analogía a la inactivación de acetilcolina por la acetilcolinesterasa, se esperaría que la inactivación de los neuropéptidos liberados en sinapsis fuera catalizada por enzimas localizadas en la vecindad de los receptores al péptido. Desempeñando funciones especializadas de "aclaramiento" en los sitios blanco, tales enzimas deberían de ser importantes para la transmisión de la siguiente señal. Aún más, estas enzimas podrían modificar directamente la concentración de estas sustancias en sus sitios blanco, así como en la duración de su acción y, por lo tanto, en la respuesta biológica.

En contraste, las enzimas localizadas sobre las neuronas en sitios lejanos al sitio de interacción de la célula blanco, o bien en otras células, podrían actuar sobre los péptidos sólo después de su difusión y, por lo tanto, estas enzimas sólo podrían llevar a cabo funciones generales de eliminación. La existencia de tales enzimas sería un inconveniente para estudios farmacológicos, factor que debe tomarse en cuenta cuando se administran neuropéptidos

exógenamente. Sin embargo, biológicamente estas enzimas pudieran desempeñar una función importante : mantener el sistema de comunicación evitando que los péptidos se acumulen y alcancen otros sitios blanco.

La identificación de una enzima específica para TRH, la PGAI, heterogéneamente distribuida en el SNC, presente en membranas sinaptosomales como una ectoenzima, y regulada por hormonas tiroideas de manera tejido-específica, refuerza la posibilidad de que esta peptidasa lleva a cabo funciones muy especializadas y probablemente regulatorias. La localización preferencial de la PGAI en neuronas sugiere que esta enzima desempeña una función importante en la terminación de la acción del TRH en sus sitios blanco. Nuestros resultados sobre el efecto de un inhibidor específico de la enzima, el CPHNA, sobre la recuperación de los niveles liberados de TRH de al menos tres regiones del cerebro de rata, sugieren que efectivamente éste es el caso. Sin embargo, experimentos in vivo apoyarían esta sugerencia. Aún más, el hecho de que el aumento en los niveles recuperables de TRH liberado de estas tres regiones en presencia del inhibidor correlacione con la actividad específica de la enzima en las mismas, apoya aún más esta hipótesis.

El CPHNA no tiene efecto sobre los receptores a TRH y no inhibe a la PE. La débil inhibición de la PGAI por este compuesto a la concentración utilizada en los experimentos de liberación (0.1mM), no parece contribuir al efecto observado, ya que los inhibidores específicos de la PGAI y la PE no afectan los niveles recuperables de TRH liberado. Puesto que las rebanadas de tejido se lavan exhaustivamente antes de agregar el inhibidor, es prácticamente

imposible que la "Tiroliberinasa" sérica contribuya a la degradación del TRH en estas condiciones.

Por otra parte, el efecto de CPHNA es específico para TRH, ya que el inhibidor no afecta la liberación basal de GABA, Met-enc y dopamina. Considerando que los niveles de TRH en los tejidos estudiados no cambian y ya que la PGAI es una ectoenzima, proponemos que la recuperación aumentada de TRH liberado se debe a la inhibición de un mecanismo de inactivación extracelular, la PGAI.

Si bien la liberación basal de GABA, Met-enc y dopamina no es afectada por CPHNA, la liberación estimulada por concentraciones depolarizantes de KCl en los dos primeros casos disminuye significativamente. Esto puede deberse a que la secreción de sustancias neuroactivas es sensible a algunos compuestos que modifican proteínas (Augustine y col., 1987). Por ejemplo, la N-etilmaleimida bloquea la secreción en células cromafines permeabilizadas (Knight y Baker, 1982; Wilson y Kirshner, 1983; Frye y Holz, 1985) y en huevos de erizo de mar (Jackson y col., 1985), lo que sugiere que los grupos sulfhidrilo tienen una función importante en una proteína implicada en el mecanismo de secreción. En contraste, la N-etilmaleimida y compuestos que reaccionan con grupos -SH aumentan la liberación de sinapsis neuromusculares intactas (Carlen y col., 1976; Carmody, 1978), sinaptosomas (Baba y col., 1979), rebanadas de tejido (Wade y col., 1981) y células PC12 (Pozzan y col., 1984). Es probable que los efectos de estos compuestos sobre terminales nerviosas intactas se deban a aumentos

en las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y/o a acciones citotóxicas generales (Pozzan y col., 1984).

Además, un inhibidor de la actividad degradativa de LHRH (el N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona) aumenta la liberación del péptido de eminencia media a través de un mecanismo que parece implicar la activación de un componente en la membrana de las células (Advis y col., 1988).

Por otra parte, actualmente se piensa que la secreción de sustancias neuroactivas está mediada a través de la activación de metaloendoproteasas. La fusión dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de mioblastos aparentemente requiere de la actividad de una metaloendoproteasa (Couch y Strittmatter, 1983, 1984). El mecanismo por el cual esta enzima aumenta la fusión es desconocido. Esta proteasa requiere  $\text{Zn}^{2+}$  u otros metales pesados e hidroliza enlaces peptídicos en el lado amino terminal de aminoácidos hidrofóbicos. Así, los dipéptidos sintéticos que sean sustratos de esta enzima podrían usarse como sondas, ya que competirían con los sustratos celulares que median las respuestas correspondientes.

Puesto que existe cierto paralelismo entre la fusión celular y la exocitosis, se piensa que probablemente se requiera también de la actividad de una metaloendoproteasa en la exocitosis. El quelante de metales pesados 1, 10-fenantrolina, bloquea la secreción de histamina de mastocitos intactos (Mundy y Strittmatter, 1985). Los péptidos sintéticos que son sustratos de la enzima bloquean la secreción de mastocitos (Mundy y Strittmatter, 1985), los potenciales de placa en la unión neuromuscular de rata (Baxter y col., 1983) y la liberación de glicina inducida por depolarización en retina de *Xenopus* (Frederick y col., 1984). Otros inhibidores de

metaloendoproteasas bloquean la secreción en estas tres preparaciones. La única evidencia en contra de esta hipótesis es que los dipéptidos sintéticos que son sustratos de la enzima no parecen afectar la transmisión en sinapsis de calamar gigante (Augustine y col., 1987).

Por lo tanto, el efecto de CPHNA observado sobre la liberación estimulada de GABA y Met-enc pudiera explicarse como un efecto inespecífico del compuesto a nivel de una de las etapas terminales del proceso de secreción, probablemente sobre la metaloendoproteasa descrita.

~~Una serie de datos indica que la PGAI es la única enzima que~~ puede entrar en contacto con el TRH en el espacio sináptico o en otros fluidos extracelulares para degradarlo; en este sentido, cabe mencionar que el TRH es esencialmente degradado en suero por la "Tiro liberinasa" (Wilk y Friedman, 1985). Estas evidencias incluyen las propiedades catalíticas y la especificidad de la PGAI, su localización preferencial en el cerebro, en neuronas y en membranas sinaptosomales, como una ectoenzima, así como nuestros resultados sobre la recuperación de TRH liberado en presencia de un inhibidor específico de la enzima, y el hecho de que las peptidasas solubles PGAI y PE no se liberan en respuesta a depolarización. Los datos en conjunto permiten concluir que la enzima tiene un papel específico en el funcionamiento de algunos circuitos neuronales. La comparación de la distribución regional de la enzima con la del TRH y sus receptores, así como con la de la liberación basal y estimulada por concentraciones depolarizantes de KCl en varias regiones del cerebro

de rata. revela que no existe una correlación estricta (Méndez y col., 1987; Vargas y col., 1987). Por lo tanto, es posible que en el cerebro, a pesar de los conocimientos actuales sobre la especificidad de la PG<sub>II</sub>, la enzima tenga otros sustratos fisiológicos, como se ha demostrado para otras peptidasas, como la endopeptidasa 24.11 (Turner, 1988).

Si bien el conjunto de evidencias sugiere que la degradación enzimática por la PG<sub>II</sub> es el mecanismo principal de inactivación del TRH extracelular, no puede descartarse la posibilidad de que los demás mecanismos de inactivación participen en este proceso en condiciones fisiológicas particulares o en regiones cerebrales determinadas. En este sentido, cabe mencionar que el material inmunoreactivo que se libera del hipotálamo in vitro corresponde a tres entidades moleculares distintas, de las cuales la más abundante es TRH auténtico (Méndez y col., sometido). Las otras dos formas son inmunológicamente semejantes a TRH, de un peso molecular muy similar y más hidrofóbicas que TRH (Méndez y col., sometido). Dichas formas podrían corresponder a moléculas de TRH modificadas covalentemente, proceso que pudiera estar ligado a la liberación del péptido, como se ha sugerido en el caso de  $\alpha$ -MSH (Martens y col., 1981; Vaudry y col., 1983), o bien, ser moléculas tipo TRH sustituidas en alguno de sus aminoácidos (Fekary y col., 1983, 1985; Cockle y col., 1989), o corresponder a extensiones cortas de la molécula de TRH en sus extremos NH<sub>2</sub> o COOH terminales como intermediarios del procesamiento del precursor de TRH, cuya presencia se ha demostrado ya en algunos tejidos (Cockle y Smyth, 1986, 1987, 1988). Otros autores han reportado también la presencia de moléculas adicionales tipo TRH.

Por ejemplo, Biggins y col. (1983) detectaron 4 formas distintas en líquido cerebroespinal humano. y Sheward y col. (1983) reportaron la presencia de tres formas en sangre portal de rata, la más abundante de las cuales es TRH auténtico, mientras que las otras dos son más hidrofóbicas que éste. Por lo tanto, de estos estudios queda claro que la existencia de formas adicionales tipo TRH parece ser un fenómeno generalizado y, que posiblemente alguna(s) de ella(s) podría(n) ser el resultado de la acción de un mecanismo de inactivación distinto a la degradación enzimática.

