



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"IZTACALA"

ONTOGENIA DE LA ACTIVIDAD DE LA PIROGLU-
TAMATO AMINOPEPTIDASA II EN VARIAS ZONAS
DEL CEREBRO Y PANCREAS DE LA RATA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

Jorge Herrera Díaz



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

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	13
OBJETIVOS.....	21
MATERIALES Y METODOS..	22
RESULTADOS.....	26
DISCUSION.....	35
CONCLUSION.....	46
BIBLIOGRAFIA.....	47

INTRODUCCION

En los organismos superiores, la comunicación entre sus componentes es una condición para conservar la integridad funcional del animal y para adaptarse a su medio ambiente. Estos organismos poseen diferentes sistemas de comunicación intercelular, a través de los cuales coordinan la actividad de las células que los integran.

Dentro de la comunicación intercelular encontramos el sistema hormonal, que cuenta con las glándulas, como los emisores de la información, y sus productos, las hormonas, sirven de transmisores químicos que por conducto de la corriente sanguínea llevan dicha información hasta sus receptores (órgano blanco).

Por otra parte, el sistema nervioso, que cuenta con células nerviosas o neuronas que reciben, conducen y transmiten señales electroquímicas enviadas de una neurona a otra mediante zonas especializadas de contacto conocidas como sinapsis.

La comunicación entre el sistema nervioso y el endócrino da origen a la comunicación neuroendócrina, que se lleva a cabo en la relación hipotálamo-hipófisis en vertebrados; en este sistema las neuronas hipotalámicas envían sus proyecciones hasta la eminencia media donde liberan sustancias al sistema portal

hipotalámico-hipofisiario, de donde son transportadas a su órgano blanco, la adenohipófisis. (fig 1)

Al determinar la estructura química de sustancias biológicamente activas presentes en el sistema nervioso central (SNC) y en particular las sustancias hipotalámicas hipofisiotrópicas, se descubrió que existe una clase importante de mensajeros químicos de estructura péptidica; los neuropéptidos. Dentro de los cuales ya han sido aislados y caracterizados varios de ellos entre los que podemos señalar a:

- Hormona liberadora de la hormona luteinizante y foliculo estimulante (LHRH) (117).

- Hormona liberadora de corticotropina (CRF) (118). -Hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GRF)(119).

- Hormona inhibidora de la liberación de la hormona de crecimiento (SRIF) (120).

- Hormona liberadora de tirotrópina (TRH)(1).

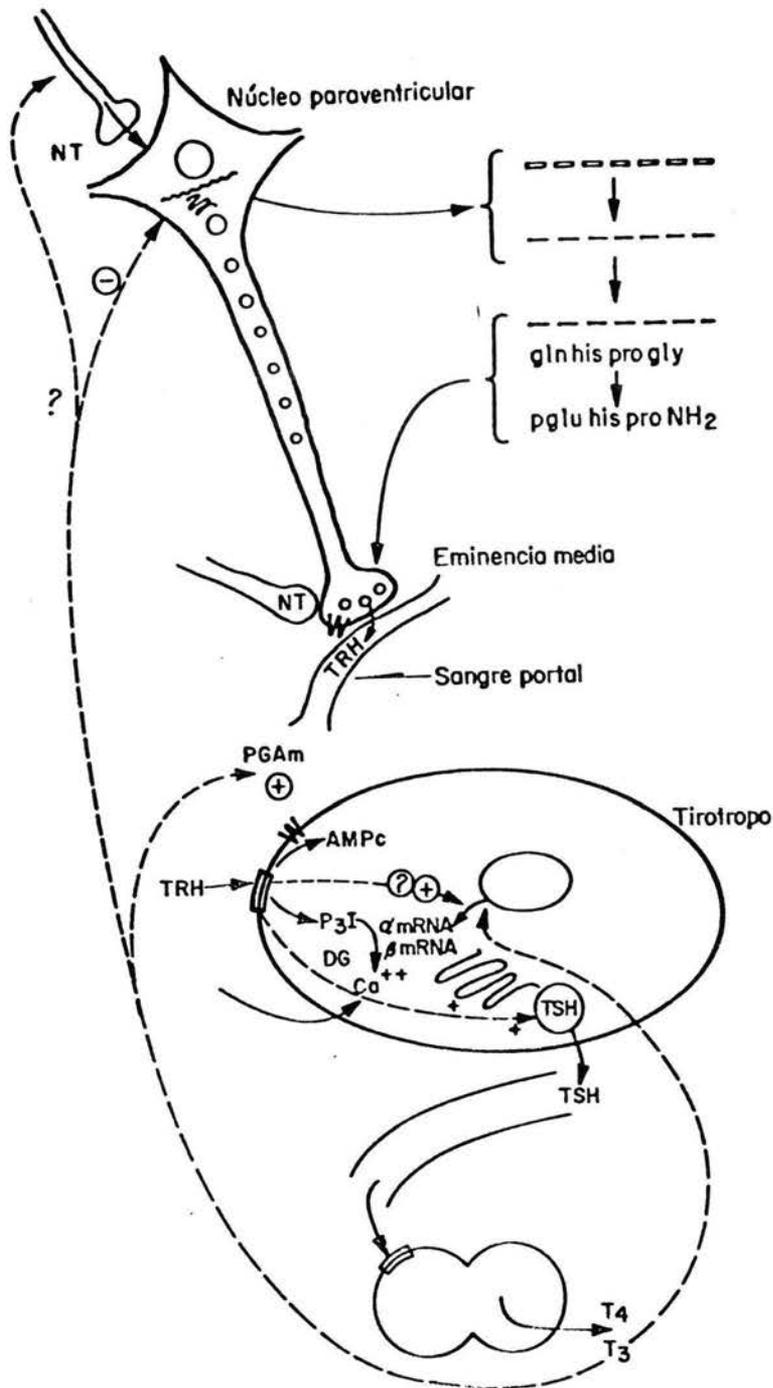


Fig. 1.- Representación esquemática del eje hipotalámico - hipofisiario- tiroideo. PGAm= PGA membranal (PGAII). (Tomado de Covarrubias y col., en prensa).

-Propiedades del TRH-

-Caracterización-

El TRH es un tripéptido con ambos extremos bloqueados, de estructura L-piroglutamil-L-histidil-L-prolin amida (4). El amino terminal la glutamina esta ciclizado para producir piroglutámico, mientras que en el carboxilo terminal posee una amida.

Fue el primer péptido hipotálamico en ser estructuralmente caracterizado y juega un papel central en la regulación de la secreción de tiotropina y prolactina (1,2,3).

-Función hormonal-

El TRH es liberado del hipotálamo a través de la eminencia media al sistema portal hipotalámico-hipofisiario, de donde es transportado hasta la adenohipófisis para interactuar con sus receptores estimulando así la liberación de tiotropina (hormona estimulante de la tiroides:TSH) por los tiròtrops (5), y de prolactina por los lactòtrops (6). El TRH es también capáz de aumentar la biosíntesis del ARN mensajero para prolactina y tiotropina (7). La TSH es secretada a la circulación general y transportada a su órgano blanco, tiroides, para inducir la liberación de triiodotironina (T3) y de tiroxina (T4)(8) hormonas que a su vez afectan diversos procesos metabólicos.

La T3 y T4 regulan la secreción de las hormonas que las controlan, a través de un mecanismo de retroalimentación. El sitio de regulación de las hormonas tiroideas sobre la secreción de TSH, por un lado, es a nivel de la adenohipófisis (9,10) a

través de un mecanismo de retroalimentación negativa: la T3 y la T4 disminuyen el número de receptores de TRH en los tirótrofos (11,12), decrementando de esta manera la secreción de TSH a la circulación en respuesta a TRH. Las hormonas tiroideas también inhiben la liberación basal (13) y la síntesis de TSH (14,15). Otros dos factores hipotalámicos que controlan las secreciones de TSH y prolactina son: la dopamina, que tiene un efecto inhibitorio sobre la liberación de TSH (16) y prolactina (17); y la somatostatina que inhibe la liberación de TSH (18) provocada por TRH en adenohipófisis.

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 tirotrofos: disminuyen el número de receptores sin cambiar la afinidad (122,123) y producen una disminución en la síntesis y secreción de TSH (121,124,).

Por otro lado, T3 y T4 son capaces de penetrar al sistema nervioso central (19): manipulaciones endócrinas como la tiroidectomía producen un aumento en la tirosina hidroxilasa del hipotálamo (20), y por lo tanto de catecolaminas, lo cual sugiere que las hormonas tiroideas pudieran también controlar el eje hipotálamo-hipófisis-tiroideas a nivel hipotalámico, ya que se ha demostrado que las catecolaminas juegan un papel en la liberación de TRH (20). De acuerdo con esta hipótesis, recientemente se ha demostrado que la biosíntesis de TRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo y el contenido de TRH en la eminencia media está bajo control de las hormonas tiroideas, aumentando el nivel de ARN mensajero del péptido en respuesta a una disminución de los niveles de T3 o T4 (21).

Incrementos en la actividad del eje hipotalámico-adenohipofisiario ocurren por ejemplo en animales sometidos a estrés con frío. En éstos, se ha detectado un incremento tanto en los niveles de TRH en sangre periférica como de TSH en la circulación (22): el tratamiento con anticuerpo contra TRH inhibe la liberación de TSH por estrés con frío (23).

También al TRH se la ha propuesto como un modulador del ciclo circadiano de la secreción de TSH, debido a que TSH en sangre (24) y TRH hipotalámico presentan oscilaciones durante el día, exhibiendo el hipotálamo la concentración más alta de TRH al medio día (25).

Finalmente la secreción de prolactina en la rata lactante consta de dos fases: en la primera llamada depleción-transformación, la prolactina sufre cambios estructurales (26), esta fase es inhibida por dopamina (27). La segunda fase es la liberación de la prolactina transformada a la circulación, fase que se sugiere está controlada por TRH (27), ya que éste estimula la liberación de prolactina hipofisiaria de rata lactante tanto in vivo (27), como in vitro (28).

-Distribución regional y subcelular de TRH-

A partir del conocimiento de la estructura del TRH, fue posible desarrollar anticuerpos específicos que han permitido medir los niveles de TRH presentes tanto en núcleos hipotalámicos como en áreas extrahipotalámicas y fluidos biológicos por medio de la técnica de radioinmunoensayo (RIA). Además, la aplicación de la técnica de inmunohistoquímica ha permitido determinar la localización de neuronas

TRH-érgicas en diversas regiones del cerebro. La cuantificación por RIA ha mostrado que la concentración mas elevada de TRH se encuentra en el hipotálamo, pero se presentan también concentraciones apreciables en otras áreas del cerebro, tales como el cerebro anterior, el tallo cerebral y el diencefalo posterior (29). El TRH hipotálamico representa solo el 31% del TRH total medido en el cerebro; la médula espinal y el diencefalo posterior poseen concentraciones intermedias, y el cerebelo solo representa el dos porciento del total en el cerebro (30). En el hipotálamo, la concentración más elevada de TRH se presenta en la eminencia media, seguida de la parte media del núcleo ventromedial (29,20).

La amplia distribución del TRH en el SNC de mamíferos se ha confirmado por estudios de inmunohistoquímica. Se ha demostrado también la presencia de cuerpos neuronales que contienen TRH en el hipotálamo, en los bulbos olfatorios, en la médula oblongada y la médula espinal, asi como en otras regiones (31). En el hipotálamo los somas de las células TRH-érgicas se encuentran en la porción parvocelular del núcleo paraventricular y en los núcleos preóptico, supraquiasmático, dorso-medial y perifórnic, en el hipotálamo lateral y en la región premamilar (36).

La mayor concentración de fibras y terminales TRH-érgicas se encuentra en la eminencia media (33), la mayor parte de estas fibras provienen de la parte parvocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo (37). La red TRH-érgica es también relativamente densa en el hipotálamo y en el òrgano vasculosum de la lamina terminalis (OVLT) del área preóptica, se han descrito axones y terminales TRH-érgicos en otras regiones del SNC y en la neurohipófisis (32,36,35).

