

03081
2
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

ESTUDIO SOBRE EL METABOLISMO DE LA NEURONA TRRERGICA

Tesis que para obtener el grado de

DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

Presenta el M. en C.

CARLOS SABAS CRUZ FUENTES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuernavaca, Mor., Agosto 1991.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Abreviaturas	1
Resumen	3
Abstract	4
<u>Introducción</u>	5
Propiedades de los neuropéptidos	
Aspectos evolutivos de los péptidos en el Sistema Nervioso	
Funciones de los péptidos en el sistema Nervioso	
CAPITULO I HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA	9
Distribución filogenética	
Distribución en el Sistema Nervioso	
Papel hipofisiotrófico	
Efectos	
Receptores	
<u>Bioquímica celular de las neuronas TRHérgicas</u>	17
Biosíntesis de TRH	
Liberación de TRH	
Inactivación de TRH	
<u>Mecanismos de inactivación de los neuropéptidos</u>	25
Difusión	
Internalización	
Captura	
Degradación	
Degradación enzimática de TRH	27
<u>PGAI</u>	
<u>PE</u>	
<u>PGAII</u>	

Antecedentes

Importancia de los sistemas de cultivo en el estudio del metabolismo de las neuronas peptidérgicas.
Expresión de funciones neuronales en cultivo.
Estudios sobre el metabolismo de las neuronas TRHérgicas en cultivo.
Justificación del uso de cultivos en el estudio de los mecanismos de degradación de TRH.

Métodos

38

Protocolo del cultivo**Cruzas****Obtención de tejido****Disociación celular****Siembra****Preparación de platos de cultivo****Ensayos bioquímicos**

42

Captura de GABA ³H**Determinación de GAD****Determinación de conversión de Glu a GABA****Inmunocitoquímica****Análisis de aminoácidos libres****Extracción de TRH y RIA****Determinación de DNA****Resultados**

45

Caracterización morfológica de los cultivos primarios**Cultivos hipotalámicos****Cultivos de corteza frontal****Identificación celular**

46

Caracterización funcional del sistema de cultivo de células nerviosas.

49

Contenido de aminoácidos libres en cultivo.**Captura del ácido gama amino butírico (GABA-³H) en cultivos de corteza cerebral.****Efecto del citosín arabinósido**

58

Efecto del medio condicionado homólogo

64

Conclusión

75

OBJETIVOS Y METAS		76
CAPITULO III	ESTUDIOS SOBRE LA ORIENTACION MEMBRANAL Y LOCALIZACION CELULAR DE LA PGA II	77
Estrategias experimentales.		77
RESULTADOS		79
DISCUSION		83
CONCLUSION		86
Anexo 1 (Publicaciones 1 y 2)		94
APENDICE	PARTICIPACION DE LAS ENZIMAS SOLUBLES PGAI Y PE EN LA REGULACION DEL CONTENIDO INTRACELULAR DEL TRH.	95
Resultados		96
Discusión		97
Conclusion		100
Anexo 2 (Publicación 3)		105
REFERENCIAS		106

Tabla 1

Localización de RNAm proTRH, -proTRH y cuerpos celulares TRHérgicos en el Sistema Nervioso Central de la rata.

Tabla 2

Distribución de PGA II en diferentes regiones del cerebro y la hipófisis de la rata.

Tabla 3

Rendimiento y viabilidad de células nerviosa en cultivo

Tabla 4

Proteína membranal presente en los cultivos hipotalámicos

Tabla 5

Células positivas a la enolasa específica de neuronas (células NSE+) presentes en cultivos hipotalámicos de 12 DIV.

Tabla 6

Criterios para definir a una ectoenzima

Tabla 7

Péptidos hidrolizados por endopeptidasa 24.11 (encefalinas) y por la enzima convertidora de angiotensina (ACE) in vitro.

Tabla 8

Criterios establecidos para la identificación de peptidasas relevantes en la inactivación extracelular de neuropéptidos.

Tabla 9

Enzimas del cerebro que poseen la capacidad para introducir un corte primario o secundario en la estructura del TRH.

Tabla 10

Efecto in vitro de PDMK y ZPP sobre la actividad de PE y PGAI en bulbo olfatorio, hipotálamo y corteza cerebral de la rata.

ABREVIATURAS

ACE	= enzima convertidora de angiotensina
AchE	= acetilcolinesterasa
ACHC	= ácido cicloaminohexano carboxílico
ACTH	= corticotropina
AMPc	= 3',5' adenosin monofosfato
AOAA	= ácido aminooxiacético
AraC	= citosín arabinósido
BDNF	= factor neurotrófico derivado del cerebro
bFGF	= factor de crecimiento básico derivado de fibroblastos
BNA	= β naftilamida
CCK	= colecistocinina
cDNA	= ácido deoxiribonucleico complementario
CFS	= líquido cerebro espinal
CGRP	= péptido relacionado al gene de calcitonina
ChAT	= colin acetil transferasa
CNF	= factor neurotrófico ciliar
CPHNA	= N-1-carboxi-feniletil(N im-benzil)-histidil β naftilamida
DA	= dopamina
DABA	= ácido diaminobutírico
DFP	= diisopropilfluorofosfato
DG	= diacilglicerol
DIV	= días <u>in vitro</u>
DKP	= His-Pro dicetopiperazina
DMEM	= medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco
DTT	= ditiotreitól
EDTA	= ácido etilen diaminotetraacético
FBS	= suero fetal bovino
GABA	= ácido gama aminobutírico
GAD	= descarboxilasa del ácido glutámico
GFAP	= proteína glial ácida fibrilar
GH	= hormona de crecimiento
GS	= glutamino sintetasa
HA	= histamina
IP ₃	= inositol trifosfato
5-HT	= 5-hidroxitriptamina o serotonina
KRB	= Krebs-Ringer-Bicarbonato
Leu enk	= leucin encefalina
LH	= hormona luteinizante
LHRH	= hormona liberadora de la hormona luteinizante
LSC	= cromatografía de centelleo líquido
MBH	= hipotálamo mediobasal
Met enk	= metionin encefalina
α MSH	= hormona estimulante de melanotropina

ABREVIATURAS

NA	= noradrenalina
NEM	= N-etilmaleimida
NEP	= endopeptidasa neutral 24.11
NGF	= factor de crecimiento neuronal
NPY	= neuropéptido Y
NSE	= enolasa específica neuronal
NT	= neurotransmisor
PAM	= peptidil glicín monoaminooxigenasa α -amidante
PBS	= amortiguador de fosfatos-salino
PDMK	= piroglutamil diazo metilcetona
PE	= prolil endopeptidasa
PGAI	= piroglutamato aminopeptidasa I
PGAI	= piroglutamil aminopeptidasa II
PI	= fosfatidil inositol
PKC	= proteín cinasa C
POMC	= proopiomelanocortina
PVN	= núcleo paraventricular del hipotálamo
PRL	= prolactina
RIA	= radioinmunoensayo
RNA _m	= mensajero del ácido ribonucleico
SNC	= Sistema Nervioso Central
SNP	= Sistema Nervioso Periférico
SP	= sustancia P
SRIF	= somatostatina
T ₃	= triyodotironina
T ₄	= tiroxina
TH	= tirosina hidroxilasa
TRH	= hormona liberadora de tirotropina
TSH	= tirotropina
VIP	= péptido vasoactivo intestinal
ZPP	= N-benziloxycarbonil-prolil-prolinal

RESUMEN

Una serie de evidencias experimentales bioquímicas y fisiológicas sugieren la posible participación de la enzima membranal piroglutamato aminopeptidasa II (PGAII) en los mecanismos de inactivación de la señal biológica del TRH en el Sistema Nervioso. Existen sin embargo, aspectos celulares aun no definidos, que son necesarios para poder establecer su relevancia fisiológica.

En el presente trabajo se describen las investigaciones realizadas en cultivos primarios de células nerviosas en torno a la localización celular y orientación topológica de la piroglutamato aminopeptidasa II.

Se detectó actividad de la PGAII tanto en las células intactas, como en fracciones membranales obtenidas de cultivos hipotalámicos y de corteza cerebral del ratón. Por el contrario en cultivos gliales puros no fue posible detectar actividad de la enzima.