El presente estudio es la primera evidencia que demuestra la acción de una enzima responsable del catabolismo de TRH en fluido extracelular en el cerebro. Nuestros resultados sugieren que la enzima podría estar localizada cerca del sitio de liberación del péptido, aunque esto queda por verificarse. Estudios de inmunocitoquímica, utilizando inhibidores específicos o el anticuerpo de la PGAII marcados radioactivamente podrían ayudar a resolver este problema. Por lo tanto, la PGAII puede incluirse actualmente dentro de la lista de peptidasas responsables de la inactivación extracelular de los neuropéptidos. Por el momento, ésta es la única "neuropeptidasa específica" conocida. Su alta especificidad sugiere que a partir de las consecuencias funcionales de su inhibición, puede inferirse el papel fisiológico del TRH en el cerebro. Sin embargo, falta aún por demostrar que la inhibición específica de la enzima *in vitro* y/o *in vivo* es capaz de modificar la transmisión TRH-érgica en el cerebro para poder concluir sin lugar a dudas que la PGAII es la responsable de la inactivación fisiológica del TRH.



Finalmente, llama la atención el hecho de que a pesar de una inhibición de sólo un 40% de la PGaII con CPHNA, el efecto observado sobre la recuperación de TRH liberado es significativo. Por lo tanto, estos estudios estimulan la búsqueda de otros inhibidores más potentes y selectivos de la PGaII. El diseño de este tipo de compuestos sería de gran utilidad en el estudio del funcionamiento y la regulación de la PGaII in vivo y, probablemente también en el tratamiento de algunas enfermedades nerviosas en las que el TRH pudiera estar implicado, como se ha sugerido, por ejemplo, en la esclerosis amiotrófica lateral. -

## CONCLUSION GENERAL

A la fecha no se ha podido demostrar de manera concluyente la existencia de un mecanismo intracelular de inactivación de los neuropéptidos. Podría pensarse que los reajustes en los niveles intra-terminales de neuropéptidos son el resultado de un equilibrio entre la biosíntesis y la liberación de los mismos, a menos que exista(n) otro(s) mecanismo(s) intracelular(es) de inactivación, por ejemplo a través de la fusión de vesículas con lisosomas.

Las evidencias actuales apoyan a la degradación enzimática como el mecanismo principal de inactivación extracelular de los neuropéptidos. Existen dos clases de peptidasas membranales responsables de este proceso : peptidasas específicas para un solo neuropéptido, clase que actualmente sólo incluye a la PG<sub>II</sub>, y un número relativamente pequeño de exo- y endopeptidasas con sitios activos con preferencia por oligopéptidos sobre proteínas. Los sitios activos de éstas últimas, exhiben una amplia especificidad en cuanto a las cadenas laterales de residuos aminoácidos determinados en relación a sus propiedades químicas y conformacionales.

La localización de las células que expresan una actividad enzimática en particular es fundamental en la determinación de la especificidad biológica y la importancia de la hidrólisis enzimática de los mensajes peptídicos. El hecho de que las peptidasas tengan una amplia especificidad no invalida esta conclusión. Por el contrario, la amplia especificidad de las peptidasas tiene relevancia fisiológica si se piensa que muchos neuropéptidos se co-liberan de las mismas terminales nerviosas y varios neuropéptidos

pueden estar presentes en el medio ambiente de una neurona bajo regulación polisináptica. De esta forma, un neuropéptido podría regular la concentración de otro por competencia, en forma tal que la concentración y, quizás también la acción del neuropéptido con la Km más alta, sería mantenida por este tipo de mecanismo. Por lo tanto, la amplia especificidad de las peptidasas representa más bien una ventaja en la inactivación de los neuropéptidos en el SNC.

El uso de inhibidores específicos y no específicos de varias peptidasas ha puesto de manifiesto la importancia biológica que éstas tienen en los sistemas peptidérgicos. La mayoría de los estudios que han utilizado inhibidores ha dejado claro dos puntos : por un lado, los inhibidores mantienen elevados los niveles de los péptidos por un tiempo más prolongado; por otro lado, los inhibidores son capaces de potenciar el efecto de los péptidos. Estos son dos aspectos de importancia fundamental, ya que el tratamiento de algunas enfermedades nerviosas pudiera consistir en el diseño de inhibidores específicos de las peptidasas involucradas, controlándose los niveles del péptido en cuestión.

Por otra parte, las peptidasas, al hidrolizar a los neuropéptidos pueden generar otros péptidos biológicamente activos. Por ejemplo, la PGAI y la PGAI, al hidrolizar al TRH generan His-Pro-DKP (Bauer y Kleinkauf, 1980), el cual tiene efectos en el SNC, algunos de ellos similares a los del TRH que lo originó, mientras que otros son opuestos (Prasad, 1985). De igual manera, la PE, al hidrolizar a la sustancia P, produce un fragmento activo con mayor actividad biológica que el péptido del cual se derivó (Yajima y col., 1973;

Kitagawa y col., 1979). La producción de metabolitos biológicamente activos parece ser un fenómeno común en el SNC, lo cual resulta de especial interés, ya que se abre la posibilidad de que la actividad de una peptidasa no sólo regule los niveles de un péptido, sino también que pueda generar nuevas actividades en determinadas condiciones fisiológicas.

Finalmente, no puede excluirse la posibilidad de que uno o varios de los otros mecanismos descritos participen en la inactivación de los neuropéptidos, así como el hecho de que distintas regiones del cerebro utilicen mecanismos diferentes.

Una de las preguntas interesantes que quedan por estudiar se refiere a saber cómo un mismo efector es capaz de modificar simultáneamente la liberación y una de las otras etapas del metabolismo. El desarrollo de sistemas de cultivo in vitro de neuronas permitirá en un futuro responder a muchas de estas preguntas, así como la clonación de tipos celulares peptidérgicos específicos y de las enzimas involucradas en la inactivación. Asimismo, el desarrollo de nuevas metodologías permitirá estudiar en que circunstancias una determinada vía peptidérgica es activada o reprimida mediante la evaluación de las tasas de biosíntesis, liberación e inactivación de los péptidos involucrados in vivo y/o in vitro.

## REFERENCIAS

- Abraham F., Pisano J. J. and Udenfriend S. (1954). Uptake of carnosine by rat brain slices. Arch. Biochem. Biophys. 104 : 160-165.
- Advis J. P., Contijoch A. M., Urbanski H. F. and Ojeda S. R. (1988). N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone inhibits LHRH-degrading activity and increases *in vitro* LHRH release from the immature rat median eminence. Neuroendocrinology 47 : 102-108.
- Advis J. P., Krause J. E. and McKelvy J. F. (1982). Luteinizing Hormone-Releasing Hormone peptidase activities in discrete hypothalamic regions and anterior pituitary of the rat : apparent regulation during the prepubertal period and first estrous cycle and puberty. Endocrinology 110 : 1238-1245.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J. D. (1983). Chemical signalling between cells. In : Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc, New York and London, pp. 717-765.
- Augustine G. J., Charlton M. P. and Smith S. J. (1985). Calcium entry and transmitter release at voltage-clamped nerve terminals of squid. J. Physiol. 267 : 163-181.
- Augustine G. J., Charlton M. P. and Smith S. J. (1987). Calcium Action in Synaptic Transmitter Release. Ann. Rev. Neurosci. 10 : 633-693.
- Baba A., Fisherman J. S. and Cooper J. R. (1979). Action of sulphydryl reagents on cholinergic mechanisms in synaptosomes. Biochem. Pharmacol. 28 : 1879-1883.
- Back S. A. and Gorenstein C. (1985). Soc. Neurosci. Abstr. 15 : 389 (abstr.).
- Baird J. G., Dobson P. R. M., Wojcikiewicz R. J. H. and Brown B. L. (1983). Thyrotropin-releasing hormone stimulates inositol phosphate production in normal anterior pituitary cells and GH tumour cells in the presence of lithium. Bioscience Reports 3 : 1091-1099.
- Barnea A., Ben-Jonathan N. and Porter J. C. (1976). Characterization of hypothalamic subcellular particles containing luteinizing hormone releasing hormone and thyrotropin releasing hormone. J. Neurochem. 27 : 477-484.
- Barnea A. and Cho G. (1984). Evidence that copper-amino acid complexes are potent stimulators of the release of luteinizing Hormone-Releasing Hormone from isolated hypothalamic granules. Endocrinology 115 : 936-943.
- Bauer K. (1976). Regulation of degradation of thyrotropin releasing hormone by the thyroid hormones. Nature 259 : 591-593.

- Bauer K. (1983). Biomedical properties of TRH-inactivating enzymes. In: Thyrotropin Releasing Hormone (E. C. Griffiths and G. W. Bennett, eds.), Raven Press, New York, pp. 103-107.
- Bauer K. (1987a). Degradation and biological inactivation of Thyrotropin Releasing Hormone and other neuropeptides. In: Integrative Neuroendocrinology. Molecular, Cellular and Clinical Aspects (McCann, Weiner, eds.). 1st Int. Congr. Neuroendocrinology, San Francisco, Calif. 1986. Karger, Basel, pp. 102-114.
- Bauer K. (1987b). Adenohypophysial degradation of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormones. *Nature (Lond)* 330 : 375-377.
- Bauer K. (1988). 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* 70 : 69-74.
- Bauer K. and Kleinkauf H. (1980). Catabolism of thyroliberin by rat adenohypophyseal tissue extract. *Eur. J. Biochem.* 106 : 107-117.
- Bauer K. and Kleinkauf H. (1981). Degradation of TRF and TRF analogues by brain and serum enzymes. In: Structure and Activity of Natural Peptides (W. Voelter and G. Weitzel, eds.), Walter de Gruyter, Berlin, pp. 437-447.
- Bauer K. and Nowak P. (1979). Characterization of a thyroliberin degrading serum enzyme catalyzing the hydrolysis of thyroliberin at the pyroglutamate-histidine bond. *Eur. J. Biochem.* 99 : 239-246.
- Bauer K., Nowak P. and Kleinkauf H. (1981). Specificity of a serum peptidase hydrolyzing thyroliberin at the pyroglutanyl-histidine bond. *Eur. J. Biochem.* 118 : 173-176.
- Baxter D. A., Johnston D. and Strittmatter W. J. (1983). Protease inhibitors implicate metalloprotease in synaptic transmission at the mammalian neuromuscular junction. *PNAS* 80 : 4174-4178.
- Bennett G. W., Edwardson J. A., Holland D., Jeffcoate S. L. and White N. (1975). Release of immunoreactive luteinising hormone-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone from hypothalamic synaptosomes. *Nature* 257 : 323-325.
- Bennett G. W., Sharp T., Brazell M. and Marsden C. A. (1983). TRH and catecholamine neurotransmitter release in the Central Nervous System. In: Thyrotropin-Releasing Hormone (E. C. Griffiths and G. W. Bennett, eds.), Raven Press, New York, pp. 253-269.
- Berridge M. J. (1980). Receptors and calcium signalling. *TIPS* 1, november, 419-424.
- Berridge M. J. (1985). The molecular basis of communication within the cell. *Scientific American*, october, pp. 142-152.