Terminales nerviosas conteniendo TRH se encuentra en núcleo accumbens, amígdala, núcleos del tallo cerebral y cordón espinal (39). En la médula espinal existe una vía TRH-érgica que va del núcleo raphe al hasta ventral, vía en la que el TRH coexiste con la sustancia P y serotonina (40,41). Por inmunohistoquímica a nivel de microscopía electrónica y por fraccionamiento subcelular, se ha demostrado que más del 50% del TRH está localizado en vesículas de núcleo denso resistentes a condiciones hipoosmóticas en terminales nerviosas (38).

El TRH también se encuentra distribuido fuera del SNC: tracto gastrointestinal, tracto reproductor, placenta, páncreas, y en piel de anfibios (43).

-Biosíntesis de TRH-

El TRH es sintetizado por vía ribosomal (44) como un precursor de alto peso molecular (50). El uso de las técnicas de ingeniería genética ha permitido obtener la secuencia del precursor de TRH de hipotálamo de rata, en la cual, la secuencia de TRH se encuentra repetida 5 veces, flanqueada por residuos de lisina y arginina, que son los posibles sitios de ruptura del precursor (34). Como en el caso de otros neuropéptidos, se piensa que la biosíntesis de TRH en el SNC de mamíferos ocurre por ruptura post-traducciona l de este precursor y que el procesamiento de la pro-hormona empieza en el soma neuronal (48). Las modificaciones encontradas en las terminales de TRH son originadas posterior a la ruptura de éste a nivel de los pares de aminoácidos básicos: al quedar libre, la

glutamil ciclasa (155 156). Por otro lado, la amidación de la prolina proviene de la acción de una enzima que reconoce la glicina todavía presente en el extremo carboxil-terminal de TRH y la oxida con la siguiente producción de TRH y de ácido glicoxílico (49). Hasta la fecha, se han reportado muy pocos trabajos en los cuales se estudie la biosíntesis de novo de TRH (incorporación de aminoácidos en el péptido), probablemente por el bajo nivel de éste in vivo o in vitro (157).

-Ontogenia-

El patrón ontogenético del TRH ha sido determinado en distintas regiones del cerebro de rata. Desde el periodo en que se detecta TRH, la cantidad de éste va aumentando con el desarrollo de la rata. Por ejemplo, en el hipotálamo el TRH es detectado a los 12 días de edad fetal (51) y el RNA mensajero del TRH se ha encontrado desde el día 14 de gestación (127), y los niveles de TRH por estructura van aumentando hasta el nacimiento y más aún hasta la edad adulta (50,51). Otros autores que han estudiado el patrón ontogénico del TRH expresando sus resultados por miligramo de proteína han descrito la aparición del TRH alrededor de los días antes citados, y posteriormente desarrollar una alza en el contenido del péptido para tener su valor máximo cerca de los 20 días post-natales (128).

Confirmado este patrón ontogenético en hipotálamo y diversas estructuras del cerebro, también se han descrito los patrones del TRH durante el desarrollo en otras áreas extrahipotalámicas. En el páncreas se ha reportado la aparición del péptido en el día 21 posnatal y a partir de esta edad muestra un descenso con respecto al tiempo, para posteriormente no detectarse en la edad adulta (50). En el

bulbo olfatorio se ha demostrado la aparición del TRH a partir de la edad de 10 días post-natales y registrando un aumento en las siguientes edades para desarrollar un pico a la edad de los 20 días y a partir de este punto desciende un poco para posteriormente registrar una nueva alza con el tiempo y así llegar hasta la edad adulta (50,129). Con respecto a otras áreas reportadas se han descrito los patrones ontogenéticos de corteza y adenohipófisis, en las cuales no se detectó el tripéptido durante el desarrollo de la rata (50).

-Liberación de TRH-

El TRH almacenado en las terminales nerviosas del hipotálamo se libera por un mecanismo dependiente de calcio, probablemente por exocitosis, en respuesta a estímulos depolarizantes (130). Estudios en nuestro laboratorio sobre la liberación in vitro de TRH de diferentes áreas del cerebro de rata han demostrado que el péptido se libera significativamente en respuesta a 56mM KCl en presencia de 2.5mM Ca⁺⁺ en las siguientes áreas: área óptica, eminencia media, hipotálamo, núcleo accumbens, mesencéfalo, médula oblongada, amígdala y región cervical de la médula espinal (130). Por otro lado, existe una gran variabilidad en cuanto a la cantidad de TRH liberado en condiciones basales en relación al contenido de péptido en el tejido (de 1% para el hipotálamo hasta 20% para el bulbo olfatorio). Estos y otros datos sugieren que existen por lo menos dos pozas diferentes preliberables de TRH (130). Aunque existe una gran controversia acerca de los efectos producidos por diversos neurotransmisores sobre la liberación de TRH, en general se ha propuesto que la liberación de TRH del hipotálamo medio basal es

controlada por fibras excitatorias (noradrenérgicas e histaminérgicas) y por fibras inhibitorias (encefalinérgicas, dopominérgicas y somatostatinérgicas) (52,53,57). Se piensa que la mayor parte de estas fibras (a excepción de las noradrenérgicas) hacen sinápsis sobre o cerca de las terminales TRH-érgicas de la eminencia media. Las noradrenérgicas sobre o a proximidad de los cuerpos TRH-érgicos localizados en el núcleo paraventricular. El papel de las fibras serotoninérgicas es muy controvertido.

-Receptores a TRH-

En adenohipófisis existen receptores de membrana plásmatica específicos y de alta afinidad para el tripéptido (58,59). En el SNC se ha demostrado la presencia de receptores de alta afinidad (K_d 50 nM) para TRH semejantes a los adenohipofisarios (60): Estos receptores se encuentran concentrados a nivel subcelular en membranas plasmáticas, y a nivel regional tienen una amplia distribución (61): bulbo olfatorio, amígdala, núcleo accumbens, núcleo caudoputamen, corteza, cerebelo, puente y médula oblongada. La ontogenia de la concentración de los receptores a TRH se ha reportado en varias áreas del SNC e hipófisis. En cuanto a los receptores de la hipófisis se detectan desde el primer día posnatal en la rata y su concentración va en aumento hasta el día 20 de edad y a partir de este punto va disminuyendo conforme a la edad, para estabilizarse en la edad adulta. Un patrón muy similar es desarrollado en el hipotálamo (131).

-Efectos del TRH en el SNC-

El TRH tiene una gran diversidad de efectos en el SNC, a nivel neuroquímico, electrofisiológico y de comportamiento.

El TRH estimula el recambio de catecolaminas (62), estimula la síntesis y liberación de dopamina en hipotálamo y núcleo accumbens (63,64), y la liberación de noradrenalina de hipotálamo (63). Potencia la acción excitadora de acetilcolina en ciertas neuronas corticales de cerebro (65), excita motoneuronas espinales del asta ventral de la médula espinal (66,67). En cultivo de neuronas espinales del asta ventral aumenta la síntesis de colin acetil transferasa y creatinina cinasa (68).

A nivel de núcleo accumbens, es capaz de estimular la locomoción a través de la puesta en marcha del sistema dopaminérgico (69). También antagoniza la narcosis inducida por pentobarbital (69), reduce la hipotermia inducida por pentobarbital (70): aumenta la tasa respiratoria (70) y tiene efectos termoreguladores (71).

-TRH como neurotransmisor-

Todo el conjunto de datos antes mencionado sugiere que el TRH pudiera actuar como un neurotransmisor en el SNC. Si tal es el caso deberían existir mecanismos rápidos de inactivación una vez que el TRH es liberado a la sinápsis y ha interactuado con su receptor específico postsináptico.

Uno de los mecanismos posibles de inactivación del TRH en el cerebro es su captura. Existen dos reportes que sugieren que puede haber acumulación de TRH

exógeno en rebanadas de cerebro (73). Este fenómeno es activo y tiene una K_m alrededor de 1 μ m. Sin embargo, la V_{max} del fenómeno es baja y todavía no se han llevado a cabo experimentos que confirmen que tiene un papel importante en la inactivación del TRH liberado.

De acuerdo con los mecanismos conocidos para otros neurotransmisores, se han propuesto dos mecanismos principales de inactivación: uno de ellos es la captura del péptido, sin embargo, estudios hechos en rebanadas de cerebelo (72) y de hipotálamo (73), indican que para TRH este proceso ocurre con una V_{max} muy baja, y su importancia fisiológica no ha sido confirmada.

El otro mecanismo es la inactivación del péptido.

La amplia distribución del TRH, la presencia de receptores de alta afinidad en el cerebro, sus efectos neuroquímicos, electrofisiológicos y sobre el comportamiento y su distribución subcelular, y los mecanismos de su liberación sugiere que tiene un papel importante en la neurotransmisión y/o neuromodulación en el cerebro independientemente de su papel de neurohormona.

ANTECEDENTES

-Mecanismos de inactivación del TRH-

La inactivación del TRH es la etapa del metabolismo del tripéptido que ha sido más estudiada pero, el papel celular de estos procesos no está todavía perfectamente entendido.

Desde hace mucho tiempo se sabe que el TRH es rápidamente degradado cuando se incuba con suero (132), homogeneizados o fracciones subcelulares de cerebro o de otros tejidos (133). Las actividades enzimáticas responsables de tal degradación han sido caracterizadas.

-Degradación en suero-

En suero, Bauer (74) ha descrito una actividad enzimática que degrada al TRH: se trata de una actividad de piroglutamato amino peptidasa (PGA) específica para el TRH a la cual le denominaron tiroliberinasa (74); de 260 000 daltones de peso molecular; pH óptimo entre 6.5-8, con una Km de 50 uM para el TRH. Esta enzima es inhibida por DTT y EDTA sin ser afectada por benzamidina; sugiriendo que la PGA de suero (tiroliberinasa, E.C.3.4.11.8.) no posee características ni de serin proteasa ni de tior proteasa, necesitando de un metal para su expresión (75). La tiroliberinasa degrada al TRH en pGlu + His pro-NH₂ (fig 2). Otros autores han demostrado que esta enzima es la única responsable de la degradación de TRH en suero (99).

suero exhibe cambios cinéticos durante el desarrollo ontogenético (79,80); es decir, que mientras el TRH es rápidamente degradado por suero de rata adulta, es muy estable en suero de ratas recién nacidas. La degradación enzimática de TRH en suero, pudiera contribuir al balance de la secreción de TSH, determinando el número de moléculas de TRH disponibles para los tirotrópos.

En el cerebro de mamíferos se han caracterizado peptidasas presentes en las fracciones solubles y membranal.

-Inactivación por fracción soluble de cerebro-

-Piroglutamato aminopeptidasa I (PGAI)-

Esta enzima ha sido purificada de la fracción soluble de homogenados de tejidos: hipotálamo (82), cerebro (83), hígado (84). La PGAI (E.C.3.4.19.13.) hidroliza al TRH hasta Pglu+ His-ProNH₂ (fig 2); tiene un peso molecular de 28 000 (85); pH óptimo neutro, con una Km de 45 uM para TRH (86); es una tiol proteasa ya que es inhibida por agentes bloqueadores de los grupos tiol y necesita de ditioneitol (DTT) para expresar su actividad (87). La PGAI utiliza como sustratos tanto péptidos naturales (LHRH, gastrina y neurotensina) como péptidos sintéticos: pGlu-Ala, pGlu-His, pGlu-B-naftilimida que presenten ácido piroglutámico en el amino terminal (87). Su distribución regional en cerebro es homogénea (88), mientras que a nivel subcelular está enriquecida en la fracción citosólica y no en el sinaptoplasma (89,90). Esta enzima está ampliamente distribuida en otros órganos (91).