La permeabilización de la membrana plasmática en las células intactas por efecto del detergente saponina no modificó la actividad de la enzima, en tanto que la solubilización de las proteínas membranales por efecto del pretratamiento de las células con tripsina produjo una disminución significativa de la actividad específica presente. Efectos similares de la saponina y la tripsina se observaron en la preparación de terminales nerviosas aisladas intactas obtenidas del cerebro de la rata.

En los cultivos hipotalámicos la actividad específica de la PGAII se incrementó al inhibir la proliferación de células no neuronales como resultado de la inclusión del antimitótico citosín arabinósido. En tanto la destrucción selectiva de la población neuronal en los cultivos corticales por efecto del glutamato se vio acompañada por una reducción concomitante de la actividad de peptidasa.

Estos resultados indican que la PGAII posee su sitio activo orientado hacia el lado externo de la membrana plasmática de las células neuronales, características celulares que apoyan fuertemente la participación de la enzima en el catabolismo extracelular del TRH in vivo.

Adicionalmente evaluamos la posible participación de las enzimas solubles PGAI y prolil endopeptidasa en la regulación de los niveles intracelulares del TRH en el cerebro. Los resultados obtenidos en diversos sistemas experimentales tanto in vivo como in vitro utilizando inhibidores específicos de ambas enzimas demuestran que estas peptidasas solubles no intervienen en los mecanismos de control del recambio del TRH en la terminal nerviosa.

ABSTRACT

A large body of experimental evidence suggests that narrow-specificity membrane-bound pyroglutamate aminopeptidase II (PGAll) could be responsible for inactivating TRH released at the synaptic cleft. Although some characteristics relevant to the possible physiological role of PGAll have been defined, other cellular events still remain unknown.

In this work we have investigated the topological organization on plasma membrane and cellular localization of pyroglutamate aminopeptidase II in primary cultures of fetal mouse brain.

PGAll activity was detected in intact cells and in an equivalent membrane fraction obtained from hypothalamic and cortical cell cultures. The enzyme was absent in pure glial cell cultures.

Permeabilization of plasma membrane in intact cells as result of saponin pretreatment did not modify enzyme activity. In contrast trypsin digestion of membrane ectoproteins reduced PGAll activity by 70%. Similar effects of trypsin and saponin were observed in intact brain synaptosomes.

In hypothalamic primary cultures pyroglutamate aminopeptidase II specific activity was increased when proliferation of non neuronal cells was halted by inclusion of cytosine arabinoside. Selective neuronal degeneration after treatment of cortical cells with the neurotoxic agent glutamate was accompanied by a significant reduction of PGAll activity.

These results show that PGAll is a true ectoenzyme located on the plasma membrane of neuronal cells, which strongly supports an important role of the enzyme in TRH extracellular catabolism in brain.

We also evaluated the role of TRH-degrading soluble enzymes PGAI and prolyl endopeptidase in controlling intracellular TRH levels in brain. The specific *in vivo* and *in vitro* inhibition of both enzymes did not modify the TRH content in any brain region examined. These findings do not support a role of these enzymes in intracellular turnover of TRH.

Introducción

El mantenimiento de las funciones vitales de los organismos superiores depende de la comunicación rápida y eficiente entre las células que los constituyen. El Sistema Nervioso como centro regulador de las funciones se encuentra en constante comunicación con los otros sistemas del organismo, proceso que se lleva a cabo mediante la producción y liberación por parte de las células nerviosas de mensajeros químicos, ya sea en zonas especializadas conocidas como sinapsis (comunicación nerviosa), o bien a través de la secreción de los mismos al torrente circulatorio (comunicación neurohormonal). En cualquier caso, la interacción de estos transmisores químicos con receptores específicos localizados en la membrana plasmática de las células blanco generan en su interior una serie de eventos moleculares (mediante la participación de sistemas de transducción de la señal acoplados a esta interacción), que se traducen en una respuesta específica por parte de las mismas.

Propiedades de los neuropéptidos

La naturaleza química de las moléculas que participan en los mecanismos de transferencia de información en el Sistema Nervioso es diversa. Dentro de todos estos transmisores químicos destacan, por sus características estructurales, la existencia de péptidos activos capaces de modificar la actividad neuronal. La naturaleza oligomérica de los péptidos les proporciona un vasto contenido de información intrínseca, la cual se ha explotado de maneras muy diversas por los diferentes sistemas de los organismos. El Sistema Nervioso es quizá donde se aprecia con mayor claridad la complejidad y sutileza del señalamiento químico mediado por los péptidos; por ejemplo, dentro de la secuencia de una proteína precursora (propéptido) pueden estar contenidas una o varias copias de un mismo mensaje como ocurre en el caso del proTRH en el hipotálamo de los mamíferos, el cual posee 5 copias potenciales del tripéptido TRH (Lechan y cols., 1986a), o en la proencefalina en donde se encuentran 5 copias de Met-enk y una de Leu-enk (Comb y cols., 1982). Alternativamente varios mensajes distintos pueden estar presentes en el mismo precursor, como ocurre en el caso de la proopiomelanocortina (POMC), la cual contiene las secuencias de la β endorfina, ACTH, β lipotropina y α MSH entre otros. Los mecanismos moleculares de síntesis y procesamiento de los péptidos activos participan también dentro de las estrategias celulares utilizadas para la obtención de información a partir de un mismo mensaje original. Así, la expresión del gene para un péptido activo (el gene de la calcitonina) en dos tejidos diferentes (el hipotálamo y la tiroides) da origen a dos péptidos distintos (CGRP y calcitonina respectivamente) como resultado del proceso de edición diferencial (splicing) del transcrito primario (Amara y cols., 1982); mientras que el procesamiento tejido-específico del POMC genera diferentes productos peptídicos: en el lóbulo anterior de la hipófisis a partir de POMC se producen ACTH, β LPH, un péptido de 16 K y pequeñas cantidades de β endorfina (Loh y cols, 1984); en tanto que en el hipotálamo y el lóbulo intermedio hipofisario la ACTH y la β LPH son procesadas para dar origen al desacetil α MSH y la β endorfina respectivamente (Gramsch y cols., 1980; Smith y cols., 1982). Las modificaciones químicas postraduccionales a la estructura de los péptidos representan una estrategia adicional de aprovechamiento de su información: por ejemplo, la acetilación de la α MSH provoca un aumento en su potencia biológica (O'Donohue y cols., 1981).

El número de péptidos descritos en el Sistema Nervioso es considerable (casi un centenar) (Hokfelt y cols., 1980a; Krieger, 1983); muchos de ellos constituyen también elementos de comunicación del sistema endócrino (Scharrer, 1987). Cada neuropéptido posee una distribución particular en el Sistema Nervioso (Palkovits, 1984), de manera que es posible establecer la localización de los cuerpos celulares que contienen neuropéptidos específicos y de sus proyecciones. De manera similar, los receptores a estos péptidos también muestran una localización anatómica definida en el Sistema Nervioso, así como en los órganos periféricos (Lynch y Snyder, 1986; Scharrer, 1987).

Aspectos evolutivos de los péptidos en el Sistema Nervioso

Las neuronas productoras y secretoras de péptidos (neuronas peptidérgicas) constituyen una clase de células ampliamente distribuidas en los Sistemas Nervioso Central y Periférico, tanto en los vertebrados como en los invertebrados (Krieger y cols., 1983; Lynch y Snyder, 1986; Scharrer, 1987). Se ha descrito la existencia de neuropéptidos presentes en mamíferos en otros organismos pertenecientes a phyla muy diversos, incluyendo organismos unicelulares (Roth y Le Roth, 1984). De igual manera, péptidos inicialmente localizados en especies inferiores (invertebrados) se han caracterizados posteriormente en diversas especies de vertebrados (Bodenmuller y Schaller, 1981). Moléculas peptídicas idénticas o con secuencias muy similares a las localizadas en el Sistema Nervioso son producidas por células no neuronales; un ejemplo de ello lo representa la somatostatina, inicialmente aislada del hipotálamo e identificada posteriormente en órganos como el páncreas o en células del sistema endócrino difuso del aparato digestivo (Patel y Reichlin, 1978; Pearse y Taylor, 1979). Por el contrario, péptidos como la sustancia P, la gastrina y la colecistocinina descritos inicialmente en el intestino y otros órganos del aparato digestivo (Von Euler y Gaddum, 1931), se identificaron posteriormente en el Sistema Nervioso.