Berridge M. J. (1986). Second messenger dualism in neuromodulation and memory. *Nature* 323 : 294-295.

Berridge M. J. and Irvine R. F. (1984). Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312 : 315-321.

Bier M. J., Goldfarb J., Orlowski M. and Wilk S. (1987). Intracerebroventricular infusion of inhibitors of endopeptidase-24.11 ("enkephalinase") increases the spontaneous firing frequency of an identifiable set of cells in the substantia nigra. *Eur. J. Pharmacol.* 142 : 321-330.

Biggins J. A., Das S., Dodd P. R., Edwardson J. A., Hardy J. A., McDermott J. R. and Smith A. I. (1983). Studies on the release, degradation and presynaptic actions of Thyrotropin Releasing Hormone. In : Thyrotropin Releasing Hormone (E. C. Griffiths and G. W. Bennett, eds.), Raven Press, New York, pp. 241-250.

Blalock J. E., Bost K. L. and Smith E. M. (1985a). Neuroendocrine peptide hormones and their receptors in the immune system. Production, processing and action. *J. Neuroimmunol.* 10 : 31-40.

Blalock J. E., Harbour-McMenamin D. and Smith E. M. (1985b). Peptide hormones shared by the neuroendocrine and immunologic systems. *J. Immunol. Suppl.* 125 : 858e-861s.

Boler J., Enzmann F., Folkers K., Bowers C. Y. and Schally A. V. (1969). The identity of chemical and hormonal properties of TRH and pyroglutamyl-histidyl-prolineamide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37 : 705-710.

Boschi G., Lauhay N. and Rips R. (1980). Induction of wet dog shakes by intracerebral acid TRH in rats. *Neurosci. Lett.* 16 : 209-212.

Bradbury A. F. and Smyth D. G. (1985). C-terminal amide formation in peptide hormones. In : Biogenetics of neurohormonal peptides (R. Hakanson and J. Thorell, eds.), Academic Press, Inc. (London) Ltd., pp. 171-186.

Braitman D. J., Auker C. R. and Carpenter D. O. (1980). Thyrotropin-releasing hormone has multiple actions in cortex. *Brain Res.* 194 : 244-248.

Bratton A. C. and Marshall J. E. K. (1939). A new coupling component for sulfanilamide determination. *J. Biol. Chem.* 128 : 537-550.

Brecha N. C. and Karten H. J. (1983). Identification and localization of neuropeptides in the vertebrate retina. In : Brain Peptides (D. T. Krieger, M. J. Brownstein and J. B. Martin, eds.), John Wiley and Sons, New York, pp.437-462.

Brooks B. R. (1989). A summary of the current position of TRH in ALS therapy. In : Recent Advances in the Biomedical Significance of Thyrotropin Releasing Hormone (G. Metcalf and I. M. D. Jackson, eds.), Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 553. New York, pp. 431-461.

Brown P. and O'Cuinn G. (1983). An evaluation of the role of a pyroglutamyl peptidase, a post-proline cleaving enzyme and a post-proline dipeptidyl aminopeptidase, each purified from the soluble fractions of guinea-pig brain, in the degradation of thyroliberin in vitro. Eur. J. Biochem. 137 : 75-87.

Brownstein M. J., Russell J. T. and Gainer H. (1980). Synthesis, transport and release of posterior pituitary hormones. Science 207 : 373-378.

Brownstein M. J., Palkovits M., Saavedra J. M., Bassiri R. M. and Utiger R. D. (1974). Thyrotropin-releasing hormone in specific nuclei of rat brain. Science 185 : 267-269.

Brunet N., Gourdjii D., Tixier-Vidal A., Pradelles P. H., Morgat J. L. and Fromageot P. (1974). Chemical evidence for associated TRF with subcellular fractions after incubation of intact rat prolactin cells (GH) with <sup>3</sup>H-labelled TRF. FEBS Letts. 38 : 129-133.

Burgus R., Dunn T. F., Desiderio D., Ward D. W., Vale W. and Guillemin R. (1970). Characterization of the hypothalamic hypophysiotropic TSH-releasing factor (TRF) of bovine origin. Nature 226 : 321-325.

Burt D. R. and Snyder S. N. (1975). Thyrotropin-releasing hormone (TRH) : apparent receptor binding in rat brain membranes. Brain Res. 93 : 309-328.

Busby W. H. Jr., Quackenbush G. E., Humm J., Youngblood W. W. and Kizer J. S. (1987). An enzyme(s) that converts glutaminyl peptides into pyroglutamyl-peptides. J. Biol. Chem. 262 : 8532-8535.

Busby W. H., Youngblood W. W. and Kizer J. S. (1982). Studies of substrate requirements, kinetic properties and competitive inhibitors of the enzymes catabolizing TRH in rat brain. Brain. Res. 242 : 267-270.

Carlen P. L., Kosower E. M. and Werman R. (1976). The thiol-oxidating agent diamide increases transmitter release by decreasing calcium requirements for neuromuscular transmission in the frog. Brain Res. 117 : 257-276.

Carmody J. J. (1978). Enhancement of acetylcholine secretion by two sulfhydryl reagents. Eur. J. Pharmacol. 47 : 457-460.

Chan-Palay V., Jonsson G. and Palay S. L. (1978). Serotonin and substance P coexist in neurons of the rat's central nervous system. PNAS 75 : 1582-1586.



Chan-Palay V. and Palay S. L. (1984). Cerebellar Purkinje cells have GAD, motilin and CSAD immunoreactivity. Existence and coexistence of GABA, motilin and taurine. In : Coexistence of Neuroactive Substances (V. Chan-Palay and S. L. Palay, eds.), John Wiley and Sons, New York, pp. 1-22.

Chang T. L., Gainer H., Russell J. T. and Loh Y. P. (1982). Proopiomelanocortin-converting enzyme activity in bovine neurosecretory granules. *Endocrinology* 111 : 1607-1614.

Chang T. L. and Loh Y. P. (1983). Characterization of proopiomelanocortin converting activity in rat anterior pituitary secretory granules. *Endocrinology* 112 : 1832-1838.

Chappell M. C., Loh Y. P. and O'Donohue T. L. (1982). Evidence for an opiomelanotropin acetyltransferase in the rat pituitary neurointermediate lobe. *Peptides* 3 : 405-410.

Charli J. L., Cruz C., Vargas M. A. and Joseph-Bravo P. (1988). The narrow specificity pyroglutamate aminopeptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochem. Int.* 13 : 237-242.

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

Charli J. L., Ponce G., McKelvey J. F. and Joseph-Bravo P. (1984). Accumulation of thyrotropin releasing hormone by rat hypothalamic slices. *J. Neurochem.* 42 : 981-986.

Chen Y. F. and Ramirez V. D. (1981). Serotonin stimulates thyrotropin-releasing hormone release from superfused rat hypothalamus. *Endocrinology* 109 : 2359-2366.

Childs G. V., Yang H.-Y., Tobin R. B., Wilber J. F. and Kubek M. (1981). Effects of thyroidectomy, propylthiouracil, and thyroxine on pituitary content and immunocytochemical staining of thyrotropin (TSH) and thyrotropin releasing hormone (TRH). *J. Histochem. Cytochem.* 29 : 357-363.

Chubb I. W. and Smith A. D. (1975a). Isoenzymes of soluble and membrane bound acetylcholinesterase in bovine splanchnic nerve and adrenal medulla. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 191 : 245-261.

Chubb I. W. and Smith A. D. (1975b). Release of acetylcholinesterase into the perfusate from the ox adrenal gland. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 191 : 263-269.

Cockle S. M., Aitken A., Beg F. and Smyth D. G. (1989). A novel peptide, pyroglutamylglutamylproline amide, in the rabbit prostate complex, structurally related to thyrotropin releasing hormone. *J. Biol. Chem.* 264 : 7788-7791.

Cockle S. M. and Smyth D. G. (1986). Processing of the thyrotropin releasing hormone (TRH) precursor in *Xenopus* skin and bovine hypothalamus : evidence for the existence of extended forms of TRH. *Regulatory Peptides* 14 : 217-227.

Cockle S. M. and Smyth D. G. (1987). Specific processing of the thyrotropin releasing prohormone in rat brain and spinal cord. *Eur. J. Biochem.* 165 : 693-698.

Cockle S. M. and Smyth D. G. (1988). Processing of thyrotropin releasing hormone-related peptides in rabbit hypothalamus and prostate. *Biochemical Society Transactions*. 626th. Meeting, Sheffield, pp. 784-785.

Coggins P. J., McDermott J. R. and Snell C. R. (1987). High affinity specific binding of the thyrotropin releasing hormone metabolite histidylproline to rat brain membranes. *Neuropeptides* 9 : 83-91.

Coggins P. J., Sahgal A., McDermott J. R., Snell C. R., Keith A. B. and Edwardson J. A. (1986). Histidyl-Proline, a rapidly degraded metabolite of thyrotropin releasing hormone, has behavioural activity. *Pharmacol. Biochem. and Behav.* 24 : 1229-1233.

Couch C. B. and Strittmatter W. S. (1982). Rat myoblast fusion requires metalloendoprotease activity. *Cell* 32 : 257-265.

Couch C. B. and Strittmatter W. S. (1984). Specific blockers of myoblast fusion inhibit a soluble and not the membrane-associated metalloendoprotease in myoblasts. *J. Biol. Chem.* 259 : 5396-5399.