-Prolil endopeptidasa (PE)-

En fracciones solubles de hipotálamo se detectó la presencia de una enzima capaz de degradar TRH hasta TRH ácido (pGlu-His-Pro) (82) (fig 2): la enzima aislada (92) fue identificada como serin proteasa (93). La purificación y propiedades de esta enzima demostraron que se trata de una prolil endopeptidasa (E.C.3.4.21-.26.), o sea una enzima que hidroliza péptidos en la unión peptidilprolil-péptido y peptidil-prolil-aminoácido, excepto la unión prolil-prolina (94). Tiene un peso molecular de 66 000: pH óptimo entre 7-8 (87) y tiene una Km de 2400 uM para el TRH (86).

La distribución regional de la PE es homogénea en cerebro de rata (94): se encuentra en la fracción soluble de homogeneizados (92,95) y a nivel subcelular está enriquecida en el citosol y no en el sinaptoplasma (90).

Existen evidencias de que la PE se encuentra concentrada en células neuronales más que en gliales (96,97). Esta enzima está presente en diversos tejidos (98).

-Papel fisiológico de la PGAI y PE-

Existen evidencias que indican que parte de la actividad de PE se encuentra en células neuronales (96) y glial (96) mientras que la localización celular de la PGA I se ha encontrado en células gliales y aún no se puede concluir que exista esta enzima en neuronas. Actualmente en nuestro laboratorio, se está tratando de definir la localización de ambas enzimas en cultivos primarios de células cerebrales fetales de ratón. La ontogénesis de las enzimas PGAI y PE ha sido determinada en

hipotálamo y corteza de ratón (98). Estas dos enzimas muestran su máxima actividad específica a los 12 días fetales en ambas regiones. Después su actividad decae hasta los 22 días posnatales, momento a partir del cual se mantiene constante hasta la edad adulta.

A pesar de que la PGA I y la PE degradan al TRH in vitro, no existen evidencias para señalar que su papel es inactivar al TRH in vivo, ya que no están concentradas a nivel de las terminaciones nerviosas y que los tratamientos in vivo e in vitro con inhibidores de estas enzimas han revelado resultados contradictorios: en el laboratorio hemos observado que inhibidores específicos de estas enzimas (99) no afectan el contenido ni la liberación de TRH en distintas regiones del cerebro de roedores (100) mientras que otros autores utilizando inhibidores inespecíficos, observaron que la inhibición de las enzimas solubles PGA I y PE aumenta el TRH intracelular, así como los de su liberación basal y estimulada con potasio (101). Como estas enzimas son solubles y como el TRH intraterminal se encuentra en vesículas, es inaccesible para la degradación de estas enzimas (135). Además, no existen evidencias de que estas enzimas sean liberadas al espacio extracelular.

-Enzima membranal: piroglutamato aminopeptidasa II (PGA II)-

El 90% de la actividad degradativa de TRH en cerebro está en la fracción soluble; sin embargo, en membranas sinaptosomales se detectó una actividad

enzimática capaz de degradar al TRH (102). Trabajando con membranas totales de cerebro o sinaptosomas se demostró la existencia de una PGA distinta de la PGA I, que no necesita DTT para su expresión, pero es inhibida con dicha sustancia y también por ácido etilen diamino tetra acético (EDTA) (103,104). Esta PGA II (E.C.3.4.19.) se encuentra enriquecida en membranas sinaptosomales (93,106) más específicamente en la membrana plasmática de los sinaptosomas; estudios hechos con la enzima purificada (106) demuestran que es una metaloproteasa (105), con un PM de 230 000 (105), y un pH óptimo de 7.4 (106). La PGA II muestra una alta especificidad para TRH así como para algunos péptidos sintéticos pGlu-His-Trp, pGlu-His -Pro y pGlu-His-Gly; con los cuales se ha observado que tiene cierta inhibición con las siguientes Ki: 0.170mM, 0.400mM, 1.650mM, respectivamente (136). Péptidos naturales pGlu-X no son degradados por la PGA II (104,106). La Km de la enzima es de 40 uM para el TRH (106). Estudios acerca del sitio activo de la enzima demuestran que los residuos de tirosina, arginina e histidina son necesarios para la expresión de la actividad enzimática, y posiblemente estén localizados en el sitio activo de ésta (107). En nuestro laboratorio se ha demostrado que la actividad de la PGA II es variable en diferentes regiones del cerebro de rata (109), su actividad es relativamente alta en el hipotálamo y en éste, particularmente en la región núcleo arcuato-eminencia media. La PGA II está localizada en la membrana plasmática de sinaptosomas (90,105), en su cara externa por lo cual es una ectoenzima (112).

La PGA II, purificada de cerebro de conejo, muestra las mismas características de la PGA II de cerebro de rata y cuyo (108). La PGA II se encuentra

esencialmente en cerebro, hipófisis y médula espinal (113). La especificidad y la localización de la PGA II sugieren que la enzima pudiera tener un papel fisiológico relevante en la inactivación del TRH una vez liberado.

-Degradación de los metabolitos de TRH-

El His-Pro-NH₂ generado por la acción de la PGA I y/o PGA II puede ciclizarse de manera no enzimática a ciclo(His-Pro) dicetopiperacina (DKP), o ser degradada a His-Pro por una post-prolina dipeptidil aminopeptidasa (PPDA) también llamada dipeptidil aminopeptidasa IV (DAP IV: E.C.3.4.14.5.) (103) que se encuentra enriquecida en membranas sinaptosomales (81,93). A partir de His-Pro-NH₂ se puede también generar His + Pro-NH₂ por acción de una histidil imino peptidasa (HIP) (114). Por otra parte, el TRH-OH puede ser degradado a pGlu + His-pro por la acción de la PGA I. His-Pro puede ser degradado a His + Pro por acción de una prolindipeptidasa (imido-peptidasa) que corta enlaces X-Pro del lado amino de la prolina en dipéptidos (89,115,137). De estas vías metabólicas, se piensa que únicamente la primera puede llevarse a cabo in vivo y tener algún papel fisiológico (112). Además existe la enzima DAP IV la cual se encarga de degradar al His-Pro-NH₂ a DKP, está es una enzima membranal que está orientada hacia fuera de la célula, además de tener una amplia distribución en el SNC (90) puede desarrollar un papel fisiológico muy importante en la degradación del His-Pro-NH₂, que posiblemente este sea el producto de la acción de la PGA II, ya que esta última también es una ectoenzima y esta distribuida ampliamente en el SNC.

-Papel de los metabolitos-

Uno de los productos de la degradación del TRH es el DKP mismo que en muchos modelos experimentales ha mostrado efectos similares o contrarios a los que provoca el TRH. En el eje endócrino, en estudios realizados en monos rhesus, se observó que utilizando dosis fisiológicas, la DKP inhibe la secreción de prolactina (116). También se ha mostrado efecto inhibitorio de la DKP sobre la secreción de prolactina en células GH₃ en cultivo (77). Finalmente, hemos demostrado que la DKP inhibe in vitro la secreción de prolactina de hipófisis extraídas de ratas lactantes (115).

-Regulación de la degradación-

Los mecanismos que regulan los niveles de TRH activo, pueden ser varios: a nivel de síntesis, liberación o degradación. En el caso de la degradación existen evidencias que sugieren el posible papel regulador del entorno hormonal (estado tiroideo) sobre la actividad enzimática. Se ha propuesto que la degradación puede ser un mecanismo regulador ya que se han encontrado cambios en la actividad de la tiroliberinasas que incrementa su actividad en animales hipertiroideos (77,134). Estos datos han sido confirmados por nuestro grupo de trabajo y por Jackson et al. (73,118) quienes encontraron los mismos resultados en la sangre portal. Otros autores utilizando distinta estrategia (138), reportaron que existe inducción de la PGA I en células GH3 en cultivo después de la adición de T3 al medio de

cultivo.

Como se mencionó existen algunas evidencias de que las hormonas tiroideas están involucradas en los mecanismos que pudieran regular los niveles activos de TRH. El control hormonal tanto para el TRH como el descrito para la regulación de las hormonas tiroideas sobre la PGA II (134,139), y la presencia de enzimas específicas son argumentos a favor de que la degradación enzimática de TRH pudiera tener un papel regulatorio.

-Objetivos-

Considerable atención ha sido recientemente dirigida hacia la investigación de los patrones ontogénéticos de sustancias de varias áreas del cerebro: por ejemplo de neuropeptidos hipotalámicos tales como; LHRH, somatostatina, TRH, vasopresina, serotonina, bombesina, substancia P, dopamina, noradrenalina, etc. con el objeto de aclarar y relacionar las funciones fisiológicas de éstas sustancias, así como su síntesis, liberación y degradación, para con esto tener un mejor panorama acerca de su función dentro de la fisiología del SNC.

Por lo cual el objetivo de este trabajo es el siguiente:

-Se evaluará el patrón ontogénético de la piroglutamato amino peptidasa II en diferentes áreas del cerebro y páncreas de la rata, con el fin de determinar si existe correlación de la actividad de la enzima con su sustrato (TRH) durante el desarrollo posnatal de la rata.

-Materiales y métodos-

-Material-

La (L-prolina-2,3,4,5-3H)-TRH (100 ci/mMol) se obtuvo en New England Nuclear Co., Boston, Ma. El TRH en los laboratorios Peninsula, San Carlos, Ca. El resto de los reactivos que se utilizaron a lo largo del trabajo fueron adquiridos en Sigma Chemical Co., St Louis, Mo. o en J.T. Backer, México.

-Animales-

Se utilizaron ratas machos Wistar de 1,3,5,8,19,45 y 65 días de edad, mantenidas en condiciones controladas de luz (12 horas al día) con alimento y agua ad libitum.

-Fraccionamiento subcelular-

Los animales fueron sacrificados por decapitación y se disecaron las regiones a ensayar de acuerdo a Kohin (139) y Groot (140): hipotálamo, adenohipófisis, bulbo olfatorio, corteza posterior cerebral y páncreas. Una vez disecados, los tejidos fueron almacenados a -70 °C hasta el momento del ensayo de PGA II. Los tejidos fueron homogenizados al 10% (p/v) en solución amortiguadora de fosfato de sodio 50 mM pH 7.5 en un homogenizador Potter-Elvehjem, o en un sonicador Soniprep 150 en las mismas condiciones. Todo el fraccionamiento se realizó a 4°C y las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrifuga Beckman J2-21 con un rotor

JA-20 y en una microfuga 12, Beckman. El homogeneizado de los tejidos se centrifugò a 1000 x g durante 15 minutos, el sobrenadante obtenido se utilizò a 4 °C, mientras la pastilla obtenida se rehomogeneizò en la mitad del volùmen inicial y se centrifugò de nuevo en las mismas condiciones. Los sobrenadantes resultantes de ambas centrifugaciones se juntaròn, (esta fracciòn contiene los constituyentes celulares solubles, organelos y membranas; en la pastilla se quedan los núcleos) y se centrifugaròn a 12 000 x g durante 15 minutos, para precipitar la fracciòn membranal y la fracciòn soluble se recuperó para medir la actividad de PGA I. La pastilla obtenida se resuspendió en el buffer de ensayo (fracciòn membranal) (fig 3).

-Desarrollo específico del ensayo de PGA II y PGA I-

El método radiométrico utilizado a lo largo del trabajo permitió determinar específicamente la actividad de la PGA II, ya que al emplearse la bacitracina y la N-etilmaleimida la actividad de PGA I, PE (142) así como la postprolin dipeptidil aminopeptidasa (109,143) y la Histidil prolin amida imidopeptidasa (144) son inhibidas. Así, los resultados obtenidos son el reflejo de la degradación efectuada por la PGA II y no una expresión de las enzimas PGA I y PE que pudieran contaminar la fracción membranal. También la bacitracina inhibe la actividad de la DAP IV, con lo cual las cantidades del metabolito His-Pro-NH₂ producidos durante este ensayo provienen de la acción directa de la PGA II. De esta manera se aseguró que únicamente se estaba evaluando la actividad degradativa de la enzima membranal y no la suma de las diferentes actividades (PGA I, PE, PGA II).