Se han podido establecer "familias" de péptidos con secuencias de aminoácidos idénticas o muy similares en especies con historias evolutivas muy diferentes (como en el caso de las taquininas). Esta similitud o quizá identidad en la configuración de estas moléculas indica que los neuropéptidos biológicamente activos son elementos estables con una larga historia evolutiva, cuyo origen se remonta probablemente al desarrollo de los sistemas nerviosos primitivos. Se ha especulado que en un principio el Sistema Nervioso tuvo a su cargo todas las funciones integrativas requeridas por el organismo, para lo cual las células nerviosas primitivas expresaron inicialmente propiedades secretoras. Posteriormente al desarrollarse en organismos más avanzados un sistema endócrino propiamente dicho, las células neurosecretoras pluripotenciales adquirieron un nuevo papel fisiológico sináptico, aunque su capacidad de comunicación directa con sus células efectoras terminales no se perdió. Así, a medida que las necesidades funcionales de los organismos se hicieron más complejas, fue necesario desarrollar nuevas estrategias de comunicación, para lo cual se seleccionaron secuencias específicas presentes en la estructura de las proteínas precursoras ancestrales (lo cual se encuentra ejemplificado hoy día por los mecanismos de biosíntesis de péptidos a partir de proproteínas), las cuales evolucionaron en concierto con sus moléculas receptoras correspondientes (Scharrer, 1987).

Funciones de los péptidos en el Sistema Nervioso

Los péptidos presentes en el Sistema Nervioso ejercen efectos diversos relacionados con la regulación de los principales sistemas homeostáticos del organismo, producen acciones locales sobre la circulación cerebral y sobre la actividad neuronal, se encuentran involucrados en el desarrollo y diferenciación de las células nerviosas y en la adquisición de la plasticidad neuronal y participan en la expresión de la conducta de los organismos (Krieger y cols., 1983). Sin embargo, para muchos de estos neuropéptidos se desconoce todavía el papel fisiológico específico que desempeñan.

Originalmente a muchos de ellos se les adjudicó una "función específica" definida con base en dos criterios: el efecto descrito inicialmente en un sistema determinado y la vía de acción mediante la cual ejercían estos efectos. A los péptidos hipotalámicos por ejemplo les fue otorgado un nombre característico en base a sus acciones inhibitoras o estimuladoras de la secreción de distintas hormonas de la glándula pituitaria anterior; sin embargo con el paso del tiempo se hizo evidente que estos factores peptídicos no se encontraban confinados al hipotálamo o aun al cerebro mismo y que por consecuencia tienen en estos órganos y sistemas otra función: por ejemplo, la llamada hormona liberadora de la hormona Luteinizante (LHRH), además de su conocido efecto hormonal sobre la liberación de LH de la pituitaria, es liberada de terminales nerviosas específicas sobre neuronas ganglionares de la retina, o bien en ganglios periféricos de los invertebrados (Jan y cols., 1979; Jan y Jan, 1981), actuando probablemente en estos casos como neurotransmisor o neuromodulador de la actividad nerviosa. La somatostatina, que participa como neurohormona al inhibir la liberación de la hormona del crecimiento (GH) de la hipófisis actúa también como mediador parácrino cuando es liberada de las células beta de los islotes pancreáticos (Reichlin, 1983), inhibiendo la liberación de glucagón y/o insulina de las células vecinas. La identificación de células nerviosas que sintetizan ACTH, insulina o glucagón (o de secuencias derivadas o relacionadas a ellos), consideradas por mucho tiempo como ejemplos clásicos de hormonas periféricas, sugiere su participación en la función nerviosa.

De esta manera los péptidos al igual que los demás mensajeros químicos, no se encuentran asociados a una función específica o a un órgano en particular, ni son propiedad exclusiva de cualquiera de las modalidades de comunicación. El papel que desempeñan depende principalmente del sistema específico en el que participan y en particular del arreglo anatómico-funcional de los elementos celulares que los componen.

La presencia de péptidos biológicamente activos en el Sistema Nervioso no se limita a las neuronas, ya que se ha demostrado la síntesis y secreción de varios neuropéptidos por parte de los astrocitos (Vilijn y cols., 1988; Shinoda y cols., 1989), así como la existencia de receptores a los mismos presentes en las células de origen glial (Hansson, 1988). Estas observaciones sugieren nuevos papeles funcionales aún no definidos de los péptidos en el Sistema Nervioso.

Por último cabe señalar la relación existente entre los sistemas neuronales peptidérgicos y dos sistemas regulatorios del organismo. Uno de ellos se refiere a su asociación con el sistema inmune (Goetzl, 1985), el cual comparte con estructuras endócrinas una serie de sustancias reguladoras (ACTH, TRH y endorfinas entre otros, así como a sus receptores correspondientes) (Blalock y cols., 1985 a,b). Esta comunicación entre los sistemas inmune y nervioso además parece ser bidireccional. Una segunda relación funcional se refiere al papel de los neuropéptidos en el control homeostático de fluidos y el balance de electrolitos (por ejemplo la participación del VIP y del péptido atrial natriurético) (De Bold, 1985).

En conclusión, la relevancia de los péptidos en un sistema en particular requiere del conocimiento preciso sobre como funcionan las células que los producen. El advenimiento y desarrollo de las técnicas modernas de biología celular y molecular, ha permitido realizar avances importantes. Hoy en día muchas de las preguntas relevantes en el campo de los neuropéptidos son generales y extensivas a toda la biología celular. Estas incluyen eventos tales como la evolución y regulación de la expresión de los genes de los cuales se derivan, la biosíntesis, modificación y procesamiento de las proteínas precursoras, el transporte, el almacenamiento, la liberación e inactivación de los péptidos, así como la información relacionada con sus receptores y con los mecanismos de trasducción que regulan su funcionamiento. Se han caracterizados para ciertos péptidos algunos de estos eventos, sin embargo, queda por definir cuales son los mecanismos que regulan cada una de estas etapas, así como la importancia que estos procesos moleculares y celulares poseen en la función fisiológica de los neuropéptidos.

CAPITULO I

HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA

TRH Hormona Liberadora de Tirotropina

El tripéptido TRH (Hormona Liberadora de Tirotropina: piroglutamil-histidil-prolinamida, pGlu-HisProNH₂) es el modelo de estudio de este trabajo. La elucidación del papel que el TRH desempeña en la función nerviosa, requiere el análisis de los mecanismos bioquímicos y moleculares de su síntesis, transporte, almacenamiento, liberación e inactivación, eventos que se llevan a cabo por parte de las neuronas que lo producen (neuronas TRHérgicas). El objetivo de este capítulo es el de referir los aspectos esenciales relacionados con la bioquímica celular de las neuronas TRHérgicas.

Distribución filogenética del TRH

El TRH se encuentra presente en el Sistema Nervioso de numerosas especies de vertebrados (Jackson y Reichlin, 1974; Kubek y cols., 1977). En los mamíferos el TRH hipotalámico participa en la regulación de algunas de las funciones endócrinas de la hipófisis anterior (Reichlin y cols., 1978; Morley, 1981; Jackson y Lechan, 1983). Sin embargo, el papel que desempeña el péptido en la función nerviosa en otros grupos animales no es del todo claro, a pesar de estar presente en concentraciones aún mayores que las encontradas en los mamíferos. Por ejemplo, se ha detectado la presencia de TRH-IR en el cerebro de la larva de la lamprea, en la región cefálica del anfibio y en el ganglio circunmesofágico del caracol (Jackson y Reichlin, 1974; Jackson, 1983), especies en las que no se ha demostrado la presencia de TSH o una glándula hipófisis. El TRH también se encuentra presente en otros órganos y tejidos, como la glándula pineal de los ovinos (White y cols., 1974), la placenta humana o de la rata (Gibbons y cols., 1975, Shambaugh y cols., 1978), el sistema reproductor de la rata macho (Pekary y cols., 1983), el tracto gastrointestinal de la rata, particularmente en el páncreas neonatal (Morley y cols., 1977; Leppaluoto y cols., 1978, Martino y cols., 1978; Kawano y cols., 1983), así como en la piel de anfibios y reptiles (Jackson y Reichlin, 1977a).