Covarrubias L., Charli J. L., Uribe R. M., Cruz C., Méndez M. y Joseph-Bravo P. *Bioquímica celular de la neurona peptidérgica : III. Regulación. En : Neuro péptidos en Neurobiología* (A. Bayon, ed.), México (en prensa).

Covarrubias L., Uribe R. M., Méndez M., Charli J. L. and Joseph-Bravo P. (1988). Neuronal TRH synthesis : developmental and circadian TRH mRNA levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151 : 615-622.

Covarrubias L., Uribe R. M., Méndez M., Charli J. L. and Joseph-Bravo P. (1989). Hypothalamic TRH mRNA regulation under different physiological conditions. In : *Recent Advances in the Biomedical Significance of Thyrotropin Releasing Hormone*. (G. Metcalf and I. M. D. Jackson, eds.), *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 553, New York, pp.476-478.

Cruz C., Charli J. L. and Joseph-Bravo P. Neuronal localization of pyroglutamyl peptidase II. (sometido).

De la Baume S., Gros C., Yi C. C., Chaillet P., Marcais-Collado H., Costentin J. and Schwartz J. C. (1982). Selective participation of both "enkephalinase" and aminopeptidase activities in the metabolism of endogenous enkephalins. *Life Sci.* 31 : 1753-1756.

Di Polo R. and Beauge L. (1983). The calcium pump and sodium-calcium exchange in squid axons. *Ann. Rev. Physiol.* 45 : 313-324.

Dixon M. (1953). The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* 55 : 170-171.

Docherty K. and Steiner D. F. (1982). Post-translational proteolysis in polypeptide hormone biosynthesis. *Ann. Rev. Physiol.* 44 : 625-638.

Drouva S. V., Epelbaum J., Hery M., Tapia-Arancibia L., Laplante E. and Kordon C. (1981). Ionic channels involved in the LHRH and SRIF release from rat mediobasal hypothalamus. *Neuroendocrinology* 32 : 155-162.

Duello T. M., Nett T. M. and Farquhar M. G. (1983). Fate of a gonadotropin-releasing hormone agonist internalized by rat pituitary gonadotrophs. *Endocrinology* 112 : 1-10

Dumont J. E. and Lamy F. (1980). The regulation of thyroid cell metabolism, function, growth, and differentiation. In: *The Thyroid Gland* (M. De Visscher, ed.), Raven Press, New York, pp. 153-167.

Dyess E. M., Segerson T. P., Liposits Z., Paull W. K., Kaplan M. M., Wu P., Jackson I. M. D. and Lechan R. M. (1988). Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 123 : 2291-2297.

Eiden L. E., Giraud P., Dave J. R., Hotchkiss A. J. and Affolter H. V. (1984). Nicotine receptor stimulation activates enkephalin release and biosynthesis in adrenal chromaffin cells. *Nature* 312 : 661-663.

Eipper B. A. and Mains R. E. (1988). Peptide  $\alpha$ -Amidation. *Ann. Rev. Physiol.* 50 : 333-344.

Eipper B. A., May V. and Braas K. M. (1988). Membrane-associated Peptidyl-glycine  $\alpha$ -Amidating Monooxygenase in the heart. *J. Biol. Chem.* 263 : 8371-8379.

Eipper B. A., Myers A. C. and Mains R. E. (1985). Peptidyl-Glycine  $\alpha$ -Amidation activity in tissues and serum of the adult rat. *Endocrinology* 116 : 2497-2504.

Emerson C. H., Vogel W. and Currie B. L. (1980). Concentrations of thyrotropin releasing hormone (TRH) and deamido-TRH and TRH-deamidase activity in brain. *Endocrinology* 107 : 443-449.

Emerson C. H. and Wu C. F. (1987). Thyroid states influences rat serum but not brain TRH pyroglutamyl aminopeptidase activities. *Endocrinology* 120 : 1215-1217.

Faden A. I., Vink R. and McIntosh T. K. (1989). Thyrotropin-Releasing Hormone and Central Nervous System Trauma. In: Recent Advances in the Biomedical Significance of Thyrotropin-Releasing Hormone (G. Metcalf and I. M. D. Jackson, eds.), Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 553, New York, pp. 380-384.

Faivre-Bauman A., Loudes C., Barret A., Patte C. and Tixier-Vidal A. (1988). Ontogenesis of peptidyl glyceryl  $\alpha$ -amidation activity in the mouse hypothalamus *in vivo* and in serum-free medium cultures. Relation with thyroliberin (TRH) accumulation and release *in vitro*. Developmental Brain Research 40 : 261-267.

Faivre-Bauman A., Loudes C., Barret A., Tixier-Vidal A. and Bauer K. (1986). Possible role of neuropeptide degrading enzymes on thyroliberin secretion in fetal hypothalamic cultures grown in serum-free medium. Neuropeptides 7 : 125-138.

Farquhar M. G. (1977). Secretion and crinophagy in prolactin cells. Adv. Exp. Med. Biol. 80 : 37-94.

Fink G., Koch Y. and Ben Aroya N. (1983). TRH in hypophysial portal blood : characteristics of release and relationship to thyrotropin and prolactin secretion. In : Thyrotropin-Releasing Hormone (E. C. Griffiths and G. W. Bennett, eds.), Raven Press, New York, pp. 127-143.

Fraser H. M. and McNeilly A. S. (1982). Effect of chronic immunoneutralization of thyrotropin-releasing hormone on the hypothalamic pituitary-thyroid axis, prolactin and reproductive function in the ewe. Endocrinology 111 : 1964-1973.

Frederick J. M., Hollyfield J. G. and Strittmatter W. J. (1984).

Inhibitors of metalloendoprotease activity prevent K<sup>+</sup>-stimulated neurotransmitter release from the retina of *Xenopus laevis*. J. Neurosci. 4 : 3112-3119.

Fricker L. D. and Snyder S. H. (1983). Purification and characterization of enkephalin convertase, an enkephalin synthesizing carboxypeptidase. J. Biol. Chem. 258 : 10950-10955.

Friedman T. C., Davies T. F. and Wilk S. (1986). Evidence for regulation of a Thyrotropin-Releasing Hormone degradation pathway in GH cells. Endocrinology 118 : 562-566.

3

Friedman T. C., Orlowski M. and Wilk S. (1984). Prolyl endopeptidase : inhibition *in vivo* by N-benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal. J. Neurochem. 42 : 237-241.

Friedman T. C. and Wilk S. (1985). The effect of inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase on TRH degradation in rat serum. Biochem. Biophys. Res. Commun. 132 : 787-794.

Friedman T. C. and Wilk S. (1985). 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. *J. Neurochem.* 45 : 1231-1238.

Frye R. A. and Holz R. W. (1985). Arachidonic acid release and catecholamine secretion from digitonin-treated chromaffin cells : effects of micromolar calcium, phorbol ester, and protein alkylating agents. *J. Neurochem.* 44 : 265-273.

Fujita T. (1985). Neurosecretion and new aspects of neuroendocrinology. In : Neurosecretion and the Biology of Neuropeptides. Proc. 9th Int. Symp. on Neurosecretion (H. Kobayashi, H. Bern and H. A. Urano, eds.), Tokyo : Japan Sci. Soc. Press, and Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo : Springer-Verlag, pp. 521-528.

Gainer H., Russell J. T. and Loh Y. P. (1985). The enzymology and intracellular organization of peptide precursor processing : the secretory vesicle hypothesis. *Neuroendocrinology* 40 : 171-184.

Ganten D., Lang R. E., Lehmann E. and Unger T. (1984). Brain angiotensin : on the way to becoming a well-studied neuropeptide system. *Biochem. Pharmacol.* 23 : 3523-3528.

Garat B., Miranda J., Charli J. L. and Joseph-Bravo P. (1985). Presence of a membrane bound pyroglutamyl aminopeptidase degrading thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Neuropeptides* 6 : 27-40.

George S. R. and van Loon G. R. (1981). Met-enkephalin uptake by a synaptosome-enriched fraction of rat striatum. *Neurosci. Lett.* 26 : 297-300.

Geras E., Rebecchi M. J. and Gershengorn M. C. (1982). Evidence that stimulation of thyrotropin and prolactin secretion by thyrotropin-releasing hormone occur via different calcium-mediated mechanisms : studies with verapamil. *Endocrinology* 110 : 901-906.

Gershengorn M. C. (1989). Mechanism of signal transduction by TRH. In : Recent Advances in the Biomedical Significance of Thyrotropin Releasing Hormone (G. Matcalf and I. M. D. Jackson, eds.), Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 552. New York, pp. 191-196.

Gibson T. R. and Glembotski C. C. (1985). Acetylation of  $\alpha$ -MSH and  $\beta$ -endorphin by rat neurointermediate pituitary secretory granule-associated acetyltransferase. *Peptides* 6 : 615-620.

Glembotski C. C. (1982). Characterization of the peptide acetyltransferase activity in bovine and rat intermediate pituitaries responsible for the acetylation of endorphin and  $\alpha$ -melanotropin. *J. Biol. Chem.* 257 : 10501-10509.

Glembotski C. C., Manaker S., Winokur A. and Gibson T. R. (1986). Ascorbic acid increases the thyrotropin-releasing hormone content of hypothalamic cell cultures. *J. Neurosci.* 6 : 1796-1802.

Goetzl E. J. (1985). Neuromodulation of immunity and hypersensitivity. *J. Immunol. Suppl.* 135 : 729s-863s.

Goldberg J. A. and Rutenburg A. M. (1958). The colorimetric determination of leucine aminopeptidase in urine and serum of normal subjects and patients with cancer and other diseases. *Cancer* 11 : 283-291.

Green A. R. and Grahame-Smith D. G. (1974). TRH potentiates behavioral changes following increased brain 5-hydroxytryptamine accumulation in rats. *Nature* 251 : 524-526.

Greenfield S. (1986). Release of acetylcholinesterase from nigrostriatal neurons. In : *Cellular Biology of Ectoenzymes* (G. W. Kreutzberg et al, eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 246-254.

Greenfield S. A. and Shaw S. G. (1982). Release of acetylcholinesterase and aminopeptidase *in vivo* following infusion of amphetamine into the substantia nigra. *Neuroscience* 7 : 2883-2893.