-Ensayo enzimático (determinación de la PGA II y PGA I)-

-Método colorimétrico-

Para la evaluación de la actividad de la enzima soluble, se utilizó la fracción soluble como fuente de PGA I (resultante del fraccionamiento celular de páncreas de ratas de las edades de 19, 45, y 65 días post-natal) a la cual se le agregó DTT y EDTA (concentración final 2mM de cada uno). Después de 10 min de preincubación a 37°C se le agregó 10 ul del sustrato piro-Glu-⁸-Naftilamida (0.4mM concentración final), y se incubó durante 60 min a 37°C. Al mismo tiempo, se desarrolló el ensayo para la PGA II, en el cual se utilizó como fuente de enzima la fracción membranal (obtenida del mismo fraccionamiento celular para el ensayo de PGAI), a la cual se le agregaron los inhibidores N-benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal (Z-pro-prolinal) y Pyroglutamyl diazomethyl Ketone (PDMK) los cuales son inhibidores específicos de PE y PGA I respectivamente. (157) (en una concentración final de 10^{-4} M y 10 ul de la enzima DAP IV equivalente a 0.8 unidades/ml (1 unidad = 500 ul de 2 naftilamina/mg proteína/h del sustrato Gly-Pro-2-naftilamina). Esta solución se preincubó durante 10 min. a 37 °C, inmediatamente después se le agregó 10 ul del sustrato piro-Glu-His-Pro-β-naftilamida 0.4 mM, para incubarse durante 60 min a 37°C.

Los dos tipos de reacción fueron terminados al añadir 250 ul de ácido tricloroacético (TCA) al 10%; posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. a 4°C en una centrifuga Beckman TJ-6. Inmediatamente después se lleva a cabo la diazotización del sobrenadante obtenido del cual se tomaron 250ul a los

cuales se les añadió 0.5ml de NaNO_2 0.1%. Después de transcurrir 3 min. se añadió 0.5ml de sulfato de amonio 0.5% y se dejó reposar durante 2 min. para posteriormente agregarse 1ml de N-J-Naftil-Etilendiamina (N-NEDA) al 0.05% se dejó desarrollar la incubación por 30 min. a 37°C . Para finalmente leerse a 580 nm en un espectrofotómetro Espectronic-710. Para la obtención de las actividades específicas de ambas enzimas, primero se hizo una curva estándar de β -Naftilamida y las muestras después de leerse se compararon con los valores de absorbancia obtenidos a partir de la curva obteniéndose los valores de las concentraciones finales en nanomolas. Además se hicieron cinéticas durante una hora para determinar la actividad enzimática por unidad de tiempo y finalmente la determinación de proteína por el método de Lowry (141), esto para obtener la actividad específica de las enzimas expresada en nMolas/min/mg de proteína (109).

-Ensayo enzimático (determinación de la PGA II)-

-Método radiométrico-

De la fracción membranal (la cual fue resuspendida en el menor volumen posible) se tomaron dos alícuotas:

a) -Una alícuota se hidrolizó con hidróxido de sodio 1N durante 12 horas a temperatura ambiente y se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry (141).

b)-A la otra alícuota se le agrega un volùmen igual de buffer conteniendo dos inhibidores uno que inhibe a las enzimas PE y DAP IV y otro que inhibe tìol proteasas tales como la PGA I (bacitracina y N-etilmaieimida respectivamente) 2.5 mM concentraciòn final. Para cuantificar específicamente la actividad de la PGA II, 25 microlitros de esta soluciòn fueron preincubados (por duplicado) durante cinco minutos a 37°C en un baño de incubaciòn. Posteriormente la reacciòn se iniciò al agregar 6 microlitros del sustrato (100 000 cpm $^3\text{H-TRH}$; 1 μM concentraciòn final). Se tomaron alícuotas de cinco microlitros a diferentes tiempos de incubaciòn (dependiendo de la regiòn en cuestiòn), para estar dentro de las condiciones de linealidad.

Las muestras se aplicaron en papel cromatogràfico Watman P81 (previamente lavado con agua desionizada que hirbiò por 10 minutos) parando de esta forma la reacciòn. Las cromatografias se corrieron en un sistema ascendente en àcido acético 1M dejando correr el solvente 15 cm de la linea de aplicaciòn a la linea del frente. En este sistema de anàlisis la His-Pro-NH₂ no se cicliza a DKP y queda en el origen, mientras que el TRH migra hacia el cm 4. De esta forma sòlo el primer cm se recorta y se coloca en un vial para realizar el conteo por centelleo líquido, se extrae la radioactividad con un ml de hidróxido de amonio 2M en agitaciòn durante 15 minutos, posteriormente se agregan 10 ml de soluciòn Bray y se cuantifica la radioactividad en un contador de centelleo líquido Beckman L S 7800. Sabiendo que la cantidad de $^3\text{H-Pro-TRH}$ (100 000 cpm) usada en los ensayos equivale a 31 picomolas, se utilizò una relaciòn directa (regla de tres) para calcular las picomolas del metabolito producido ($(^3\text{H-Pro})\text{-His-Pro-NH}_2$). Al obtener la cantidad en

picomolas por minuto se analizan los resultados de la proteína, para evaluar la actividad específica de la enzima.

Los resultados fuerò analizados por el estadístico de t de Students comparando la actividad específica de la enzima entre cada una de las edades.

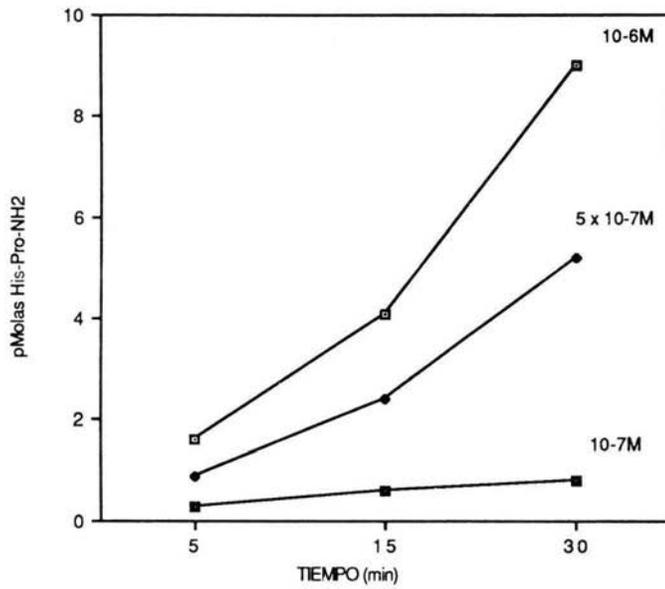


Figura 3(A). Actividad de PGA II de membranas totales de cerebro, a diferentes concentraciones de sustrato.

Resultados

-Establecimiento de las condiciones cinéticas para medir la actividad de PGA II y PGA I-

Para la realización de los experimentos primero se hicieron ensayos piloto, es decir, antes de analizar las muestras de cada uno de los grupos (Conjuntos de órganos o áreas disecadas de todas las edades) se efectuaron experimentos con ratas adultas del área u órgano en cuestión, esto con el fin de determinar las bases de experimentación, así como para establecer las condiciones en cuanto a volumen de resuspensión de la pastilla, la designación de los tiempos para las cinéticas (determinación de velocidad inicial y valores de proteína óptimos en los ensayos) para posteriormente analizar las muestras de la ontogenia.

En la figura dos se muestra una relación lineal entre la concentración de proteína en el ensayo contra actividad de la fracción soluble incubada con buffer tris-DTT (2mM)-EDTA (1mM) (A), y de la fracción membranal incubada con buffer tris (B). Estos datos demuestran que trabajamos dentro del rango lineal de concentración de proteínas.

Para la evaluación de los patrones ontogenéticos de la actividad de la PGA II, cada experimento constaba de una misma área, pero con sus diferentes edades. Esto con el propósito de obtener en un mismo experimento todo un patrón ontogenético de las áreas estudiadas, para que con esto los resultados obtenidos sean mas

representativos ya que fueròn obtenidos en las mismas condiciones de experimentaciòn.

-Patrones ontogeneticos de degradaci3n de TRH por PGA II-

-Ontogenia de PGA II en hip3t3lamo-

Para la evaluaci3n enzimatica de esta zona cerebral fue necesario reunir varios tejidos para las primeras edades (1,3,5 y 8 dias), esto con el fin de poder obtener la cantidad de tejido necesaria para medir adecuadamente la actividad especifica de la enzima (.03g aproximadamente) se utilizaron dos tejidos, por cada una de las edades mencionadas y con s3lo uno para las edades posteriores. El patr3n ontog3netico obtenido para el hip3t3lamo se observa en la figura 4. En la edad de un d3a ya hay actividad, (9.33 pmolas. de His-Pro-NH₂/min./mg. prot.) es alta en comparaci3n con la observada en lo otros patrones de las 3reas estudiadas. Dicho valor de actividad especifica se mantiene constante en la edad siguiente (3 dias), para encontrar su valor m3ximo a los 8 dias, con una actividad especifica de 17 pmolas. de His-Pro-NH₂/min/mg prot. La actividad espc3fica registrada en las edades siguientes va decreciendo y en la edad 22 se ve que baja hasta un valor de 10.37 y para las edades de 46 y 66 dias llega a los valores m3s bajos de 4.5 y 6 respectivamente (fig 4).

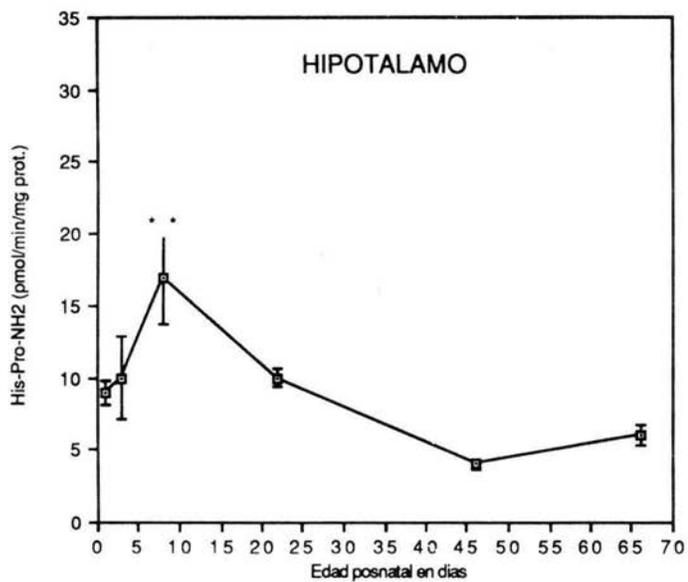


Figura 4. Ontogenia de la actividad de PGA II en hipotálamo de rata.
Cada punto representa el promedio de 4 experimentos con su error estandar.
**P < 0.01

-Ontogenia de PGA II en adenohipòfisis-

Para la determinación de la actividad degradativa en adenohipòfisis fue necesario reunir varios tejidos hipofisarios en todas las edades a ensayar; primero por ser ésta, una zona muy pequeña y además por tener una baja actividad específica de PGA II. Por lo tanto se hicieron grupos de adenohipòfisis para cada edad hasta reunir un cierto peso en el cual se presentaran las condiciones para tener una medición adecuada de la enzima, dicho peso va de .02-.03 gramos. Para la edad de 1 día se juntaron al rededor de 13 tejidos, para las edades de 5 y 8 días alrededor de 10 y 8 respectivamente, y para las edades de 22,46 y 66 días se reunieron alrededor de 5.