La presencia de TRH en diferentes tejidos de especies evolutivamente distantes ha generado diversas teorías acerca de su posible origen evolutivo y embriológico. Se ha propuesto que todos los tejidos que comparten péptidos similares podrían ser originados a partir de la región de la cresta neural (Pearse, 1969); sin embargo, se sabe que la glándula pineal, la hipófisis anterior y el hipotálamo surgen del neuroectodermo o de placodas ectodérmicas específicas. Otra propuesta sugiere que el TRH del Sistema Nervioso se relaciona con el que se localiza en el tracto gastrointestinal y la piel de los anfibios a través de un origen ectodérmico común (Vizi, 1984).

La presencia de TRH en el Sistema Nervioso especies que no poseen hipófisis, así como el hecho de que tanto en la piel del sapo, como en el ganglio nervioso del caracol la función aparente del TRH es la de mantener el equilibrio homeostático del metabolismo de la sal y el agua, son evidencias que ejemplifican como los diferentes organismos han adaptado el uso de una misma molécula ya existente para llevar a cabo funciones diversas y sugieren que la posible función primitiva del TRH se relaciona principalmente con el papel que desempeña actualmente en la comunicación nerviosa en diversas especies, en tanto que su función neurohormonal como regulador de la secreción de TSH en los mamíferos fue adquirida posteriormente durante la evolución (Prasad, 1985).

Distribución de TRH en el Sistema Nervioso

El TRH se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro de los mamíferos. Las concentraciones más elevadas del tripéptido se encuentran en el hipotálamo, particularmente en la zona de la eminencia media (Jackson y Reichlin, 1974), la cual contiene abundantes terminales axónicas provenientes de distintos núcleos hipotalámicos, particularmente del núcleo paraventricular (PVN), región que corresponde a la llamada "área tirotrópica" por su relación con la función hipofisiotrópica del TRH (Aizawa y Greer, 1981; Ishikawa y cols., 1988).

En otras regiones extrahipotalámicas las concentraciones individuales existentes del TRH son menores, sin embargo representan en conjunto alrededor del 70 % de los niveles totales presentes en el cerebro (Jackson y Reichlin, 1977b). Las regiones del SNC de la rata que poseen los niveles más elevados del TRH son: el tálamo, el tallo cerebral, el lóbulo olfatorio y la médula espinal (Winokur y Utiger, 1974; Kizer y cols., 1976; Jeffcoate y cols., 1976; Kardon y cols., 1977a). Los niveles de TRH en estas regiones no son afectadas por lesiones en el área tirotrópica, ni como resultado de la deafferentación hipotalámica (Jackson y Reichlin, 1977b; Brownstein y cols., 1974), lo cual demuestra que en estas áreas se produce la síntesis *in situ* del tripéptido.

En la neurohipófisis existen concentraciones elevadas de TRH, las cuales son depletadas como resultado de lesiones a nivel hipotalámico, por lo que se ha sugerido la existencia de un sistema tuberoinfundibular separado del descrito para la zona anterior de la hipófisis (Jackson y Lechan, 1983).

Estudios inmunocitoquímicos revelan la presencia de cuerpos celulares TRHérgicos en muy diversas áreas del cerebro (Tabla 1). En el hipotálamo las células inmunopositivas se localizan principalmente en la división parvocelular del PVN (que incluye a las subdivisiones anterior, medial y periventricular), distribuyéndose en una configuración triangular en los límites dorsales del tercer ventrículo (Lechan y Jackson, 1982; Jackson y Lechan, 1983; Jackson y cols., 1985). Otras regiones hipotalámicas que también presentan somas celulares TRHérgicos son el núcleo preóptico supraquiasmático, las áreas preópticas medial y lateral, el núcleo dimórfico sexual, el núcleo dorsomedial, el núcleo arcuato, la región perifornical y en el hipotálamo basolateral (Lechan y Jackson, 1982; Merchenthaler y cols., 1988). Estas regiones no proyectan hacia la eminencia media y por lo tanto no contribuyen a la función hipofisiotrópica del TRH.

A nivel telencefálico existen somas celulares TRH-IR en las capas glomerular, plexiforme del bulbo olfatorio y en el núcleo olfatorio anterior (Tsuoro y cols., 1988; Hokfelt y cols., 1989; Merchenthaler y cols., 1989). En áreas corticales se localizan células positivas en la corteza piriforme, en la corteza entorrinal y alrededor del sulcus rinal. En el hipocampo las células TRH positivas se observan en las capas piramidal y granular, así como en el giro dentado. Los núcleos amigdalino, accumbens, septohipotalámico, así como los de la base de la estria terminal, la comisura anterior y la banda diagonal de Broca son otras regiones en donde se localizan cuerpos celulares TRHérgicos (Lechan y Jackson, 1982; Merchenthaler y cols., 1989). En el mesencéfalo y el puente de la médula espinal se encuentran numerosos cuerpos celulares distribuidos en la materia gris periacueductal, en el núcleo pontino y en menor número en la sustancia nigra y en el núcleo lemniscal ventrolateral (Lechan y Jackson, 1986; Merchenthaler y cols., 1988). El bulbo raquídeo posee células TRHérgicas a nivel de los núcleos magnus, obscurus y pallidus del rafe (Tsuoro y cols., 1987; Merchenthaler y cols., 1988), así como también en el núcleo cuneado externo, en el complejo vagal dorsal y en el área postrema (Lechan y Jackson, 1986). En la médula espinal las láminas II-III del asta dorsal contienen numerosos cuerpos celulares TRH-IR (Harkness y Brownfield, 1985; Tsuoro y cols., 1987).

Se ha reportado la existencia de fibras y terminaciones nerviosas conteniendo TRH en diversas áreas cerebrales como la eminencia media (en donde las fibras se distribuyen a través de toda la región rostrocaudal y hacia la zona externa), el órgano vasculoso de la lámina terminal del área preóptica, la amígdala, el septum lateral, el tallo cerebral inferior (Lechan y Jackson, 1982; Palkovitz, 1984; Harkness y Brownfield, 1985) y la médula espinal, (particularmente a nivel del asta ventral, la sustancia gris central, la columna intermediolateral y en menor proporción en el asta dorsal (Palkovitz, 1984; Harkness y Brownfield, 1985).

Las vías TRHérgicas identificadas plenamente comprenden únicamente la relacionada con la función tirotrópica del PVN a la eminencia media y la que proyecta de los núcleos de rafé del bulbo raquídeo al asta ventral de la médula espinal, la cual probablemente este relacionada con la inervación de motoneuronas α (Johansson y cols., 1981; Bowker y cols., 1983). Existen evidencias que sugieren la presencia dentro del asta dorsal de la médula espinal de un sistema neuronal local y cuyo papel podría relacionarse con el procesamiento de la información sensorial (Ulfhake y cols., 1987). En la médula espinal se ha observado la coexistencia en fibras y terminales que inervan neuronas simpáticas preganglionares de TRH con 5-HT y SP (Johansson y cols., 1981, 1983; Harkness y Brownfield, 1985; Appel y cols., 1987; Staines y cols., 1988). Se ha identificado de igual manera la presencia conjunta de TRH con otros péptidos en otras áreas del cerebro: con hormona del crecimiento humana (hGH) en el hipotálamo y áreas extrahipotalámicas (Lechan y cols., 1983), con Leu- o Met- encefalina en el área perifornical del hipotálamo (Tsuoro y cols., 1988a) y con NPY en la materia gris periacueductal (Tsuoro y cols., 1988b). En algunas neuronas de la capa glomerular del hipotálamo se detecta TRH-IR en asociación con la enzima tirosina hidroxilasa, lo cual sugiere la coexistencia del péptido con catecolaminas (Tsuoro y cols., 1988b). En órganos periféricos también se localiza TRH-IR en asociación con otras hormonas peptídicas, como en el caso de insulina en las células beta del páncreas fetal y neonatal en la rata y el cobayo (Hokfelt y cols., 1989) o en las células neurosecretoras del tracto gastrointestinal y atrium del estómago del cobayo.