Grosvenor C. E. and Mena F. (1980). Evidence that thyrotropin releasing hormone and hypothalamic prolactin releasing hormone factor may function in the releasing of prolactin in the lactating rat. *Endocrinology* 107 : 863-868.

Hansson E. (1988). *Prog. Neurobiol.* 30 : 369.

Harkness D. H. and Brownfield M. S. (1985). Intra and intersegmental distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in rat spinal cord : topographical variation and presence in the dorsal horn. *SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, 15th Annual Meeting, Dallas, Texas, October 20-25, pp.* 349.

Hartter D. E. and Ramirez V. D. (1980). The effects of ions, metabolic inhibitors, and colchicine on luteinizing Hormone-Releasing Hormone release from superfused rat hypothalamus. *Endocrinology* 107 : 375-382.

Hazum E., Chang K. and Cuatrecasas P. (1979). Rapid degradation of <sup>3</sup>(H)-leucine-enkephalin by intact neuroblastoma cells. *Life Sci.* 22 : 1327-1334.

Heal D. J., Pycock C. J., Youdim M. B. H. and Green A. R. (1983). Actions of TRH and its analogues on the mesolimbic dopamine system. In : *Thyrotropin-Releasing Hormone* (E. C. Griffiths and G. W. Bennett, eds.). Raven Press, New York, pp. 271-282.

Herbert E. and Uhler M. (1982). Polyprotein precursors to regulatory peptides. *Cell* 30 : 1-2.

Hersh L. B. (1985). Characterization of membrane bound aminopeptidases from rat brain. Identification of the enkephalin degrading aminopeptidase. *J. Neurochem.* 44 : 1427-1435.

Hersh L. B. and McKelvy J. F. (1979). Enzymes involved in the degradation of thyrotropin releasing hormone (TRH) and luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) in bovine brain. Brain Res. 168 : 553-564.

Hersh L. B., Smith T. E. and McKelvy J. F. (1980). Cleavage of endorphins to des-tyr endorphins by homogeneous bovine brain aminopeptidase. Nature 288 : 160-162.

Hinkle P. M. and Goh K. B. C. (1982). Regulation of thyrotropin releasing hormone receptors and responses by L-triiodothyronine in dispersed rat pituitary cells cultures. Endocrinology 110 : 1725-1731.

Hökfelt T., Elde R., Fuxe K., Johansson O., Ljungdahl A., Goldstein M., Luft R., Efendic S., Nilsson G., Terenius L., Gauten D., Jeffcoate S. L., Rechfeld J., Said S., Perez de la Mora M., Possani L., Tapia R., Teran L. and Palacios R. (1978). Aminergic and peptidergic pathways in the nervous system with special reference to the hypothalamus. In : The Hypothalamus (S. Reichlin, R. J. Baldessarini and J. B. Martin, eds.), Raven Press, New York, pp. 69-135.

Hökfelt T., Johansson O. and Goldstein M. (1984). Chemical anatomy of the brain. Science 225 : 1326-1334.

Hökfelt T., Johansson O., Ljungdahl A., Lundberg J. and Schultzberg M. (1980a). Peptidergic Neurons. Nature 284 : 515-521.

Hökfelt T., Lundberg J. M., Schultzberg M., Johansson O., Ljungdahl A. and Rehfeld J. (1980b). Coexistence of peptides and putative transmitters in neurons. In : Neural Peptides and Neuronal Communication. (E. Costa and M. Trabucchi, eds.), Raven Press, New York, pp. 1-23.

Holaday J. W. (1984). Neuropeptides in shock and traumatic injury : sites and mechanisms of action. In : Neuroendocrine Perspectives. Vol. 3 (E. E. Müller and R. M. MacLeod, eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 161-169.

Horst W. D., Spirt N. and Bautz G. (1979). Influence of thyrotropin-releasing hormones on the synaptic availability of catecholamines in brain. In : Central Nervous System Effects of Hypothalamic Hormones and other Peptides (R. Collu et al., eds.), Raven Press, New York, pp. 141-143.

Horsthemke B., Le Blanc P., Kordon C., Waltiaux-De Coninck S., Waltiaux R. and Bauer K. (1984). Subcellular distribution of particle-bound neutral peptidases capable of hydrolyzing gonadoliberin, thyroliberin, enkephalin and substance P. Eur. J. Biochem. 139 : 315-320.

Hughes J., Smith T., Kosterlitz H., Fothergill I. A., Morgan B. A. and Morris H. R. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature 258 : 577-579.

- Hui K.-S., Wang Y.-J., Wong K.-H., Tsai H. and Lajtha A. (1981). Regional and subcellular distribution of Met- and Leu-enkephalin-degrading activity in rat brain. *Neuropeptides* 1 : 167-173.
- Iriuchijima T. and Wilber J. F. (1987). *Endocrinology* 120 : 915-918.
- Iversen L. L., Lee C. M., Gilbert R. F., Hunt S. and Emson P. C. (1980). Regulation of neuropeptide release. *Proc. R. Soc. Lond. B* 210 : 91-111.
- Jackson I. M. D. (1989). Controversies in TRH biosynthesis and strategies towards the identification of a TRH precursor. In : *Recent Advances in the Biomedical Significance of Thyrotropin Releasing Hormone* (G. Metcalf and I. M. D. Jackson, eds.), *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 553, New York pp. 7-13.
- Jackson I. M. D. and Lechan R. M. (1983). Thyrotropin releasing hormone. In : *Brain Peptides* (D. T. Krieger, M. J. Brownstein and J. B. Martin, eds.), John Wiley and Sons, New York, pp. 661-685.
- Jackson I. M. D. and Reichlin S. (1974). Thyrotropin releasing hormone (TRH) : distribution in hypothalamic and extrahypothalamic brain tissues of mammalian and submammalian chordates. *Endocrinology* 95 : 854-862.
- Jackson R. C., Ward K. K. and Haggerty J. G. (1985). Mild proteolytic digestion restores exocytotic activity to N-ethylmaleimide-inactivated cell surface complex from sea urchin eggs. *J. Cell Biol.* 101 : 6-11.
- Jan Y. N. and Jan L. Y. (1983). Electrophysiological techniques. In : *Brain Peptides* (D. T. Krieger, M. J. Brownstein and J. B. Martin, eds.), John Wiley and Sons, New York, pp. 547-564.
- Johansson O., Hökfelt T., Jeffcoate S. L., White N. and Spindel E. (1983). Light and electron microscopic immunohistochemical studies on TRH in the Central Nervous System of the rat. In : *Thyrotropin-releasing hormone* (E. C. Griffiths and G. W. Bennett, eds.), Raven Press, New York, pp. 19-22.
- Johansson O., Hökfelt T., Pernow B., Jeffcoate S. L., White N., Steinbusch H. W. M., Verhofstad A. A. J., Emson P. C. and Spindel E. (1981). Immunohistochemical support for three putative transmitters in the neuron : coexistence of 5-hydroxytryptamine, substance P- and thyrotropin releasing hormone-like immunoreactivity in medullary neurons projecting to the spinal cord. *Neuroscience* 6 : 1857-1881.
- Jochen A. and Berhanu P. (1987). Effects of metalloprotease inhibitors on insulin binding, internalization and processing in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142 : 205-212.
- Joseph-Bravo P., Charli J. L., Palacios J. M. and Kordon C. (1979). Effect of neurotransmitters on the *in vitro* release of immunoreactive thyrotropin releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 104 : 801-806.



Kalivas P. W. and Horita A. (1983). Involvement of the septohippocampal system in the TRH antagonism of pentobarbital narcosis. In: Thyrotropin-releasing hormone (E. C. Griffiths and G. W. Bennett, eds.). Raven Press, New York, pp. 283-290.

Kardon F., Marcus R. J., Winokur A. and Utiger R. D. (1977). Thyrotropin-releasing hormone content of rat brain and hypothalamus: results of endocrine and pharmacological treatments. *Endocrinology* 100 : 1604-1609.

Kelly R. B. (1985). Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* 220 : 25-32.

Kelly R. B. (1988). The cell biology of the nerve terminal. *Neuron* 1 : 431-438.

Kenny J. (1986). Cell surface peptidases are neither peptide-non organ-specific. *TIES*, January 1986 : 40-42.

Kerwin R. W. and Pycocock C. J. (1979). Thyrotropin releasing hormone stimulates release of H-dopamine from slices of rat nucleus accumbens *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.* 67 : 323-325.

Kitagawa K., Ujita K., Kiso Y., Akita T., Nakata Y., Nakamoto N., Segawa T. and Yajima H. (1979). Synthesis and activity of C-terminal heptapeptides of tachykinins and bombesin-like peptides. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 27 : 48-57.

Kizer J. S., Palkovits M., Tappaz M., Kebebian J. and Brownstein M. J. (1976). Distribution of releasing factors, biogenic amines and related enzymes in the bovine median eminence. *Endocrinology* 98 : 685-695.

Klein M., Shapiro E. and Kandel E. R. (1980). Synaptic plasticity and the modulation of the Ca<sup>++</sup> current. *J. Exp. Biol.* 89 : 117-157.

Knight D. E. and Baker P. F. (1982). Calcium-dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields. *J. Membr. Biol.* 68 : 107-140.

Knisatschek H. and Bauer K. (1979). Characterization of "thyroliberin-deamidating enzyme" as a post-proline cleaving enzyme. *J. Biol. Chem.* 254 : 10936-10943.

Koida M. and Walter R. (1976). Post proline cleaving enzyme. Purification of this endopeptidase by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 261 : 7593-7599.

Koshiya K., Kato T., Tanaka R. and Kato T. (1984). Brain peptidases: their possible neuronal and glial localization. *Brain Res.* 324 : 261-270.

Koshiya K., Okada M., Imai K., Kato T., Tanaka R., Hatanka M. and Kato T. (1985). Localization of angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and other peptidase in cultured neuronal or glial cells. *Neurochem. Int.* 7 : 125-130.