Al igual que en las otras áreas ensayadas primero se hizo un ensayo piloto, para designar la cantidad en peso necesario para obtener las condiciones antes mencionadas, para posteriormente evaluar el patrón de actividad de la PGA II en adenohipòfisis (fig 3). En la edad de un día no se presentó actividad enzimática, la cual tuvo su aparición a la edad de 3 días con un valor de 0.08 pmolas de His-Pro-NH₂/min/mg. prot. Para posteriormente ir aumentando con respecto a la edad hasta encontrar su valor máximo a la edad de 45 días con una actividad específica de 0.68 pmolas. de His-Pro-NH₂. A partir de este valor se registró una bajada en la actividad específica de la enzima presentando a los 66 días un valor de 0.47 pmolas. de His-Pro-NH₂ y a la edad de 139 días con 0.30 pmolas. de His-Pro-NH₂ (fig 3).

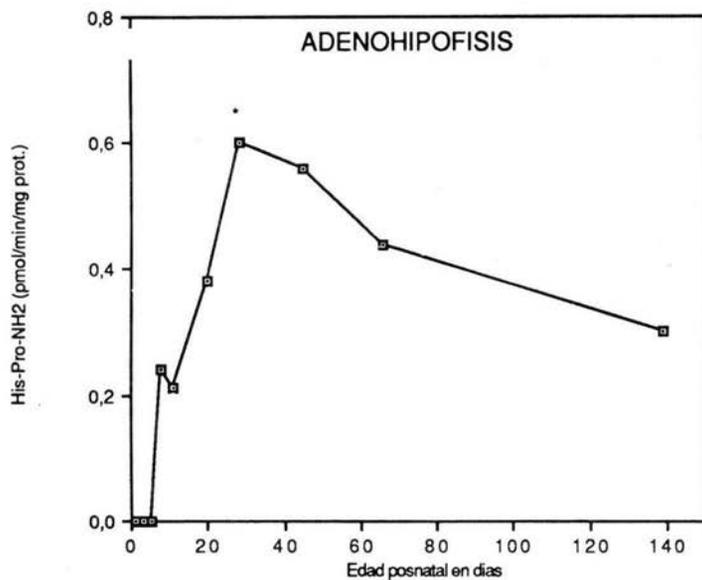


Figura 3. Patrón ontogénico de la actividad de PGA II en adenohipófisis de rata. Cada punto consta del promedio de 6 diferentes experimentos. *P < 0.05

-Ontogenia de PGA II en bulbo olfatorio-

En esta zona el patrón ontogenético observado en la figura 6, no muestra un pico único durante el desarrollo, como se observa en las áreas del hipotálamo y corteza posterior. El patrón desarrollado en esta área muestra dos picos.

La actividad enzimática se encontro en todas las edades ensayadas. En la edad de un día tiene un valor de 4; posteriormente se registra un aumento para la edad de tres días hasta 8.3 pmolas de His-Pro-NH₂/min/mg prot. Una baja de dicha actividad se ve a los cinco días manteniéndose este resultado hasta los 8 días con los valores de 5.2 y 5.5 respectivamente.

La actividad específica alcanzó su máximo valor a los 22 días (12.3 pmolas de His-Pro-NH₂/min/mg prot.) y bajo posteriormente obteniéndose los valores de 7 y 6.8 pmolas. de His-Pro-NH₂/min/mg prot. para las edades de 30 y 46 días respectivamente. Por último registrò una pequeña alza en la edad de 66 días con una actividad específica de 8.5 pmolas de His-Pro-NH₂.(fig 6).

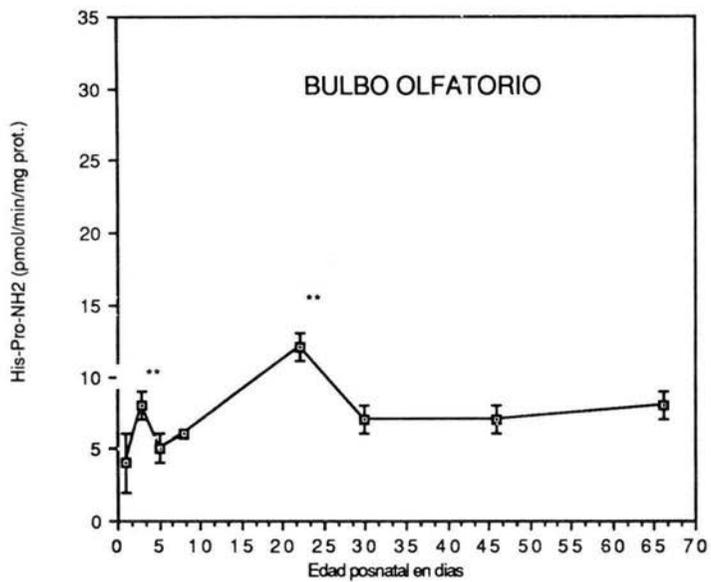


Figura 6. Patrón ontogenético de la actividad de PGA II en bulbo olfatorio de rata. Cada punto representa el promedio de 4 experimentos con su error estándar. **P < 0.01

-Ontogenia de PGA II en corteza posterior-

En la determinación de la actividad de la PGA II en esta área, basto con sólo un tejido por edad para observar la actividad degradativa. En la corteza posterior se observó un patrón ontogenético de actividad específica mayor a la encontrada en las distintas áreas estudiadas (fig 5). En esta figura se muestra que a partir de la edad de un día la actividad enzimática obtuvo un valor de 5.7 pmolas de His-Pro-NH₂/min/mg prot. En las siguientes edades la actividad aumento hasta alcanzar su valor máximo a la edad de 8 días con un valor de 25.8 pmolas de His-ProNH₂/min/mg prot. A partir de este punto, comenzó a decrecer. A partir del día 22 se mantuvieron más o menos constantes los valores para finalmente estabilizarse alrededor de 10 pmolas. de His-Pro-NH₂/min/mg prot. para la última edad ensayada (66 días; adulto).

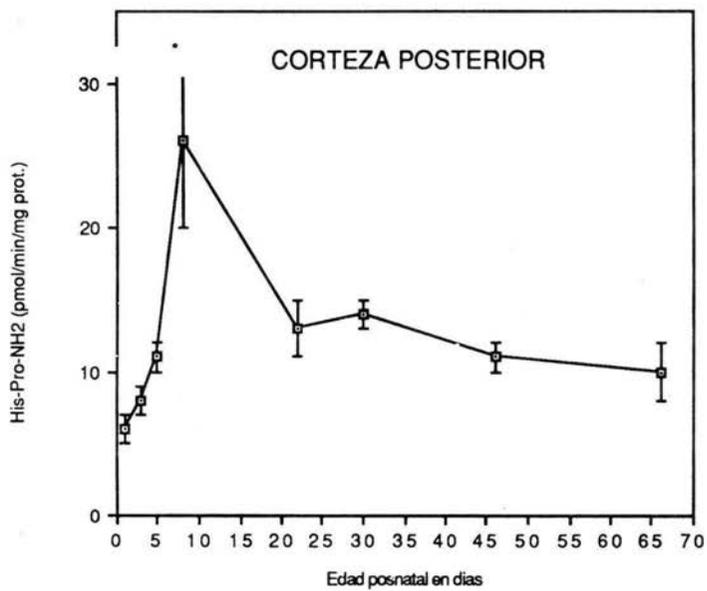


Figura 5. Ontogenia de la actividad de PGA II en corteza posterior de rata.
 Cada punto representa el promedio de 4 experimentos con su error estandar.
 * $P < 0.05$

-Ontogenia de PGA II en páncreas-

Los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la actividad de la PGA II en membranas de páncreas se observan en la tabla 1. En ésta se puede ver que la actividad degradativa de PGA II en membranas de páncreas fue nula, es decir no se detectó actividad alguna en ninguna de las edades ensayadas en este órgano. Además de estos resultados se analizó la actividad de la enzima por medio de un método colorimétrico (como se describe en materiales y métodos). Además de evaluar la actividad degradativa de la PGA II se obtuvieron los resultados de la enzima soluble PGA I con este mismo método. Esto con el fin de asegurarnos que la sensibilidad del método fuera adecuado. Los resultados obtenidos en cuanto a la actividad de la PGA II fueron nuevamente de cero en las tres edades ensayadas para este experimento, que fueron de 19, 45 y 65 días (tabla 1).

En cuanto a la PGA I los valores obtenidos se reportan en la tabla 1. Con esto se ratificó que los valores de PGA II en membranas de páncreas de la rata fueron nulos ya que el resultado obtenido para la PGA II en este ensayo concuerda con el obtenido en el método radiométrico.

También se analizó la actividad de PGA II en fracción soluble; esto para asegurarnos de que la enzima no tuviera una localización subcelular diferente a la encontrada en SNC. En dicha fracción la actividad estuvo ausente así que la degradación de TRH en páncreas no es efectuada por la PGA II durante el desarrollo.

-Discusión-

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 (como son los neurotransmisores clásicos), para los neuropéptidos también deben existir mecanismos altamente eficientes de eliminación, porque a concentraciones inapropiadas, dichas sustancias 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 con alta frecuencia, estos mecanismos tienen que ser no sólo altamente eficientes, sino también muy rápidos.

La importancia de un mecanismo rápido de inactivación para los neuropéptidos una vez liberados al espacio sináptico, se basa por un lado, en la disponibilidad de los receptores para poder registrar la llegada de un nuevo mensaje: y por otro lado, en la eliminación de los péptidos remanentes en el espacio extra celular. Conocer el mecanismo fisiológico que regula los niveles extracelulares de estos péptidos, nos permitirá una comprensión mayor sobre el funcionamiento de las neuronas peptidérgicas, así como aplicar estos conocimientos a problemas reales.

Los mecanismos por los cuales la acción de los neuropéptidos activos es terminada en las sinápsis peptidérgicas no han sido aclarados, pero existen evidencias de que la degradación enzimática pudiera estar involucrada en la

inactivación de algunos de ellos (87,88). Aunque un neuropéptido puede ser degradado por diversas enzimas, lo importante es definir cual de estas juega un papel fisiológico importante en la inactivación, es decir, saber cual se encuentra en el espacio sináptico, y saber si la degradación puede actuar como un elemento regulador de las funciones del neuropéptido.

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 datos mencionados en la introducción sugieren que la PGA II y la tiroliberinasasa son los responsables de controlar el TRH en estos compartimentos.

Se conoce la existencia de peptidasas capaces de actuar directamente contra el TRH en suero (tiroliberinasasa), fracción soluble (PGA I y PE) y en la fracción membranal (PGA II) de cerebro de rata (ver antecedentes).

La PGA I y la PE no se encuentran enriquecidas en terminales nerviosas (65), estas dos enzimas se encuentran concentradas en el cuerpo celular de neuronas; por lo tanto para que estas enzimas tengan relevancia fisiológica en la inactivación del TRH una vez liberado al espacio sináptico, debe existir ya sea la presencia de dichas enzimas en el espacio sináptico, o bien estas deben actuar posterior a un proceso de captura. No se ha demostrado la existencia de estas enzimas en el

espacio sináptico; por otro lado el TRH es capturado con una Vmax muy baja, y no se sabe que esto con lleva ha hacer accesible a el TRH a estas enzimas, además se ha demostrado que inhibidores específicos para ambas enzimas inyectados in vivo no modifican los niveles de TRH detectados (89) ni afecta la liberación in vitro de este péptido (135) otros estudios de inhibición específica de la PGA II han demostrado un incremento en los niveles recuperables de TRH en rebanadas de hipotálamo tanto en condiciones basales así como estimuladas (142). Además las dos enzimas solubles no son tejido específico (90) y no son específicas para un péptido (60,71).