La presencia simultánea de péptidos con neurotransmisores clásicos o con otros productos peptídicos es una característica común reportada para muchas neuronas y células endócrinas (Chan-Palay y cols., 1978; Chan-Palay y Palay, 1984; Hokfelt, 1978, 1980b, 1984). La razón específica de esta coexistencia es incierta, sin embargo se ha sugerido la posibilidad de que las distintas moléculas sean coliberadas, estableciéndose una modulación recíproca entre ellos, acciones que podrían involucrar tanto mecanismos pre como postsinápticos (Hokfelt y cols., 1989).

Papel hipofisiotrópico del TRH.

El TRH hipotalámico es el factor responsable en los mamíferos de la liberación de la tirotrópica (TSH) por parte de la hipófisis anterior, regulando de esta manera la función del eje hipófisis-tiroides (Reichlin y cols., 1978; Morley, 1981; Jackson, 1982).

El área nerviosa relacionada con este efecto hipofisiotrópico del TRH es el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) (Aizawa y Greer, 1981; Jackson y Lechan, 1983; Ishikawa y cols., 1988), región que contiene los cuerpos celulares de las neuronas TRHérgicas relacionadas con esta función (Lechan y Jackson, 1982; Jackson y cols., 1985). Como se mencionó anteriormente los axones de las neuronas TRHérgicas en el PVN proyectan hacia la zona externa de la eminencia media (Lechan y Segerson, 1989). En esta zona las terminales nerviosas se encuentran dispuestas en estrecha asociación con los capilares del sistema portal hipofisario, disposición anatómica que permite al péptido secretado alcanzar la hipófisis anterior (adenohipófisis), e interactuar con los receptores

específicos de alta afinidad situados sobre la membrana plasmática de los tirotropos (Labrie y cols., 1972; Wilber y Seibel, 1973), provocando de esta manera la liberación de TSH. Un efecto adicional de esta interacción es la estimulación de la síntesis de novo y el grado de glicosilación de la TSH (Fraser y McNeilly, 1982; Fink y cols., 1983). La secreción de tiotropina al sistema circulatorio general, permite a su vez que esta alcance la tiroides, en donde se estimula la secreción de las hormonas T_3 y T_4 (Dumont y Lamy, 1980).

El TRH actúa además a nivel de la población de las células productoras de prolactina (lactotropos), como un agente estimulador potente de su secreción (Tashjian y cols., 1971; Grosvenor y Mena, 1980). Estudios en la línea tumoral de células hipofisarias GH_3 (la cual secreta PRL y GH) muestran que el TRH ejerce tanto cambios a corto plazo sobre la liberación de estos péptidos, como modificaciones adaptativas a largo plazo sobre la transcripción de los genes correspondientes (Murdoch y cols., 1983; Laverriere y cols., 1983). La función del TRH en la fisiología de estos sistemas no es del todo clara, ya que el mecanismo primario de regulación de la liberación de PRL parece ser el efecto inhibitorio que ejerce la dopamina sobre la adenohipófisis, en tanto que no se ha reportado efecto de TRH sobre la liberación in vivo de GH (Udesmichi y cols., 1976).

La regulación de la función neurohormonal del TRH se encuentra sujeta a la acción de mecanismos de retroalimentación negativos por parte de las hormonas tiroideas. A nivel hipofisario por ejemplo, se ha observado la disminución de la secreción de PRL y TSH (Padmanabhan y cols., 1981), de la síntesis de los RNAm específicos de las subunidades respectivas (Shupnik y cols., 1985), así como del número de receptores a TRH sobre la membrana de los tirotropos (Hinkle y Goh, 1982) como resultado del aumento en los niveles de las hormonas tiroideas.

Ha sido difícil evaluar el efecto retroalimentador que ejercen las hormonas tiroideas sobre las neuronas TRHérgicas en el hipotálamo completo. Se han reportado cambios en los niveles de TRH hipotalámicos de animales sometidos a distintos paradigmas experimentales que afectan su estado tiroideo (Childs y cols., 1981; Roti, 1978); sin embargo otros estudios han arrojado datos negativos (Bassiri y Utiger, 1974; Kardon y cols., 1977b) o sujetos a controversia (Reichlin, 1986). Estos resultados probablemente reflejan el hecho de que muchas de las neuronas TRHérgicas del hipotálamo no forman parte del sistema tuberoinfundibular y por lo tanto no participan en la regulación de la liberación de TSH (Lechan y Jackson, 1982; Lechan y cols., 1986). Por lo tanto se ha tratado de evaluar el efecto individual que ejercen las hormonas tiroideas sobre los distintos mecanismos celulares involucrados en el mantenimiento de los niveles intracelulares de TRH (biosíntesis, procesamiento del precursor y liberación). De esta manera se ha determinado un efecto retroalimentador negativo de las hormonas tiroideas sobre la cantidad de TRH presente en el PVN (Yamada y cols., 1989) y en la eminencia media (Mori y Yamada, 1987); así como sobre la liberación del péptido tanto in vivo como in vitro (Jackson y Lechan, 1983; Iriuchijima y cols., 1986; Rondeel y cols., 1988).

Se ha observado por hibridización in situ que en ratas hipotiroideas o tiroidectomizadas la concentración del RNAm proTRH en el PVN se eleva significativamente (Segerson y cols., 1987b; Koller y cols., 1987; Zoeller y cols., 1988), incremento que es observado también en ratas hipofectomizadas (Segerson y cols., 1987b; Zoeller y cols., 1988), lo cual sugiere que la TSH no se encuentra involucrada en esta respuesta. Por el contrario, la administración de levotiroxina (rT_3) o $L-T_3$ previene o aun disminuye los niveles del mensajero específico a pro TRH, en animales eu- e hipotiroideos (Segerson y cols., 1987b; Koller y cols., 1987), estableciendo así una relación inversa

entre los niveles de hormonas tiroideas circulantes y los niveles de RNAm proTRH en el PVN. El análisis semicuantitativo a nivel celular de estos resultados muestra la existencia de diferencias significativas en la densidad de marca radioactiva presente entre las distintas células, sugiriendo la presencia de neuronas TRHérgicas más responsivas a la depleción de hormonas tiroideas que otras y que por lo tanto incrementan su contenidos varias veces (Segerson y cols., 1987b; Lechan y Segerson, 1989).

El efecto retroalimentador negativo que ejercen las hormonas tiroideas sobre la proporción de RNAm específico a TRH, se observa exclusivamente en la población de neuronas TRHérgicas localizadas en la subdivisión parvocelular medial del PVN y coincide con la observación de que en la rata la condición hipotiroidea provoca cambios morfológicos únicamente en las neuronas TRHérgicas hipotalámicas de esta zona (Nishiyama y cols., 1985). De manera similar el estado hipotiroideo provoca un incremento en la intensidad de la tinción celular específica de las neuronas inmunoreactivas a pro-TRH presentes en esta subdivisión medial, sin afectar a las neuronas de la zona anterior (Segerson y cols., 1987b; Lechan y Segerson, 1989). Estos resultados sugieren que en esta región hipotalámica el hipotiroidismo induce tanto la transcripción como la traducción del precursor a TRH .

La diferente sensibilidad mostrada a las hormonas tiroideas por parte de las neuronas de las subdivisiones medial y división anterior podrían estar determinadas por factores celulares específicos a estas neuronas (como la concentración de receptores a las hormonas tiroideas o la actividad de la 5'deiodinasa que convierte T_4 a T_3) o por la existencia de controles regulatorios aferentes distintos en estas dos zonas hipotalámicas.

La existencia de terminales axónicas que poseen adrenalina haciendo sinápsis con cuerpos celulares TRHérgicos en el PVN (Liposits y cols., 1990), llevó a sugerir que el efecto retroalimentador de las hormonas tiroideas sobre la síntesis de TRH podría ocurrir indirectamente a través de vías centrales catecolaminérgicas (Lechan y Segerson, 1989). Sin embargo se ha demostrado que la implantación de cristales de T_3 en el PVN de ratas hipotiroideas provoca una abrupta caída en los niveles de RNAm proTRH, lo cual apoya un efecto directo de las hormonas tiroideas sobre la regulación de la expresión del gene a TRH (Dyess y cols., 1988).