Krause J. E., Advis J. P. and McKelvy J. F. (1982). Characterization of the site of cleavage of LHRH under conditions of measurements in which LHRH degradation undergoes physiologically related changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102 : 1475-1481.

Kreider M. S., Winokur A. and Krieger N. R. (1981). Pathways of TRH degradation in rat brain. *Neuropeptides* 1 : 455-463.

Krieger D. T., Brownstein M. J. and Martin J. B. (1983). Introduction. In : *Brain Peptides* (D. T. Krieger, M. J. Brownstein and J. B. Martin, eds.), John Wiley and Sons, New York, pp. 1-12.

Kuljis R. O. and Karten H. J. (1982). Laminar organization of peptide-like immunoreactivity in the anuran optic tectum. *J. Comp. Neurol.* 212 : 188-201.

La Bella F. S., Pinsky C. and Dua A. (1986). Specific binding and uptake of opioids in brain slices. *Neuropeptides* 7 : 109-112.

Labrie B., Barden N., Poirier G. and De Lean A. (1972). Binding of thyrotropin releasing hormone to plasma membranes of bovine anterior pituitary gland. *PNAS* 69 : 283-287.

LaGamma E. F., White J. D., Adler J. D., Krause J. E., McKelvy J. F. and Black I. B. (1985). Depolarization regulates adrenal proenkephalin mRNA. *PNAS* 82 : 8252-8255.

Lapp C. A. and O'Conner J. L. (1986). Hypothalamic and pituitary enzymatic degradation of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone during the 4-day estrous cycle of the rat. Assessment by high-performance liquid chromatography. *Neuroendocrinology* 42 : 230-238.

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

Lechan R. M. and Jackson I. M. D. (1986). Immunolocalization of the thyrotropin-releasing hormone pro-hormone in the rat central nervous system. *Endocrinology* 119 : 1210-1216.

Lechan R. M. and Segerson T. P. (1989). Pro-TRH gene expression and precursor peptides in rat brain. Observations by hybridization analysis and immunocytochemistry. In : *Recent Advances in the Biomedical Significance of Thyrotropin Releasing Hormone* (G. Metcalf and I. M. D. Jackson, eds.), Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 553, New York, pp. 29-59.

Lechan R. M., Wu P., Forte S. and Jackson I. M. D. (1985). Immunolocalization of the TRH prohormone in the rat Central Nervous System. Society for Neuroscience, 15th Annual Meeting, Dallas, Texas, October 20-25, pp. 144.

Lechan R. M., Wu P. and Jackson I. M. D. (1987). Immunocytochemical distribution in rat brain of putative peptides derived from thyrotropin-releasing hormone prohormone. *Endocrinology* 121 : 1879-1891.

Lechan R. M., Wu P., Jackson I. M. D., Wolfe H., Cooperman S., Mandel G. and Goodman R. H. (1986). Thyrotropin-Releasing Hormone precursor : characterization in rat brain. *Science* 231 : 159-161.

Littlewood G. M., Iversen L. L. and Turner A. J. (1988). Neuropeptides and their peptidases : functional considerations. *Neurochem. Int.* 12 : 383-389.

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

Lynch D. R. and Snyder S. H. (1986). Neuropeptides : Multiple Molecular Forms, Metabolic Pathways, and Receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 773-799.

Maeda K. and Frohman L. A. (1980). Release of somatostatin and thyrotropin releasing hormone from rat hypothalamic fragments *in vitro*. *Endocrinology* 106 : 1837-1841.

Mains R. E., Myers A. C. and Eipper B. A. (1985). Hormonal, drug, and dietary factors affecting Peptidyl Glycine  $\alpha$ -Amidating Monooxygenase activity in various tissues of the adult male rat. *Endocrinology* 116 : 2505-2515.

Malfroy B., Swerts J. P., Guyon A., Roques B. P. and Schwartz J. C. (1978). High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature (Lond)* 275 : 523-526.

Martens G. J. M., Jenks B. G. and van Overbeke A. P. (1981). N $\alpha$ -acetylation is linked to  $\alpha$ -MSH release from pars intermedia of the amphibian pituitary gland. *Nature* 294 : 558-560.

Martin T. F. J. (1989). Effects of TRH on secondary messenger systems. In : *Recent Advances in the Biomedical Significance of Thyrotropin Releasing Hormone* (G. Metcalf and I. M. D. Jackson, eds.), *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 553. New York, pp. 214-216.

Martin J. B., Boshans R. and Reichlin S. (1970). Feedback regulation of TSH secretion in rats with hypothalamic lesions. *Endocrinology* 87 : 1032-1037.

Martinez de la Escalera G., Guthrie J. and Weiner R. I. (1988). Transient removal of dopamine potentiates the stimulation of prolactin release by TRH but not VIP : stimulation via Ca<sup>2+</sup>/protein kinase C pathway. *Neuroendocrinology* 47 : 38-45.

Martinez de la Escalera G. and Weiner R. I. (1988). Mechanism(s) by which the transient removal of dopamine regulation potentiates the prolactin-releasing actions of thyrotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 47 : 186-193.

May V., Cullen E. I., Braas K. M. and Eipper B. A. (1988). Membrane-associated forms of Peptidylglycine  $\alpha$ -Amidating Monooxygenase activity in rat pituitary. Tissue Specificity. J. Biol. Chem. 263 : 7550-7554.

McKelvy J. F. (1977). Biosynthesis of hypothalamic peptides. In : Hypothalamic Peptide Hormones and Pituitary Regulation. (J. D. Porter, ed.). Plenum Press, New York. pp. 77-98.

McKelvy J. F., Krause J. E. and Advis J. P. (1982). Neuropeptide degradation. In : Molecular Genetic Neuroscience. (F. O. Schmitt, S. J. Bird and F. E. Bloom, eds.). Raven Press, New York, pp. 189-199.

Méndez M., Cisneros M., Joseph Bravo P. and Charli J. L. TRH and two other TRH immunoreactive molecules are released from rat hypothalamus *in vitro*. (sometido).

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

Méndez M., Vargas M. A., Joseph-Bravo P. y Charli J. L. Bioquímica celular de la neurona peptidérgica : II. Inactivación. En : Neuro péptidos en Neurobiología (A. Bayon, ed.), México (en prensa).

Meng F. and Tsou K. (1988). Biochemical mapping of Peptidyl-Glycine  $\alpha$ -Amidation activity in the rat CNS. J. Neurochem. 50 : 1352-1355.

Miller R. J. (1987). Multiple calcium channels and neuronal function. Science 235 : 46-52.

Miyamoto M., Narumi S., Nagai Y., Saji Y. and Nagawa Y. (1984). A TRH analog (DN-1417) : motor stimulation with rearing related to catecholaminergic mechanisms in rats. Neuropharmacology 23 : 61-72.

Molinsaux C. J., Laedun A., Michaud C. and Orlowski M. (1988). Endopeptidase-24.15 is the primary enzyme that degrades Luteinizing Hormone Releasing Hormone both *in vitro* and *in vivo*. J. Neurochem. 51 : 624-633.

Moore K. E. (1971). Biochemical correlates of behavioral effects of drugs. In : An Introduction to Psychopharmacology (R. H. Rech and K. E. Moore, eds.). Raven Press, New York. pp. 79-136.

Morel G., Gourdjji D., Grouselle D., ErUNET N., Tixier-Vidal A. and Dubois P. M. (1985). Immunocytochemical evidence for *in vivo* internalization of thyroliberin into rat pituitary target cells. Neuroendocrinology 41 : 312-320.

Mori M., Javaraman A., Prasad C., Pegues J. and Wilber J. F. (1982a). Distribution of histidyl-proline diketopiperazine [cyclo (His-Pro)] and thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the primate central nervous system. Brain Res. 245 : 183-186.

Mori M., Frankel G. and Walter J. F. (1985b). Regional dissociation of histidyl-proline diketopiperazine (cyclo (His-Pro)) and thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the rat brain. *Brain Res.* 231 : 451-453.

Mori M. and Yamada M. (1987). Thyroid hormones regulate the amount of thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic median eminence of the rat. *J. Endocr.* 114 : 443-448.

Mori M., Yamada M. and Kobayashi S. (1988). Role of the hypothalamic TRH in the regulation of its own receptors in rat anterior pituitaries. *Neuroendocrinology* 48 : 153-159.

Mundy D. L. and Strittmatter W. J. (1985). Requirement for metalloendoprotease in exocytosis : evidence in mast cells and adrenal chromaffin cells. *Cell* 40 : 645-656.

Nakata Y., Kusaka Y., Yajima H. and Segawa T. (1981). Active uptake of substance P carboxy-terminal heptapeptide (5-11) into rat brain and spinal chord slices. *J. Neurochem.* 37 : 1529-1534.

Nicoll R. A. (1977). Excitatory action of TRH on spinal motoneurons. *Nature* 265 : 242-243.

Nolan C., Margoliash E., Peterson J. D. and Steiner D. F. (1971). *J. Biol. Chem.* 246 : 2780-2795.

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

O'Connor B. and O'Quinn G. (1985a). Some properties of a synaptosomal membrane bound pyroglutamate aminopeptidase from guinea pig brain. *Biochem. Soc. Trans.* 13 : 485-486.

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

O'Connor B. and O'Quinn G. (1986). Post-proline dipeptidyl-aminopeptidase from synaptosomal membranes of guinea-pig brain : a possible role for this activity in the hydrolysis of His-ProNH<sub>2</sub> arising from the action of synaptosomal membrane pyroglutamate aminopeptidase on thyroliberin. *Eur. J. Pharmacol.* 154 : 329-335.

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

O'Quinn G., O'Connor B. and Elmore M. (1990). Degradation of thyrotropin-releasing hormone and luteinising hormone-releasing hormone by enzymes of brain tissue. *J. Neurochem.* 54 : 1-13.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

O'Donohue T. L. (1983). Identification of  $\beta$ -endorphin acetyltransferase in rat brain and pituitary gland. *J. Biol. Chem.* 258 : 2163-2167.

O'Donohue T. L. and Chappell M. C. (1982). Distribution of an enzyme which acetylates  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone in rat brain and pituitary gland and effects of arcuate nucleus lesions. *Peptides* 3 : 69-75.