Se han realizado investigaciones a cerca del TRH en una gran cantidad de tejidos de rata, y en algunos de ellos, estudios ontogenéticos, todo esto con el fin de tratar de determinar el papel fisiológico de este péptido que pueda estar desarrollando en todos y cada uno de estos tejidos. Dentro del SNC su papel como neurohormona es ya bien conocido, también se le ha postulado como neurotransmisor y/o neuromodulador en esta zona donde su papel está más caracterizado en comparación al tejido extra-SNC. En cuanto a su función en el tejido extra-SNC, aún no está bien conocido a pesar de que ya ha sido detectado en algunos tejidos (ver antecedentes) de entre los cuales uno de ellos es el páncreas en el cual se ha encontrado una gran cantidad del tripéptido (50). El TRH aparece en el páncreas en el día 17 prenatal registrando en esta edad su valor máximo y con el tiempo va decreciendo hasta no detectarse en la edad adulta de la rata (50). El ARNm de TRH se detectó en páncreas a partir del día 19 prenatal; tiene su pico máximo alrededor del nacimiento, para posteriormente tener una

bajada y no expresarse en la edad adulta, con lo cual se prueba que existe síntesis del péptido en este órgano (143). El patrón desarrollado por el mensajero de TRH es paralelo al patrón de TRH (143). Además se ha demostrado la presencia de DKP (metabolito que en SNC es derivado de TRH por la acción de piroglutamato aminopeptidasas) en el páncreas (143,50,152). Se han hecho estudios del patrón ontogenético de TRH y DKP en los cuales se observó una marcada diferencia de ambos patrones. Los autores concluyeron que el TRH no era la única fuente de DKP en el páncreas.

Además también se ha reportado un trabajo en el cual se incubaron células pancreáticas con inhibidores específicos de PGA I y PE. No se encontraron cambios en el contenido tanto de DKP, TRH-OH y de TRH inmunorreactivo (153). El conjunto de estos resultados nos lleva a sugerir que tal vez el DKP registrado por estos autores era el resultado de la acción de la PGA II. Los resultados obtenidos demuestran que no existe actividad alguna de dicha enzima en preparaciones de membranas, lo cual indica que la PGA II tampoco es la encargada de degradar al TRH en este tejido.

Estos datos permiten hacer dos conclusiones:

- 1) La presencia de TRH no es sinónimo de presencia de PGA II. Esto puede deberse, bien a que el TRH producido en el páncreas no tiene como blanco a este tejido pero, pudiera tenerlo en otro (hígado por ejemplo), o bien a que la comunicación TRH intrapancreática no necesita de un mecanismo rápido de inactivación (como ocurre en los tirotrópos que no presentan actividad de PGA II).

2) El DKP en páncreas no viene del TRH, pudiera provenir de internalización de DKP circulante.

En cerebro de rata se ha reportado la distribución regional de la actividad de la PGA II (109). El Hipotálamo fue una de las áreas que mostró mayor actividad. Es una de las zonas más importantes en cuanto a síntesis, liberación y degradación de TRH por su papel ya muy conocido en la fisiología del eje hipalámico-adenohipofisiario, por lo cual ha sido objeto de innumerables estudios dicha relación.

Existen un gran número de reportes a cerca de la ontogenia del TRH en el hipotálamo de varias especies y especialmente en la rata se han enfocado la mayoría de estos trabajos. Entre los primeros reportes se encuentran los de Delbert et al. (147) quienes detectaron TRH desde el día de nacimiento. Su valor va aumentando con la edad y encuentra su pico máximo al rededor de los 24 días de edad para posteriormente empezar a decrecer hasta el día 40 y de ahí subir levemente y estabilizarse. Un patrón semejante también es descrito por Pekari et al. (128).

Estos patrones de desarrollo del TRH no guardan relación con los resultados obtenidos de la PGA II en el hipotálamo, ya que como se ve en la figura 4 el valor máximo de la actividad específica de la enzima se expresa a la edad de ocho días posnatal y el pico de TRH se presenta al rededor de los 28 días de edad posnatal. Esto tal vez se debe a que el nivel de TRH en sinapsis no refleja la actividad funcional por el balance entre la síntesis, liberación y degradación: es posible que la funcionalidad sea máxima antes de que los niveles del péptido lleguen a sus valores mas altos. Por otra parte en el hipotálamo hay varios sistemas TRH-érgicos,

con desarrollos ontogenéticos diferentes (127) y/o grados de asociación con PGA II distintos.

Blanchard et.al. (131) reportaron el patrón ontogenético de receptores a TRH en varias zonas del SNC, de entre las cuales destaca el hipotálamo. Los receptores son detectados desde el primer día de nacimiento; y su concentración va aumentando con respecto a la edad, para alcanzar su valor máximo al rededor del día 20 posnatal. A partir de este punto su concentración decreta hasta llegar a la edad de 40 días y de ahí en adelante se mantiene estable.

Por otra parte el desarrollo ontogenético de la actividad de la PGA II en el hipotálamo mantiene una correlación con el desarrollo de neurogénesis y sinaptogénesis en esta área. Es posible que la PGA II este directamente involucrada en el desarrollo de la neurogénesis y sinaptogénesis, por la correlación que guardan sus picos, mientras que en los patrones de desarrollo de TRH y sus receptores presentan su pico máximo mas tarde esto tal vez se deba por razones regulatorias.

La actividad de PGA II observada durante los primeros días del desarrollo en adenohipófisis, concuerda con el patrón de la degradación de TRH en suero (150). Sin embargo la actividad en suero aumenta conforme a la edad para mantenerse estable en la edad adulta, lo cual no sucede en la adenohipófisis ya que esta presenta un pico máximo de actividad en el día 45 para posteriormente bajar y establecerse (figura 3). El que presenten su aparición al rededor de la misma etapa del desarrollo podría sugerir una íntima relación en cuanto al origen de las enzimas encargadas de la degradación del TRH de la adenohipófisis (PGA II) y el suero

	edad en días	ensayo radiométrico	ensayo fluorométrico
PGA II	1	0	0
	3	0	0
	8	0	0
	19	0	0
	45	0	0
	65	0	0
PGA I	19	ND	0.65
	45	ND	1.67
	65	ND	0.26

Tabla 1-Ontogenia de la actividad específica de PGA II en fracción membranal y de PGA I en fracción soluble de páncreas de rata. Para la evaluación de la actividad de la PGA II en el páncreas se utilizaron dos métodos: uno radiométrico y uno fluorométrico para descartar la posibilidad de baja sensibilidad del método radiométrico. Los valores para la PGA I se expresan en nanomolas de β -naftilamina/min/mg. prot.

ND=no determinado.

(Tiroliberinasa). Es decir que la tiroliberinasa tal vez esta siendo liberada por la adenohipòfisis. Sin embargo tambièn existe la posibilidad de que como ocurre con otras enzimas sèricas, la PGA II provenga del hígado ya que en este organo es una de las pocas zonas extra-SNC donde se ha detectado una actividad considerable de la enzima (158).

En adenohipòfisis, solo se detectó TRH en la edad posnatal de 7 días para despues no observarse mas en ninguna otra edad (50), lo cual es comprensible ya que la adenohipòfisis es el òrgano blanco mas importante del TRH y no asi un destacado productor del pèptido. Por otra parte se ha reportado el patròn ontogenètico de los receptores a TRH en pituitaria (131). La uniòn del pèptido al receptor se detecta en la rata recién nacida; a partir de ahi dicha uniòn va aumentando con la edad, encontrando su valor màximo a la edad de 20 días, para posteriormente registrar una bajada en las edades siguientes hasta llegar a la de los 40 días edad en la cual presenta el valor mas bajo y a partir de aqui mantenerse estable hasta llegar a la edad adulta (131). Este patròn presenta una similitud con el de PGA II en adenohipòfisis (figura 7), lo cual indica un desarrollo paralelo de la uniòn del TRH a su receptor y la degradaciòn del mismo. Se destaca la posibilidad de que la enzima controle los niveles de TRH a lo largo del desarrollo de esta zona.

En cuanto a lo referente a la ontogenia de los niveles de TSH en suero estos se presentan a partir del día 5 posnatal desarrollando un pico a los 15 días para despues presentar una bajada en sus niveles a los 20 días post-natales y a partir de ahi registrar un nuevo incremento a los 30 días para posteriormente mantenerse

estable en un mismo rango hasta la edad adulta. Así existe una similitud hasta el día 15 entre el establecimiento de un marcador funcional de las neuronas TRH-érgicas (la TSH) y la PGA II.

Estos resultados concuerdan y amplían lo postulado anteriormente de la relación ontogenética de TRH-receptor-estimulo-secreción de TSH. Por otra parte se ha demostrado que existe una regulación de la PGA II adenohipofisaria por hormonas tiroideas (134,151). El patrón ontogenético de T4 es muy similar pero adelantado al de la PGA II desarrollando su pico máximo al rededor del día 15 para presentar posteriormente un leve descenso en los días 20 y 30 y a partir de este punto se mantiene estable hasta la edad adulta. Esto concuerda con la idea de que T3 y T4 serían responsables (cuando menos en parte) de regular la actividad de la PGA II en la adenohipofisis. Con estas observaciones y las anteriormente señaladas se postula fuertemente a la PGA II como la enzima encargada de controlar los niveles de TRH en la adenohipofisis durante el desarrollo de la rata, además de existir una estrecha correlación entre el desarrollo de la PGA II y la actividad de las neuronas TRH-érgicas hipofisiotrópicas. así como un posible papel en la regulación del eje hipotálamo-hipofisis-tiroides a lo largo de la vida de la rata.

Hasta el momento se ha reportado poco a cerca del TRH en el bulbo olfatorio durante el desarrollo de la rata. Algunos autores como Tsuruo et al. (153), Lamberton et al.(50), Gayo et al. (129) han descrito patrones ontogenéticos de TRH en esta área. Los datos obtenidos por Gayo et al.(129) concuerdan parcialmente con los resultados descritos en la figura 6. En el bulbo olfatorio, el péptido aparece a la edad de 10 días posnatales y aumento en las siguientes edades hasta llegar a

su valor máximo al día 20. A partir de este día se observa una disminución en la concentración del TRH, para posteriormente en el día 30 de edad posnatal registrar una nueva alza en los valores de las siguientes edades hasta llegar a la edad adulta. Los datos obtenidos en la evaluación de la ontogenia de la PGA II en el bulbo olfatorio muestra una coincidencia temporal con el patrón ontogenético del TRH en esta área. En el desarrollo de la actividad específica de la PGA II se observae un incremento de la en las primeras edades y desarrollando un pico en al rededor de la edad de 22 días, dicho pico también se presenta en el patrón desarrollado por el TRH, el cual lo tiene a los 20 días, y a partir de este pico la actividad de la enzima se ve disminuida en la edad de 30 días y posteriormente se mantiene estable en las edades siguientes. Mientras que el patrón de TRH presenta una tendencia a subir a partir de la edad de 30 días.

Por otra parte Lamberton et al. (50) reporto el contenido de DKP en el bulbo olfatorio durante el desarrollo. Se observa una coincidencia muy marcada con el patrón observado para PGA II: un primer pico al rededor de las primeras edades (entre 1-5 días) es desarrollado tanto por el DKP como por la PGA II, posteriormente ambos patrones presentan una subida en las siguientes edades para presentar sus valores máximos a los 20 días para el DKP y 22 días para la PGA II; a partir de estos valores ambos patrones tienden a bajar en las edades posteriores. Por la coincidencia temporal de marcadores de actividad TRH-érgica y PGA II, la correlación entre DKP y la actividad local de la enzima. Nos hace pensar; que la PGA II es la enzima encargada de degradar al TRH en el bulbo olfatorio durante el desarrollo, y aunque aún no se ha esclarecido el papel específico que juega el TRH

en la fisiología de esta zona del SNC. sobresale la idea que este actuando como un neurotransmisor y/o neuromodulador encargado de alguna función en los eventos de maduración en el bulbo olfatorio ya que la aparición tanto del TRH como la de su degradación coincide con el rápido crecimiento de axones, la asociación dendrítica, el activo proceso de mielinización y un alto grado de sinaptogénesis que se da entre la primera y segunda semana de la vida posnatal de la rata (147).