En conclusión, ya que la secreción de TSH se encuentra determinada primariamente por el efecto estimulador de TRH (Martin y cols., 1970; Kaplan y cols., 1986), se ha propuesto que el punto "normal" de la secreción de TSH se encuentra dinámicamente regulado por los efectos de las hormonas tiroideas sobre la transcripción del RNAm proTRH en el núcleo paraventricular (Lechan y Segerson, 1989).

En otros tejidos como la próstata también se ha observado la modulación de los niveles del proTRH por efecto de las hormonas tiroideas (Pekary y cols., 1987; Simard y cols., 1989a,b).

Se ha sugerido la posibilidad de que las hormonas de la adenohipófisis pudieran alcanzar el hipotálamo a través de un flujo retrógrado. Sin embargo, no existen evidencias experimentales que apoyen la existencia in vivo de un efecto retroalimentador corto (short-loop) por parte de TSH y/o PRL sobre la síntesis ó liberación de TRH.

Efectos del TRH

Estudios neurofarmacológicos muestran una gama amplia de acciones del TRH en el Sistema Nervioso, distintos a los observados en el eje endócrino. Por ejemplo, la aplicación microiontóforética del tripéptido afecta la actividad neuronal en diferentes áreas del cerebro, tanto de manera excitatoria como inhibitoria, (Moss, 1983; Renaud y Martin, 1975; Winokur y Beckman, 1978), causa un aumento en el recambio de noradrenalina en el cerebro (Horst y Spirt, 1974; Constantinidis y cols., 1974; Marek y Haubrich, 1977; Horst y cols., 1979) y potencia el efecto excitatorio de la acetilcolina sobre las neuronas corticales (Yarbrough, 1976).

La administración *in vivo* de TRH en el fluido cerebroespinal o en núcleos celulares específicos modifica algunos patrones del comportamiento de los animales, por ejemplo: estimula la actividad locomotora espontánea (Miyamoto y Nagawa, 1977; Sharp y cols., 1984a); afecta una gran variedad de conductas estereotipadas como el "rearig" (Miyamoto y cols., 1984), el giro de la cabeza (head turning) (Malouin y Bedard, 1982), o la generación de sacudidas (shaking) (Wei y cols., 1975; Kalivas y Horita, 1981; Yamada y cols., 1983; Drust y Connor, 1983). La infusión de TRH aumenta la temperatura corporal (hipertermia) (Lin y cols., 1980; Chi y Lin, 1984), efecto en la que se encuentra involucrada al área preóptica anterior del hipotálamo (Kalivas y Horita, 1981; Salzman y Beckman, 1981). Asimismo suprime la ingesta de alimento y bebida (Collú y Taché, 1979; Susuki y cols., 1982), además de antagonizar los efectos depresivos de drogas psicoactivas (analepsia) (Bissette y cols., 1976).

La mayoría de estas respuestas parecen involucrar mecanismos de control dopaminérgicos, aun cuando otros neurotransmisores podrían desempeñar papeles secundarios relevantes (Horita y cols., 1986). De todas ellas la que más atención ha recibido es el cambio en la actividad locomotora; participan en esta respuesta áreas cerebrales como el núcleo accumbens y el hipotálamo (Ushijima y cols., 1984; Lin y cols., 1983; Andrews y Sahgal, 1983; Narumi y Nagawa, 1983; Sharp y cols., 1984a; Masserano y King, 1981). El sitio celular exacto de la acción del TRH en el núcleo accumbens se desconoce, pero las evidencias bioquímicas, electrofisiológicas y farmacológicas sugieren que no actúa directamente sobre las terminales dopaminérgicas o sobre los receptores postsinápticos a dopamina (Pinnock y cols., 1983; Hashimoto y cols., 1983; Narumi y Nagawa, 1983).

Por otra parte las propiedades analépticas descritas para el TRH (Breese y cols., 1975; Horita y cols., 1976a; Sharp y cols., 1984b), parecen estar mediadas por intermedio de vías colinérgicas (Horita y cols., 1976b; Miyamoto y cols., 1982), localizadas en áreas tales como el septum medial y el núcleo de la banda diagonal de Broca (Kalivas y Horita, 1983; Brunello y Cheney, 1981), el hipocampo (Sharp y cols., 1984b) y el hipotálamo (Miyamoto y cols., 1982).

Otros efectos del TRH incluyen sus acciones estimuladoras sobre la presión arterial y el ritmo cardíaco (Diz y Jacobowitz, 1984), cambios en el flujo sanguíneo (Koskinen y Bell, 1984), en la actividad motora gastrointestinal (LaHann y Horita, 1982) y en la secreción gástrica (Tonoue, 1982). El tripéptido muestra un efecto protector en animales que presentan daño espinal severo (Holaday, 1984; Faden y cols., 1981, 1983, 1984 y 1989), así como acciones favorables en la recuperación neurológica de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (Engel y cols., 1983; Brooks, 1989) y en la ataxia que se observa en la degeneración espinocerebelar (SCD) (Sobue y cols., 1983). Estos efectos podrían relacionarse con la estimulación de la actividad excitatoria que el TRH y algunos análogos ejercen sobre motoneuronas espinales de anfibios (Nicoll, 1977; Yarbrough y Singh, 1979), así como también

con las acciones tróficas descritas para el TRH, tanto en neuronas motoras del asta ventral en cultivo (estimulando en este caso la actividad de enzimas como la ChAT y la creatina cinasa) (Schmidt-Achert, 1984; Banda y cols., 1985), como en transplantes de médula espinal in oculo (Henschen y cols., 1988).

Receptor al TRH

El papel hormonal que desempeña el TRH en el control del eje tiroideo, así como su participación en la comunicación nerviosa está asociado con la interacción del tripéptido con proteínas receptoras específicas presentes en las membranas de las células blanco. El diseño de moléculas análogas al TRH con afinidades aún mayores que el tripéptido en ensayos de unión a ligandos y que son capaces de ser marcadas radioactivamente con una actividad específica elevada (e.g. 3 Me-His-TRH; DN-1417) permitió establecer la existencia de sitios de unión específicos de alta afinidad presentes tanto en la membrana de las células adenohipofisarias (Labrie y cols., 1972; Wilber y Siebel, 1973), como en preparaciones membranales obtenidas de diferentes regiones del cerebro (Burt y Snyder, 1975; Taylor y Burt, 1981; Ogawa y cols., 1982; Rostejne y cols., 1984). La constante de disociación (Kd) para el receptor hipofisario es aproximadamente de 10 nM (Hinkle, 1989), en tanto que en el cerebro varía dependiendo de la región y de la especie estudiada (Kd 3-14 nM) (Johnson y cols., 1989; Sharif, 1989). Algunas evidencias sugieren la posible existencia de otras poblaciones de receptores de menor afinidad en regiones cerebrales tales como la corteza y el cerebelo (Burt y Snyder, 1975; Funatsu y cols., 1985), sin embargo estas observaciones no se han podido confirmar, quedando la posibilidad de que estas diferencias se refieran a diferentes estados de afinidad del mismo receptor (Sharif, 1989).

La distribución de los receptores a TRH es muy heterogénea siendo la retina, la hipófisis y estructuras límbicas como la amígdala, el hipocampo, la corteza peririnal, el bulbo olfatorio y el núcleo septal, las regiones en donde se han localizado la mayor densidad de receptores (Taylor y Burt, 1982; Sharif, 1989). Recientemente se clonó a la proteína receptora hipofisaria para el TRH (Straub y cols., 1990). Ya que este receptor posee propiedades fisicoquímicas, farmacológicas y bioquímicas muy similares a las descritas para el receptor del cerebro, se ha propuesto que ambos pudieran presentar similitud en estructura, función y mecanismo de acción (Sharif, 1989). La distribución del receptor de TRH en la adenohipofisis se encuentra restringida solamente a las poblaciones de células tirotrópicas y mamotrópicas (células productoras de TSH y PRL respectivamente) (Hinkle, 1989). La ocupación del receptor por la hormona provoca la regulación negativa (down regulation) del número de sus receptores (regulación homóloga) (Hinkle y Tashian Jr., 1975; Gershengorn, 1978). El mecanismo molecular que media este efecto de regulación negativa se desconoce, pero parece involucrar la internalización y degradación intracelular rápida del receptor. El aumento en los niveles de las hormonas tiroideas, la disminución de los estrógenos, así como diversos compuestos que aumentan los niveles de AMPc (isobutilmetilxantina, 8 BrAMPc y toxina del cólera) provocan también efectos regulatorios negativos sobre el receptor a TRH (regulación heteróloga) (Hinkle, 1989).