O'Donohue T. L., Handelmann G. E., Chaconas T. Miller R. L. and Jacobowitz D. M. (1981). Evidence that N-acetylation regulates the behavioral activity of  $\alpha$ -MSH in the rat and human central nervous system. *Peptides* 2 : 333-344.

Ogawa N., Yamawaki Y., Kuroda H., Nukina I., Ota Z., Fujino M. and Yanaihara N. (1982). Characteristics of thyrotropin releasing hormone (TRH) receptors in rat brain. *Peptides* 3 : 669-677.

Orlowski M., Wilk E., Pearce S. and Wilk S. (1979). Purification and properties of a prolyl endopeptidase from rabbit brain. *J. Neurochem.* 33 : 461-469.

Osbahr A. J., Nemeroff C. B., Luttinger D., Mason G. A. and Prange A. J. Jr. (1981). Neurotensin-induced antinociception in mice : antagonism by thyrotropin-releasing hormone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 217 : 645-651.

Pacheco M. F., Woodward D. J., McKelvy J. F. and Griffin W. A. (1981). TRH in the rat cerebellum. II. Uptake by cerebellar slices. *Peptides* 2 : 283-288.

Padmanabhan V., Kesner J. S. and Convey E. M. (1981). Effects of triiodothyronine and thyroxine on thyrotropin and prolactin secretion from bovine pituitary cells *in vitro*. *Endocrinology* 108 : 226-231.

Palkovits M. (1984). Topography of chemically identified neurons in the Central Nervous System : Progress in 1981-1982. In : *Neuroendocrine Perspectives Vol. 3* (E. E. Müller and R. M. MacLeod, eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 1-69.

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

Patel Y. C. and Reichlin S. (1978). Somatostatin in hypothalamus, extrahypothalamic brain, and peripheral tissues of the rat. *Endocrinology* 102 : 523-530.

Pearse A. G. E. (1976). *Nature* (London) 262 : 92-95.

Pearse A. G. E. and Takor Takor T. (1979). Embryology of the diffuse neuroendocrine system and its relationship to the common peptides. *Federation Proc.* 38 : 2288-2294.

- Pekary A. E., Reeve J. R., Smith V. P., Friedman S. and Hershman J. M. (1985). *In Vitro* production of a TRH-homologous peptide and His-Pro-Diketopiperazine by human semen. *J. Androl.* 6 : 379-385.
- Pekary A. E., Sharp B., Briggs J., Carlson H. E. and Hershman J. M. (1983). High concentrations of pGlu-His-ProNH<sub>2</sub> (thyrotropin releasing hormone) occur in rat prostate. *Peptides* 4 : 915-919.
- Pickel V. M. (1985). General morphological features of peptidergic neurones. In : *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (A. B. Bjorklund and T. Hökfelt, eds.). Vol. 4, Elsevier, Amsterdam, pp. 72-92.
- Ponce G., Charli J. L., Pasten J. A., Aceves C. and Joseph-Bravo P. (1988). Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 48 : 211-213.
- Pozzan T., Gatti G., Dozio N., Vincentini L. M. and Meldolesi J. (1984). Ca<sup>2+</sup>-dependent and -independent release of neurotransmitters from PC12 cells : a role for protein kinase C activation ? *J. Cell Biol.* 99 : 628-638.
- Prange A. J. Jr., Nemeroff C. B., Loosen F. T. et al. (1979). Behavioral effects of thyrotropin-releasing hormone in animals and man : a review. In : *Central Nervous System Effects of Hypothalamic Hormones and other Peptides*. (R. Collu et al., eds.), Raven Press, New York, pp. 75-96.
- Prasad C. (1985). Thyrotropin Releasing Hormone. In : *Handbook of Neurochemistry*, Vol. 8 (A. Lajtha, ed.). Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 175-200.
- Prasad C. (1989). Neurobiology of cyclo (His-Pro). In : *Recent Advances in the Biomedical Significance of Thyrotropin Releasing Hormone* (G. Metcalf and I. M. D. Jackson, eds.), *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 553, New York, pp. 232-251.
- Prasad C., Jayaraman A., Robertson H. J. F. and Rao J. K. (1987a). Is all cyclo (His-Pro) derived from thyrotropin releasing hormone ? *Neurochem. Res.* 12 : 767-774.
- Prasad C., Mori M., Wilber J. F., Pierson W., Pegues J. and Jayaraman A. (1982). Distribution and metabolism of cyclo (His-Pro), a new member of the neuropeptide family. *Peptides* 3 : 591-598.
- Prasad C. and Peterkofsky A. (1976). Demonstration of pyroglutamyl peptidase and amidase activities toward thyrotropin-releasing hormone in hamster hypothalamic extracts. *J. Biol. Chem.* 251 : 3229-3234.
- Prasad C., Robertson H. J. F., Jayaraman A. and Rao J. K. (1987b). Pyroglutamate aminopeptidase activity in human cerebrospinal fluid decreases with age. *Neuropeptides* 9 : 41-44.
- Rehfeld J. F. (1985). Neuronal cholecystokinin : one or multiple transmitters ? *J. Neurochem.* 44 : 1-10.

- Renaud L. P., Blume H. W., Pittman G. J., Lamour Y. and Tan A. T. (1979). Thyrotropin-releasing hormone selectively depresses glutamate excitation of cerebral cortical neurons. *Science* 205 : 1275-1277.
- Ridgway E. C., Klibanski A., Martorana M. A., Milbury P., Kieffer J. D. and Chin W. W. (1983). The effect of somatostatin on the release of thyrotropin and its subunits from bovine anterior pituitary cells *in vitro*. *Endocrinology* 112 : 1937-1942.
- Roberts J. L., Eberwine J. H. and Gee C. E. (1983). Symposia on Quantitative Biology XLVIII, pp. 385-391.
- Rondeel M. M., de Greef W. J., van der Schoot P., Karels B., Klootwijk W. and Visser T. J. (1988). Effect of thyroid status and paraventricular area lesions on the release of thyrotropin-releasing hormone and catecholamines into hypophysial portal blood. *Endocrinology* 123 : 523-527.
- Ronning S. A., Heatley G. A. and Martin T. F. J. (1982). Thyrotropin-releasing hormone mobilizes Ca<sup>2+</sup> from endoplasmic reticulum and mitochondria of GH pituitary cells : characterization of cellular Ca<sup>2+</sup> pools by a method based on digitonin permeabilization. *PNAS* 79 : 6294-6298.
- Rouges B. P., Fournié-Zaluski K. C., Soroca E., Lecomte J. M., Malfroy E., Llorens C. and Schwartz J. C. (1980). The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice. *Nature (Lond)* 288 : 286-288.
- Rose C., Camus A. and Schwartz J. C. (1989). Protection by serine peptidase inhibitors of endogenous cholecystokinin released from brain slices. *Neuroscience* 29 : 583-594.
- Rostène W. H., Morgat J. L., Dussailant M., Rainbows T. C., Sarrieau A., Vial M. and Rosselin G. (1984). *In vitro* characterization and autoradiographic distribution of H-Thyrotropin releasing hormone binding sites in rat brain. *Neuroendocrinology* 29 : 81-86.
- Roth J. and Le Roith D. (1984). Intercellular communication : the evolution of scientific concepts and of messenger molecules. In : *Medicine, Science, and Society. Symposia celebrating the Harvard Medical School Bicentennial* (K. J. Isselbacher, ed.), John Wiley and Sons, New York, pp. 425-447.
- Rupnow J. H., Hinkle P. M. and Dixon J. E. (1979). A macromolecule which gives rise to thyrotropin releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89 : 721-728.
- Schally A. V., Coy D. H. and Meyers C. A. (1978). Hypothalamic regulatory hormones. *Ann. Rev. Biochem.* 47 : 89-128.
- Schally A. V., Redding T. W., Bowers C. Y. and Barrett J. F. (1969). Isolation and properties of TRH. *J. Biol. Chem.* 244 : 4077.



Scharrer B. (1987). Neurosecretion : Beginnings and New Directions in Neuropeptide Research. *Ann. Rev. Neurosci.* 10 : 1-17.

Schmidt-Achert K. M., Askanas V. and Engel W. K. (1984). Thyrotropin-releasing hormone enhances choline acetyltransferase and creatine kinase in cultured spinal ventral horn neurons. *J. Neurochem.* 43 : 586-589.

Schwartz J. C. (1983). Metabolism of enkephalins and the inactivating neuropeptidase concept. *Trends Neurosci.* 8 : 143-151.

Schwartz J. C., De la Baume S., Bouthenet M. L., Giros B., Gros C., Llorens-Cortez C., Pollard H., Sales N., Solhonne E., Costentin J. and Lecomte J. M. (1986). Neuropeptidases responsables de l'inactivation des enkephalines et pharmacologie de leur inhibiteurs. *J. Pharmacol.* (Paris) 17 : 104-122.

Schwartz J. C., Malfroy B. and De la Baume S. (1981). Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin dipeptidyl carboxypeptidase ("enkephalinase"). *Life Sci.* 29 : 1715-1740.

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

Sharp T., Bennett G. W. and Marsden C. A. (1982). Thyrotropin-releasing hormone analogues increase dopamine release from slices of rat brain. *J. Neurochem.* 39 : 1763-1766.

Sharp T., Tulloch I. F., Bennett G. W., Marsden C. A., Metcalf G. and Dettmar P. W. (1984). Analeptic effects of centrally injected TRH and analogues of TRH in the pentobarbitone-anaesthetized rat. *Neuropharmacology* 23 : 339-348.

Sheward W. J., Harmar A. J., Fraser H. M. and Fink G. (1983). Thyrotropin Releasing Hormone in rat pituitary stalk blood and hypothalamus : studies with high performance liquid chromatography. *Endocrinology* 113 : 1865-1869.

Shinoda H., Marini A. M., Cosi C. and Schwartz J. P. (1989). Brain region and gene specificity of neuropeptide gene expression in cultured astrocytes. *Science* 245 : 415-417.

Shiomi H., Watson S. J., Kelsey J. E. and Akil H. (1986). *Endocrinology* 119 : 1793-1799.