En la corteza posterior no se ha detectado TRH o las cantidades estimadas son muy bajas oscilando en el límite de sensibilidad de los métodos utilizados para su detección (109). Por otro lado estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que la liberación del TRH por la corteza de rata no es detectable (130). Lamberton et al. (50) reportan la ausencia total del péptido en corteza de rata durante todo el desarrollo. Todos estos resultados nos indican que no existe ninguna correlación con la actividad enzimática de la PGA II encontrada en esta zona durante el desarrollo porque mientras el TRH está ausente o en muy bajas cantidades la actividad de la PGA II es muy alta y aparece desde el primer día de la vida posnatal de la rata. Además la aparición de la actividad de la PGA II coincide con el pico de sinaptogénesis y con marcadores sinaptosomales en esta región. Este fenómeno es tal vez debido a que la corteza posterior sea un posible órgano blanco del TRH el cual se este sintetizando y liberando en otra parte del SNC y tenga su efecto en la corteza con lo cual sea necesario de un sistema de regulación en el órgano blanco y este puede ser la degradación efectuada por la PGA II que además este controlando dicho fenómeno durante el desarrollo posnatal de la rata.

CONCLUSION

En el SNC la PGA II presenta un patrón ontogenético similar al que presenta la sinaptogénesis. Correlacionando unicamente con el desarrollo de marcadores TRH-érgicos en el bulbo olfatorio. En hipotálamo y corteza posterior, es probable que existan factores adicionales que desacoplen el desarrollo de la actividad específica de la PGA II a la del TRH y sus receptores.

En la adenohipófisis existe una estrecha correlación con actividades neuronales TRH-érgicas del núcleo paraventricular del hipotálamo.

La función intrapancreática del TRH, que se especula pueda tener una función parácrina en este órgano o su producción con el objetivo de que ejerza su función en un órgano blanco distinto del páncreas, son independientes de la acción degradativa de la PGA II.

Bibliografia

- 1-Scally,A.V.Bowers,C.Y.,Redding,T.W. & Barrett,J.F. *Endocrinology*. 78, 726-732. (1966).
- 2-Scally,A.V.Redding,T.W.,Bowers,C.Y.& Barret,J.F. *J. Biol. Chem.* 2614, 4077-4083 (1969).
- 3-Hofèlt,T.,Fuxe,K.,Johansson,O.,Jeffcoate,S.L.& White.N., *Neurosci. Lett.* 1, 133-139 (1975).
- 4-Boler,J.,Enzman,F.& Folkers,K.*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 705 (1969).
- 5-Fink,G.Koch,Y.& Ben Aroya,N.*Raven Press.* 127-143 (1983).
- 6-Tashjian,A.H.Jr,Barowsky,N.J.& Jansen,D.K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43,516-523 (1971).
- 7-Potter,E.,Nicoliasen,A.K.,Ong,E.S.,Evans,R.M. & Rsofenfeld,M.G. *Prcc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 6662-6666. (1981).
- 8-Bomunt,J.E. & Lamy,F.*Raven Press.* 153-157. (1980).
- 9-BlackwellR.E. & Guillemin R. *Ann. Rev. Physiol.* 35,357-390. (1973).
- 10-Guillemin,R.,Yamazaki,E.,Gard,A.,Yutisz,M. & Sakis,E. *Endocrinology.* 73, 564-572. (1963).
- 11-Hinkle,P.M.,Parrone,M.H. & Schonbrunn,A. *Endocrinology.* 108, 199-205. (1981).
- 12-Martin,J.B.,Boshans,R. & Reichlin,S. *Endocrinology.* 87, 1032-1037. (1970).
- 13-Padbanabhan,V.,Kesner,J.S. & Convery,E.M. *Endocrinology.* 108, 226-231. (1981).

- 14-Shupnik,M.A.,Chin,W.W.,Habener,J.F. & Ridgway,E.C. J. Biol. Chem. 260, 2900-2903. (1985).
- 15-Cryole,M.L. & Maurer,R.A. DNA. 3, 231-235. (1984).
- 16-Scanlon,M.F. Cli. Endocrinol. 10, 7-13. (1979).
- 17-Grosvenor,C.E. & Mena,F. Endocrinology. 107, 863-868. (1980).
- 18-Ridgway,E.C.,Klibansky,A.,Martorana,M.A.,Milbury, P.,Kieffer,J.D. & Chin,W.W. Endocrinology. 112, 1937-1942. (1983).
- 19-Taurog,A.,Harris,G.W.,Tong,W. & Chaidoff,I.L. Endocrinology, 59, 34-39. (1956).
- 20-Kizer,J.S.,Palkovitz,M.,Tappaz,M.,Kebabian,J. & Brownstein,N.J. Endocrinology. 98, 585-595. (1976).
- 21-Segerson,T.P.,Kauer,J.,Wolfe,H.C.,Mobtaker,H.,Wu,P.,Jackson,I.M.D. & Lechan,R.M. Science. 238, 78-80. (1987).
- 22-Montoya,E.,Seibel,M.J. & Wilber,J.F. Endocrinology. 96, 1413-1418. (1975).
- 23-Mueller,G.P.,FrancoF.S.,Reichlin,S. & Jackson,I.M.D. Clin. Res. 25, 298 A. (1977).
- 24-Jordan,D.,Perrin,F. & Mornex,R. Neuroendocrinol. 36, 17-20. (1983).
- 25-Collu,R., Du Ruissaeu,P.,Tache,Y. & Ducham,J.P. Endocrinology. 1011, 1391-1397. (1977).
- 26-Grosvenor,C.E.,Mena,F. & Whitworth,N.S.. Endocrinology. 104, 372-376. (1979).
- 27-De Greef,W.J. & Visser,T.J. J. Endocrinology. 91, 213-223. (1981).
- 28-Grosvenor,C.E. & Mena,F. J. Anim. Sci. 52, suppl. 1, 115-136. (1981).
- 29-Brownstein,M.J.,Palkovits,M.,Saavedra,J.M.,Bassiri,R.M. & Utiger,R.D. Science. 185, 267-269. (1974).

- 30-Winokur,A. & Utiger,R. Science. 185, 265-266. (1974).
- 31-Hokfelt,T.,Elde,R.,Fuxe,K.,Johansson,O.,Ljungdahl, A.,Goldstein.M.,Luft,R.,Efendic,S.,Nilsson,G.,Terenius,L., Gauten,D. et al. Raven. Press. 69-135. (1978).
- 32-Lechan,R.M. & Jackson,I.M.D. Endocrinology. 111, 55-65. (1982).
- 33-Johansson,O.,Hokfelt,T.,Jeffcoate,S.L.,White,N. & Spindel,E. Raven. Press. 19-31. (1983).
- 34-Lechan,R.M.,Wu,P. & Jackson,I.M.D. Endocrinology.111, 55-65. (1986).
- 35-Harkness,D.M. & Brownfield,M.S. Society for Neuroscience, 15 Annual Meeting, 394. (1985).
- 36-Palkovits,M. Vol. 3, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1-69. (1984).
- 37-Brownsteind,M.J.,Easky,R.L. 7 Palkovits,M. Neuropeptides. 27, 197-201. (1982).
- 38-Barnea,A.,Ben Jonathan,N. & Porter,J.C. J. Neurochem. 27, 477-484. (1976).
- 39-Hokfet,T. & Elde, Ann. Rev. Physiol. (1979).
- 40-Winokur,A.,Davis,R. & Utiger,R.D. Brain Res. 120, 423-427. (1977).
- 41-Johansson,O.,Hokfelt,T.,Pernow,B.,Jefcoate,S.L.,Whitw,N., Steinbusch,H.,Ver Hofstad,A.J.,Emson,P.C. & Spindel,E. Neurosci. 6, 1857-1862. (1981).
- 42-Ver Hofstad,A.A.J,Emson.P.C. & Spindel,E. Neuroscience. 6, 1857-1860. (1981).
- 43-Jackson,I.M.D. & Reichlin,S. Endocrinology. 95, 854-862. (1974).
- 44-Mckelvy,J.F. Plenum. Press. 77-98. (1977).
- 45-Rupnow,J.H.,Hinkle,P.M. & Dixon,J.E. Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 721-728. (1979).

- 46-Méndez,M.,Joseph-Bravo,P.,Cisneros,M.,Vargas,M.A. & Charli,J.L. *Peptides*. (1987).
- 47-Joseph-Bravo,P.,Charli,J.L.,Palacios,J.M. & Kordon,C. *Endocrinology*. 104, 801-806. (1979).
- 48-White,J.D.,Stewart,K.L., Krause,J.E. & Mckelvy,J.F. *Physiological Reviews*. 65, 553-606. (1985).
- 49-Bradbury,A.F.,Finnie,M.D.A. & Smith,D.G. *Nature*. 298, 686-687. (1982).
- 50-Lamberton,R.P.,Lechan,R.M. & Jackson,I.M.D. *Endocrinology*. 115, 2400-2405. (1984).
- 51-Nemerovski,a.,P.,Grouselle,D.,Favre-bauman,A. & Tixer-vidal,A. *Neuros. Let.* 53, 279-284. (1985).
- 52-Joseph-Bravo,P.,Charli,J.L.,Palacios,J.M. & Kordon,C. *Endocrinology*. 104, 801-806. (1979).
- 53-Charli.J.L.,Joseph-Bravo,P.,Palacios,J.M. & Kordon,C. *Eur. J. Pharmacol.* 52, 401-403. (1978).
- 54-Warberg,J.,Eskay,R.L.Barnea,A.,Reynolds,R.C. & Porter,J.C. *Endocrinology*. 100, 814-825. (1977).
- 55-Hirooka,Y.,Hollander,C.S.,Suzuki,S. Ferdinand,P. & Juan,S.I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 4509-4514. (1978).
- 56-Tapia-Arancibia,L.,Arancibia,S. & Astier,H. *Neuroci. Let.* 45, 47-52. (1984).
- 57-Annunziato,L.,DiRenzo,G.,Lombardi,G.,Scopocasa,F.,Schenttini, G.,Preziosi,P. & Scapagnini,U. *Endocrinology*. 100, 738-744. (1977).

- 58-Labrie,B.,Barden,N.,Portier,G. & De lean,A. Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 283-287. (1972).
- 59-Tan,K.N. & Tashjian,,A.M. J. Biol. Chem. 256, 8994-9002. (1981).
- 60-Burt,D.R. & Snyder,S.N. Brain Res. 93, 309-329. (1975).
- 61-Burt,D.R. & Taylor,R.L. Endocrinology. 106, 1416-1423. (1980).
- 62-Sarp,T.,Bennett,G.Y. & Marsden,C.A. J. Neurochem. 39, 1763-1766. (1982).
- 63-Bennet,G.W.,Sharp,T.,Brazell,M. & Marsden,C.A. Raven. Press. 253-259. (1983).
- 64-Miyamoto,M.,Nurumi,S.,Nagai,Y.,Shina,T. & Nagawa,T. Jap. J. Pharmacol. 29, 335-339. (1979).
- 65-Yarbrough,G.G. Nature. 263, 523-524. (1976).
- 66-Yarbrough,G.G. Life Science. 33, 11-118. (1983).
- 67-Ono,H. & Fukuda,H. Neuropharmacology. 21, 739-744. (19820).
- 68-Schmidt-Acher,K.M.,Ascansas,V. & Engel,W.K. J. Neurochem. 43,586-589. (1984).
- 69-Rastogi,R.B. Raven Press. 123- 149. (1981).
- 70-Sharp,T.,Tullochi,F.,Bennett,G.W.,Marsden,C.A.,Metcalf,G. & Dettmar,P.W. Neuropharmacol. 23, 339-349. (1984).
- 71-Yehuda,S. & Kastin,A.J. Neurosci. Biobehav. Rev. 4, 459-471. (1980).
- 72-Pacheco,M.F.,Woudward,D.J.,Mackelvy,J.f. & Griffin,W.A. Peptides. 2, 283-284. (1981).
- 73-Charli,J.L.,Ponce,G.,Mckelvy,J.F. & Joseph-Bravo P. Neurochem. 42, 981-986. (1984).
- 74-Bauer,K.,Nowak,P. & Kleinkauf,H. Eur. J. Biochem. 118, 173-174. (1981).