El mecanismo molecular por medio del cual el TRH provoca su respuesta en las células adenohipofisarias se divide en dos etapas: la primera asociada a la estimulación de la liberación de la hormona almacenada y la segunda a la estimulación de la actividad génica. La etapa de estimulación de la secreción es a su vez un proceso bifásico constituido por una fase de secreción inmediata y potente, seguida por una fase de secreción continua pero de menor intensidad (Gershengorn, 1986).

El TRH estimula el recambio de fosfoinosítidos con la formación de IP_3 y diacilglicerol (DG), mediante la activación de una proteína G (G). El aumento en la producción de IP_3 está ligado a su vez con el aumento en los niveles intracelulares de calcio (Ca), el cual sirve como la señal intracelular responsable de la fase aguda de la secreción. Por otra parte la activación de la proteína cinasa C (PKC) mediada por el aumento en los niveles de DG parece ser la responsable de la secreción tónica subsecuente (Gershengorn, 1986, Hinkle, 1989). El mecanismo de activación de la transcripción mediada por TRH de los genes de PRL y TSH se desconoce, sin embargo los estudios realizados en las células de las líneas tumorales adenohipofisarias GH ($_3B_6$, $_4C_1$) indican que estos efectos dependen de la activación de sistemas de segundos mensajeros asociados al rompimiento del fosfatidil inositol y a la activación de vías dependientes de Ca^{2+} y/o PKC (Supowit y cols., 1984; Enyeart y cols., 1987; Laverriere y cols., 1988, 1989).

La proteína receptora a TRH exhibe una estricta especificidad estructural en las tres posiciones de los residuos que constituyen la molécula del péptido. La substitución del grupo piroGlu por Gln causa una reducción de 200 veces en su afinidad por el receptor. Asimismo el receptor posee un requerimiento astringente en cuanto al residuo de His, ya que el derivado N_1 metil His es absolutamente inactivo, en tanto que el N_1 metil His es de 3-10 veces más afín. El receptor a TRH de la pituitaria reconoce preferentemente a moléculas análogas que posean un residuo cíclico en la tercera posición, por lo que la ruptura de la prolinamida y la generación del grupo carboxilo libre del TRH bloquea su capacidad de unión al receptor (Hinkle, 1989).

Bioquímica celular de las neuronas TRHérgicas

Biosíntesis de TRH

El TRH fue el primer factor hipotalámico caracterizado químicamente (Schally y cols., 1969; Burgus y cols., 1969), evento que marcó un hito en el desarrollo de la neuroendocrinología, al demostrarse por vez primera la naturaleza peptídica de una molécula sintetizada y secretada por neuronas del hipotálamo, bajo la cual se regula una de las funciones endócrinas de la hipófisis anterior. Sin embargo el mecanismo celular por medio del cual se sintetiza la molécula fue durante muchos años un aspecto controversial y la secuencia de su precursor una de los más recientes en ser caracterizada. Inicialmente se sugirió que la formación del tripéptido se llevaba a cabo mediante un mecanismo de síntesis enzimática no ribosomal, en base a experimentos de incorporación de aminoácidos precursores radioactivos a la molécula sintetizada de novo por fragmentos de tejido hipotalámico (Mitnick y Reichlin 1971, 1972; Guillemin, 1971; Grimm-Jorgensen y McKelvy, 1974; Kubek y cols., 1977), mecanismo por el cual se producen otros péptidos pequeños como la carnosina (β Ala-His), el glutatión (τ Glu-Cys-Gly) y el N-acetil-Asp-Glu (Mooz y Meister, 1967; Skaper y cols., 1973). Estudios posteriores mostraron que la inhibición de la síntesis de proteínas o la presencia de ribonucleasa A prevenían la incorporación de ^3H -Pro o ^3H -His a la molécula de TRH, (McKelvy, 1979), lo cual se interpretó como representativo de la existencia de un mecanismo de síntesis ribosomal. El aislamiento en extractos de tejido hipotalámico de la rana y del páncreas neonatal, de material protéico de peso molecular elevado que al ser sometido a tratamientos enzimáticos y su posterior derivatización química producían moléculas con las características del TRH (Rupnow y cols., 1979a; Ouafik y cols., 1985), en asociación con los resultados antes mencionados, llevaron a proponer la existencia de una molécula precursora del TRH (McKelvy, 1979; Rupnow y cols., 1979a). La estructura primaria de este posible precursor hipotalámico solo pudo ser caracterizada años más tarde, al ser aislado a partir de un banco de expresión derivado del hipotálamo de la rata, un cDNA que contiene la secuencia nucleotídica de una preproteína precursora al TRH, (Lechan y cols., 1986). La proteína de 255 aminoácidos codificada por este cDNA (peso molecular 29,247), posee además del péptido señal, 5 copias de la secuencia Lys-Arg-Gln-His-Pro-Gly-(Lys/Arg)-Arg (la cual representa la secuencia progenitora a TRH, ver mas adelante), separadas entre si por péptidos conectores. Se ha definido la secuencia de otra proteína precursora a TRH, contenida dentro de un banco de cDNA producido a partir del RNAm aislado de la piel del sapo Xenopus laevis (Richter y cols., 1984). Este precursor que contiene 7 copias de la secuencia progenitora antes descrita, posee una organización estructural similar a la del precursor hipotalámico (Kuchler y cols., 1990), sin embargo la homología que presenta en relación con su secuencia nucleotídica es baja.

Para otros neuropéptidos se ha reportado la existencia de precursores distintos para una misma molécula como en el caso de la somatostatina en peces y mamíferos (Reichlin, 1976). La presencia de copias repetidas de un mismo mensaje dentro de la estructura de una preproteína es una característica que se encuentra en precursores de muy distintos péptidos: el factor alfa de acoplamiento en levadura (Kurjan y Herkowitz, 1982), la FMRFamida de Aplysia y Drosophila (Taussig y Scheller, 1986; Schneider y Taghert, 1988) y la proencefalina (Comb y cols., 1982; Noda y cols., 1982). Se ha propuesto que las copias múltiples de un mismo mensaje en estas preproteínas se originaron durante la evolución a partir de eventos de duplicación y recombinación intragénicos (Sossin y cols., 1989). Al igual que en el caso de estas poliproteínas, ambos precursores para TRH presentan

una divergencia significativa en la estructura de sus péptidos conectores, lo cual posiblemente haya surgido de las distintas presiones de selección sufridas entre las regiones que contienen información relevante y aquellas cuya función única en el precursor es la de servir como secuencias de empaquetamiento de dicha información (Sossin y cols., 1989).

Con base en los estudios de procesamiento y maduración de proteínas precursoras para otros neuropéptidos se ha propuesto que la generación de TRH involucra:

a) El procesamiento de la secuencia Lys-Arg-Gln-His-Pro-Gly-(Lys/Arg)-Arg a nivel de los residuos de aminoácidos básicos por parte de endopeptidasas (enzimas tipo-tripsina, -quimiotripsina, -renina o enzimas convertidoras) y carboxipeptidasa E, (Griffiths y cols., 1983; Gainer y cols., 1985; Fricker y Snyder, 1983; Fricker, 1988) generando la secuencia Gln-His-Pro-Gly.

b) la ciclización del residuo de Gln para generar el anillo de pirrolidona (piroGlu).

c) La remoción del residuo de Gly concomitante con la amidación del grupo carboxilo del residuo de prolina (ProNH₂) (Bradbury y cols., 1982).

La descripción en el Sistema Nervioso y en otros tejidos de una piroglutamil ciclasa (Busby y cols., 1987; Fischer y Spiess, 1987) y de una actividad alfa amidante (peptidil glicin monooxigenasa α amidante, PAM) dependiente de ascorbato y Cu²⁺ (Eipper y cols., 1983,1985; Eipper y Mains, 1988) dan apoyo a esta proposición.