Shupnik M. A., Chin W. W., Habener J. F. and Ridgway E. C. (1986). Transcriptional regulation of the thyrotropin subunit genes by thyroid hormone. *J. Biol. Chem.* 260 : 2900-2903.

Sinard M., Pekary A. E., Smith V. P. and Hershman J. M. (1989a). Thyroid hormones modulate thyrotropin-releasing hormone biosynthesis in tissues outside the hypothalamic-pituitary axis of male rats. *Endocrinology* 125 : 524-531.

Simard M., Pekary A. E., Smith V. P. and Hershman J. M. (1989b). Thyroid hormone modulation of TRH precursor levels in rat hypothalamus, pituitary, thyroid gland and blood. *Peptides* 10 : 145-155.

Smyth D. G., Massey D. E., Zakarian S. and Finnie M. D. A. (1979). Endorphins are stored in biologically active and inactive forms : isolation of N- $\alpha$ -acetylpeptides. *Nature* 279 : 252-254.

Snyder S. H. (1985). The molecular basis of communication between cells. *Scientific American* october. pp. 132-141.

Soeda S., Yamakawa N., Shimeno H. and Nagamatsu A. (1986). Effects of polyamines on proline endopeptidase activity in rat brain. *J. Neurochem.* 46 : 1304-1307.

Solow C. (1971). Drug therapy of mental illness : tranquilizers and other depressant drugs. In : *An Introduction to Psychopharmacology* (R. H. Rech and K. E. Moore, eds.). Raven Press, New York, pp. 289-319.

Spirtes M. A., Plotnikoff N. P., Kostrzewa R. M., Marston C. T., Kastin A. J. and Christensen C. W. (1976). Possible association of increased rat behavioral effects and increased striatal dopamine and norepinephrine levels during the DOPA potentiation test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 5, Suppl. 1 : 121-124.

Steiner D. F., Docherty K., Chan S.-J., San Segundo B. and Carroll R. (1983). Intracellular proteolytic mechanisms in the biosynthesis of hormones and peptide neurotransmitters. In : *Biochemical and Clinical Aspects of Neuropeptides. Synthesis, Processing, and Gene Structure* (G. Koch and D. Richter, eds.). Academic Press, Inc. (London) Ltd., pp. 3-13.

Suen C.-S. and Wilk S. (1987). Regulation of a thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in GH<sub>3</sub> cells : induction of a pyroglutamyl peptidase I by 3,5,3'-triiodothyronine. *Endocrinology* 121 : 770-775.

Suen C.-S. and Wilk S. (1989a). Regulation of thyrotropin releasing hormone degrading enzymes in rat brain and pituitary by L-3,5,3'-triiodothyronine. *J. Neurochem.* 52 : 884-888.

Suen C.-S. and Wilk S. (1989b). Sodium butyrate induces pyroglutamyl peptidase I and decreases thyrotropin-releasing hormone receptors in GH<sub>3</sub> cells. *Endocrinology* 124 : 1654-1660.

Tashjian A. M., Barowsky N. J. and Jensen D. K. (1971). Thyrotropin releasing hormone : direct evidence for stimulation of prolactin production by pituitary cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43 : 516-522.

Tapia R. and Sitges M. (1982). Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* 250 : 291-299.

Tapia-Arancibia L., Arancibia S. and Astier H. (1984). K<sup>+</sup>-induced thyrotropin-releasing hormone release from superfused mediobasal hypothalamus in rats. Inhibition by somatostatin. *Neurosc. Lett.* 45 : 47-52.

Taylor R. L. and Burt D. R. (1981). Properties of H-(3-Me-His)-TRH binding to apparent TRH receptors in the sheep central nervous system. *Brain Res.* 218 : 207-217.

Taylor R. L. and Burt D. R. (1982). Species differences in the brain regional distribution of receptor binding for thyrotropin releasing hormone. *J. Neurochem.* 38 : 1649-1656.

Taylor W. L. and Dixon J. E. (1978). Characterization of a pyroglutamate aminopeptidase from rat serum that degrades thyrotropin releasing hormone. *J. Biol. Chem.* 253 : 6934-6940.

Thorn N. A., Chenoufi H.-L. and Tiefenthal M. (1985). The calcium-calmodulin-protein kinase system and the mechanism of release of neurohypophysial hormones. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 542, 124 : 300.

Torres H., Charli J. L., González-Noriega A., Vargas M. A. and Joseph-Bravo P. (1986). Subcellular distribution of the enzymes degrading thyrotropin releasing hormone and metabolites in rat brain. *Neurochem. Int.* 9 : 103-110.

Turner A. J. (1986). Processing and metabolism of neuropeptides. *Essays Biochem.* 22 : 69-119.

Turner A. J. (1987). Metabolism of enkephalins. *ISI Atlas of Science : Pharmacology* 1 : 74-77.

Turner A. J. (1988). Metabolism of Neuropeptides. *ISI Atlas of Science : Pharmacology*, pp. 362-366.

Uribe R. M. (1988). Regulación de la expresión del gene de TRH en el hipotálamo de rata. Tesis de maestría en Investigación Biomédica Básica.

Vargas M. A., Méndez M., Cisneros M., Joseph-Bravo P. and Charli J. L. (1987). Regional distribution of the membrane bound pyroglutamate aminopeptidase-degrading thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Neurosc. Lett.* 79 : 311-314.

Vaudry H., Jenks B. G. and van Overbeeke A. P. (1983). The frog pars intermedia contains only the non-acetylated form of  $\alpha$ -MSH : acetylation to generate  $\alpha$ -MSH occurs during the release process. *Life Sci.* 33 : 97-100.

Vindrola O., Briones R., Asai M. and Fernández-Guardiola A. (1981). Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in the rat brain. *Neurosc. Lett.* 21 : 39-43.

Vizi E. S. (1984). Conventional and non conventional release of transmitters/modulators. In : Non-synaptic Interactions between Neurons : Modulation of Neurochemical Transmission. Pharmacological and Clinical Aspects. John Wiley and Sons Ltd., New York, pp. 17-42.

Wade P. D., Fritz L. C. and Siekevitz P. (1981). The effect of diamide on transmitter release and on synaptic vesicle population at vertebrate synapses. *Brain Res.* 225 : 357-372.

Waksman G., Hamel E., Delay-Coyet E. and Roques B. P. (1986a). Neuronal localization of the neutral endopeptidase "enkephalinase" in rat brain revealed by lesions and autoradiography. *EMBO J.* 5 : 3163-3166.

Waksman G., Hamel E., Fournié-Zaluski M. C. and Roques B. P. (1986b). Autoradiographic distribution of the neutral endopeptidase "enkephalinase" and of  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptors in rat brain. *PNAS* 83 : 1523-1527.

Warberg J. (1982). Studies on the release mechanism for hypothalamic hormones. *Acta Endocrinol. Suppl.* 250 : 7-48.

Weber E., Evans C. J. and Barchas J. D. (1982). Predominance of the amino-terminal octapeptide fragment of dynorphin in rat brain regions. *Nature (London)* 299 : 77-79.

White J. D., Stewart K. D., Krause J. E. and McKelvy J. F. (1985). Biochemistry of peptide-secreting neurones. *Physiol. Rev.* 65 : 553-606.

Wilber J. F. and Seibel M. J. (1973). Thyrotropin-releasing hormone interactions with an anterior pituitary membrane receptor. *Endocrinology* 92 : 888-893.

Wilk S. (1983). Prolyl endopeptidase. *Life Sci.* 33 : 2149-2157.

Wilk S. (1986). Neuropeptide specific peptidases : does brain contains a specific TRH degrading enzyme ? *Life Sci.* 39 : 1487-1492.

Wilk S. (1989). Inhibitors of TRH-degrading enzymes. In : *Recent Advances in the Biomedical Significance of Thyrotropin Releasing Hormone* (G. Metcalf and I. M. D. Jackson, eds.), Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 553, New York, pp.252-264.

Wilk S. and Friedman T. C. (1985). The effect of inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase on TRH degradation in rat serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132 : 787-794.

Wilk S., Friedman T. C. and Kline T. B. (1985). Pyroglutamyl diazomethyl ketone : potent inhibitor of mammalian pyroglutamyl peptide hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130 : 662-668.

Wilk S. and Orlowski M. (1983). Inhibition of rabbit brain prolyl endopeptidase by N-benzyloxycarbonyl-prolyl-proline, a transition state aldehyde inhibitor. *J. Neurochem.* 41 : 69-75.

Wilk S. and Wilk E. K. (1989). Rabbit brain pyroglutamyl peptidase II, a membrane-bound TRH degrading enzyme. Purification and specificity studies. In : Recent Advances in the Biomedical Significance of Thyrotropin Releasing Hormone (G. Metcalf and I. M. D. Jackson, eds.), Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 553. New York. pp. 556-558.

Wilson S. P. and Kirshner N. (1983). Calcium-evoked secretion from digitonin-permeabilized adrenal medullary chromaffin cells. J. Biol. Chem. 258 : 4994-5000.

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

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

Yajima H., Kitagawa K. and Segawa T. (1973). Studies on peptides. XXXVIII. Structure-activity correlations in substance P. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 21 : 2500-2506.

Yamada M. and Wilber J. F. (1989). The distribution of histidyl-proline diketopiperazine [cyclo (His-Pro)] in discrete rat hypothalamic nuclei. Neuropeptides 13 : 221-223.

Yarbrough G. G. (1976). TRH potentiates excitatory actions of acetylcholine on cerebral cortical neurons. Nature 263 : 523-524.

Yarbrough G. G. and Singh D. K. (1979). Effects of MK-771 on the isolated amphibian spinal cord : comparison with thyrotropin-releasing hormone. Can. J. Physiol. Pharmacol. 57 : 920-922.

Yehuda S. and Kastin A. J. (1980). Peptides and Thermoregulation. Neurosci. Biobehav. Rev. 4 : 459-471.

Zubieta M., Vindrola O., Talavera E., Asai M., Massarini A. and Linares G. (1985). Pentylentetrazol-induced seizures produce an increased release of ir-met-enkephalin from rat striatum in vitro. Brain Res. 360 : 101-107.