- 75-Bauer,K. & Nowak,P. Eur. J. Biochem. 99, 239-246. (1979).
- 76-Friedman,T.C. & Wilk,S. Biochem. Biophys. Res. Commun. 132, 787-793. (1985).
- 77-Bauer,K. Nature. 259, 591-593. (1976).
- 78-White,N.,Jeffcotae,S.L.,Griffiths,E.C. & Hopper,K.C. J. Endocrinol. 71, 13-19. (1976).
- 79-Neary,J.T.,Kieffer,J.D.,Federico,P.,Mover,H.,Maloof,F. & Soodak,M. Science 193, 403-405,. (1976).
- 80-Oliver,C.,Parker,C.R. & Porter,J.C. J. Endocrinol. 74, 339-340. (1977).
- 81-O'connor,B. & O'cuinn,G. Eur. J. Biochem. 154, 329-335. (1986).
- 82-Prasd,C. & Peterkofky,A. J. Biol. Chem. 251, 3229-3234. (1976).
- 83-Bauer,K.,Graf,K.J.,Favre-Bauman,A.Beier,S., Tixier-Vidal, A. & Kleinkauf,H. Nature. 274, 174-175. (1978).
- 84-Armentrout,R.W. Biochim. Biophys. Acta. 191, 756-759. (1969).
- 85-Bauer,K.,Kleinkauf,H. & Flohe,L. Walter de Gruyter, 437-477. (1981).
- 86-Busby,W.H.Jr.,Youngblood,W.W. & Kizer,J.S. Brain Res. 242,267-270. (1982).
- 87-Bauer,K. Raven Press. 103-107. (1983).
- 88-Prasad,C.Mori,M.,WilberJ.F.Pierson,W.,Pegues,J. & Jayarama,A. Peptides. 3, 591-598. (1982).
- 89-Brown,P. & O'cuinn,G. Eur. J. Biochem. 137, 75-87. (1983).
- 90-Torres,H.,Charli,J.L.,Gonzalez-noriaga,A.,Vargas,M.A. & Joseph-Bravo,P. Neurochem. Int. 9, 103-110. (1986).
- 91-Szeuzuk,A. & Kwiatowaska,J. Eur. J. Biochem. 15, 92-96. (1970).
- 92-Rupnow,J.H.,Taylor,W.L. & Dixon,J.E. Biochem. 18, 1206-1211. (1979).

- 93-Yoshimoto,T.,Orlowsky,R.C. & Walter,R. *Biochem.* 16, 2492-2448. (1977).
- 94-Orlowsky,M,Wilk,E,Pearce,S. & Wilk,S. *J. Neurochem.* 33. 461-469. (1979).
- 95-Kreider,S.,Winokur.A. & Krieger,N.R. *neuropeptides.* 1, 455-463. (1981).
- 95-Koshiya,K.,Kato,T.,Tanaka,R. & Kato,t. *Brain Res.* 324, 261-270. (1984).
- 96-Koshiya,K.Okada,M.,Imai,K.,Kato,T.,Tanaka,R.,Hatanaka,H. & Kato,T. *Neurochem. Int.* 7, 125-130. (1985).
- 97-Hersh,L.B. & Mckelvy,J.F. *Brain Res.* 168, 553-564. (1979).
- 98-Faivre-Bauman,A.,Knisatschek,H.,Tixier-vidal,A & Bauer,K. *J. Neuros. Res.* 6, 63-74. (1981).
- 99-Friedman,T.C. & Wilk,S. *J. Neurochem.* 46, 1231-1239. (1986).
- 100-Charli,J.L.,Mendez,M.,Joshep-Bravo,P. & Wilk,S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1987).
- 101-Faivre-Bauman,K.,Loudes,C.,Charli,J.L. & Kordon,C. *Neuropeptides.* 7, 125-137. (1986).
- 102-Joseph-Bravo,P.,Loudes,C.,Charli,J.L. & Kordon,C. *Brain Res.* 166, 321-329. (1979).
- 103-Greaney,A.Phelan,J. & O'cuinn,G. *Biochem. Soc. Trans.* 8, 423-427. (1980).
- 104-Grat,B.,Miranda,J.,Charli,J.L. & Joseph-Bravo,P. *Neuropeptides.* 6, 27-40. (1985).
- 105-O'connor,B. & O'cuinn,G. *Eur. J. Biochem* 144, 271-278. (1984).
- 106-O'connorB. & O'cuinn,G. *Eur. J. Biochem.* 150, 47-52. (1985).
- 107-O'connor,B. & O'cinn,G. *J. Neurochem.* 48, 676-680. (1987).
- 108-Wilk,S.,Friedman,T.C. & Wilk,E.K. *FASEB Abstract Form* (1986).

- 109-Vargas,M.A.,Méndez,M.,Cisneros,M.,Joseph-Bravo,P. & Charli,J.L. *Neurosci. Let.* (1987).
- 110-Charli,J.L.,Bàez,A.,Vargas,M.A.,Cruz,C. & Joseph-Bravo,P. *J. Neuropeptides.* (1987).
- 111-Wilk,S.,Friedman,T.C. & Kline,T.B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130, 662-668. (1985).
- 112-Matsui,T.,Prasad,C. & Peterkofky,A. *J. Biol. Chem.* 254, 2439-2445. (1979).
- 113-Bauer,K. & Kleinkauf,H. *Eur. J. Biochem.* 106, 107-117. (1980).
- 114-Brabont,G.,Wickings,E.J. & Nieschlong,E. *Acta Endoc.* 98, 189-194. (1981).
- 115-Charli,J.L.,Garat,B.,Martinez-Escalera,G.,Ponce,G.,Miranda,J. & Joseph-Bravo,P. *Academic. Press.* 239-248. (1984).
- 116-Jackson,I.M.D.,Papapetrou,P.D. & Reichlin,S. *Endocrinology.* 104 1292-1298. (1979).
- 117-Matsuo,H.,Baba,Y. & Nair,R.M.G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 1334-1339. (1971).
- 118-Vale,W.,Spiess,J.,Rivier,C. & Rivier,J. *Science.* 213, 1394-1397. (1981).
- 119-Bolhen,P.,Esch,F.,Brazeau,P.,Ling,N. & Guillemin,R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116, 726-734. (1983).
- 120-Brazeau,P.,Vale,W.,Burgus,R.,Ling,N.,Butcher,M.,Rivier,J. & Guillemin,R. *Science.* 179, 77-78. (1973).
- 121-Martin,J.B.,Boshans,R. & Reichlin,S. *Endocrinology.* 87, 1032-1037. (1970).
- 122-Hinkle,P.M. & Goh,K.B.C. *Endocrinology.* 110, 1725-1731. (1982).
- 123-Mori,M.,Yamada,M. & Kobayashi,S. *Neuroendocrinology.* 48,153-159. (1988).

- 124-Padmanabhan,V.,Kesner,J., & Convey,E.M. *Endocrinology*. 108, 226-231. (1981)
- 127-Burgunder,J.M. & Taylor,T. *Neuroendocrinology*. 49, 631-640. (1989).
- 128-Pekary,P. *Neurobiol. Aging*. 5, 221-225. (1984).
- 129-Gayo,B.,Bonet,A.S.,Iglesias,R.,Toro,M.J. & Montoya,E. *Acta Endocrinologica*. 112, 7-11. (1986).
- 130-Mèndez,M.,Joseph-Bravo,P.,Cisneros,M.,Vargas,M.A. & Charli,J.L. *Peptides*. 8, 291-298. (1987).
- 131-Blanchard,L. & Barden,N. *Developmental Brain Res*. 24, 85-88. (1986).
- 132-Bassiri,R.M. & Utiger,R.D. *Endocrinology*. 91, 657-664. (1972).
- 133-Bauer,K. & Lipman,F. *Endocrinology*. 99, 230-245. (1976).
- 134-Ponce,G.,Charli,J.L.,Pasten,J.A.,Aceves,C. & Joseph-Bravo,P. *Neuroendocrinology*. 48, 211-213. (1988).
- 135-Mèndez,M.,Cruz,C.,Wilk,S. Joseph-Bravo,P. & Charli,J.L. *Neuropeptides*. 1990 (en prensa).
- 136-Elmore,M.A.,Griffiths,E.C.,O'connor,B. & O'cuinn,G. *Neuropeptides*. 15, 31-36. (1990).
- 137-Brown,P. & O'cuinn,G. *J. Biol. Chem*. 258, 6147-6151. (1983).
- 138-Chen-Shian,S. & Wilk,S. *Endocrinology*. (1987).
- 139-Konig,J.F.R. & Klippel,R.A. *The Rat Brain*. 1-52. (1967).
- 140-Groot,de J., *The Ratforebrain: Coordinetes*. N.V Noord-Hollandsche Uitgevers Maatschappij; Amsterdam. (1969).
- 141-Lowry,O.,Rosebrough,N.J.,Farr,L. & Randail,R.J. *J. Biol. Chem*. 193, 265-269. (1951).

- 142-Charli,J.L.,Méndez,M.,Vargas,M.A.,Cisneros,M.,Assai,M., Joseph-Bravo,P. & Wilk,S. *Neuropeptides*. 14, 191-196. (1989).
- 143-Garat,B.,Miranda,J.,Charli,J.L. & Joseph-Bravo,P. *Neuropeptides*. 6, 27-40. (1985).
- 144-Yoshimoto,T.,Nishimura,T.Kita,T & Tsuru,D. *J. Biochem*. 94, 1179-1190. (1983).
- 145-Dotour,A.,Giraud,P.,Kowalski,C.,Ouafik,L.H.,Salers,P., Strbak,V. & Oliver,C. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 146, 354-360. (1987).
- 146-Prasad,C., Jarayaman,A.,Robertson,J.S. & Rao,J.K. *Neurochem. Res*. 12, 767-774. (1987).
- 147-Fisher,D.A.Dussault,J.H.,Sack,J. & Chopra,I.J. pp 59-116. (1978).
- 148-Jeffcoate,S.L.,Linton,E.A.,Lira,O. & White,N. Raven Press. pp 145-155. (1983).
- 149-Nemerovski,A.,Grouselle,D.,Faivre-Bauman,A. & Tixier-Vidal,A. *Neurosci. Let*. 53, 279-284. (1985).
- 150-Neary,J.T.,Kieffer,J.D.,Nakamura,C.,Mover,H.,Soodak,M. & Maloof,F. *Endocrinology*. 103, 1849-1854. (1978).
- 151-Bauer,K. *Nature*. 330, 375-377. (1987).
- 152-Mori,M.,Pegues,J.,Prasad,C.,Wilber,J.F.,Peterson,J. & Githens,S. *Biophys. Res. Commun*. 115, 281-286. (1983).
- 153-Salers,P.,Ouafik,L.H.,Giraud,P.,Dutour,A.,Maltese,J.Y. & Oliver,C. *Annals of the New York Academy of Science*. 553, 567-569. (1989).
- 154-Tsuruo,Y.,Hokfelt,T. & Visser,T. *Brain Res*. 68, 213-217. (1987).
- 157-Charli,J.L.,Méndez,M.,Joseph-Bravo,P. & Wilk,S. *Neuropeptides*. 9, 373-378. (1987).

158-Scharfmann,R.,Morgat,J.L. & Aratan-Spire,S. Neuroendocrinology. 49, 442-

4

4

8

(1989).