Procesamiento del precursor para TRH

Se desconocen los etapas del procesamiento in vivo del precursor a TRH en el cerebro de los mamíferos. Mediante el desarrollo de antisueros generados en contra de las secuencias progenitoras extendidas del TRH, de porciones crípticas o de péptidos conectores se han caracterizado en el cerebro de la rata formas inmunoreactivas de muy distintos pesos moleculares :(52K-39K ; Merchenthaler y cols., 1989), (35-25K, 6K-8K; Grousselle y cols., 1990), (15K, 7K, 6K, 3K, 2.5K; Wu y cols. 1987; Wu y Jackson, 1988), las cuales podrían representar diversas etapas del procesamiento del precursor al TRH (proTRH); sin embargo se han identificado de manera inequívoca como productos del procesamiento en el hipotálamo de la rata únicamente a dos péptidos conectores (Bulant y cols., 1988) y al TRH-Gly (Glentowski y cols., 1986).

Se ha mostrado que existen diferencias importantes en las concentraciones relativas presentes en el hipotálamo o en el bulbo olfatorio de la rata de distintos péptidos derivados de la secuencia del precursor, lo cual sugiere la existencia de sitios distintos de almacenaje del precursor o bien que el proTRH en estas dos áreas cerebrales es procesado de manera diferente (Wu, 1989).

En el hipotálamo del bovino y en la piel de la rana se han caracterizado péptidos extendidos de la secuencia progenitora tanto del lado amino como del lado carboxilo terminal (Cockle y Smyth, 1986). Mientras que en el hipotálamo y médula espinal de la rata y en el hipotálamo del conejo solo se han podido localizar extensiones hacia el lado carboxilo (Cockle y Smyth, 1987,1988), en otros órganos y tejidos del conejo como la próstata y el semen las secuencias extendidas descritas comprenden únicamente el extremo amino terminal (Cockle y Smyth, 1988; Cockle y cols., 1989). Estos resultados indican la existencia de mecanismos de procesamiento tejido específicos para el precursor en estas especies (como ocurre en el caso de POMC) o bien la posibilidad de que en la próstata y el semen exista un precursor diferente al reportado para el hipotálamo.

Los estudios inmunocitoquímicos realizados en el cerebro de la rata adulta, mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra la secuencia del precursor o contra péptidos crípticos del proTRH muestran que en el PVN del hipotálamo la distribución de la tinción corresponde a la previamente descrita para el TRH en el sistema tuberoinfundibular (Liao y cols., 1988; Lechan y cols., 1987; Lechan y Segerson, 1989) (Tabla 1). A nivel intracelular la inmunotinción en contra del proTRH en esta región se restringe al pericarion neuronal, en una localización cercana al núcleo o asociada al aparato de Golgi y vesículas secretoras inmaduras (Jackson y cols., 1985; Lechan y cols., 1986; Merchenthaler y cols., 1989). En contraste cuando se utilizan anticuerpos dirigidos en contra de péptidos crípticos o en contra de TRH la distribución del material inmunoreactivo se observa tanto en el soma, a lo largo de procesos axónicos y en las terminales nerviosas (Lechan y cols., 1987; Liao y cols., 1988; Merchenthaler y cols., 1989; Lechan y Segerson, 1989). La localización exclusiva de proTRH en los cuerpos celulares de las neuronas TRHérgicas se observa asimismo en cultivos primarios hipotalámicos (Grouselle y cols., 1990).

Estas observaciones en conjunto sugieren que el procesamiento del proTRH en las neuronas del PVN se lleva a cabo rápidamente en el pericarion neuronal (de manera tal que existe un transporte preferencial del péptido ya procesado) y no durante el transporte axonal como ocurre en el caso de otros neuropéptidos como la preprosofina (precursor de la vasopresina y su neurofina asociada) (Brownstein y cols., 1980). Es posible además que en el hipotálamo el precursor sea procesado a formas extendidas o porciones crípticas las cuales podrían migrar hasta la zona de la eminencia media y aún ser cosecretadas junto con el péptido maduro (Lechan y Segerson, 1989), sugerencia que ha sido confirmada *in vitro* por la reciente demostración de que las rebanadas de eminencia media liberan por efecto de una concentración depolarizante K⁺ un péptido conector (preproTRH-₁₆₀₋₁₆₉) (Bulant y cols., 1990), el cual regula la secreción de tiotropina inducida por TRH.

Además del sistema tuberoinfundibular se ha detectado inmunoreactividad a los péptidos crípticos en muchas otras zonas del hipotálamo, así como en áreas extrahipotalámicas, la mayoría de las cuales también contienen TRH inmunoreactivo (Lechan y cols., 1987; Wu y cols., 1987, 1988; Lechan y Segerson, 1989) (Tabla 1).

Mediante el análisis por hibridización histoquímica *in situ* del RNAm al precursor de TRH (proTRH) se han identificado los sitios anatómicos de la expresión del gene a TRH en el cerebro de la rata (Segerson y cols., 1987a). Los resultados en esencia coinciden con lo reportado por inmunocitoquímica (Tabla 1). Es importante destacar sin embargo que regiones como los núcleos central anterior y basolateral de la amígdala, el núcleo supraóptico o el núcleo dorsal del vago, las cuales no presentan células TRH-IR (Jackson y Lechan, 1983; Merchenthaler y cols., 1988), poseen en contraste señal positiva para el RNAm proTRH e inmunoreactividad a proTRH o en contra de péptidos derivados del precursor (Van den Bergh y cols., 1988; Lechan y Segerson, 1989; Merchenthaler y cols., 1989).

Se ha caracterizado una línea celular tumoral derivada de tiroides (CA77), la cual sintetiza y secreta TRH así como diferentes péptidos derivados del precursor (Sevarino y cols., 1988). Recientemente se demostró que las líneas celulares AtT20 y RIN 5F transfectadas con el cDNA para el proTRH expresan el RNAm específico (Sevarino y cols., 1989). En estas células trasfectadas el precursor a TRH es cortado en los diferentes sitios dibásicos presentes, produciendo diversos péptidos crípticos caracterizados anteriormente en el hipotálamo y bulbo olfatorio (Wu y cols., 1988), los cuales son liberados junto con el péptido maduro por medio de un mecanismo de secreción regulada.

Tabla 1

Localización de RNAm proTRH, -proTRH y cuerpos celulares TRHérgicos en el Sistema Nervioso central de la rata.

Regiones	RNAm	proTRH	TRH	
	a	b	c	d
<u>Telencéfalo</u>				
Capas glomerular y plexiforme				
bulbo olfatorio	+	+	+	+
Núcleo olfatorio anterior	-	+	+	+
Banda diagonal de Broca	+	+	+	+
Septum lateral y medio	+	+	+	+
N. base comisura anterior	+	+	+	+
N. base stria terminalis	+	+	+	+
Estriado	+	+	-	+
Amígdala	+	+	+	-
Hipocampo	-	+	+	-
Corteza	-	+	+	-
<u>Diencéfalo</u>				
Area preóptica	+	+	+	+
Area dimórfica sexual	+	+	+	+
Hipotálamo basolateral	+	+	+	+
Núcleo paraventricular	+	+	+	+
Núcleo dorsomedial	+	+	+	+
Núcleo arcuato	+	+	+	+
Núcleo supraóptico	+	*	+	-
Núcleo supraquiasmático	+	-	-	-
Núcleo ventromedial	+	-	-	-
Núcleo talámico posterior	-	-	+	+
Núcleo reticular del tálamo	+	+	+	+
Núcleo medial del tálamo	-	-	+	+

Tabla 1 continuación

Mesencéfalo

M. gris periacueductal	+	+	+	+
Rafé magnus	+	+	+	+
Substancia nigra	-	+ *	-	-

Mielencéfalo

Núcleos de rafé: magnus obscurus, pallidus.	+	+	+	+
Núcleo coclear	-	+ *	+	-
Núcleo reticular lateral	-	+ *	+	+
Núcleo cuneado externo	-	+ *	+	-
Núcleo dorsal del vago	+	+ *	-	-

Modificado de Merchenthaler y cols., 1989. Datos basados en :

a: RNAm proTRH (Segerson y cols., 1989).

b: proTRH-IR 29K (Lechan y cols., 1986).

c: proTRH-IR 39-52K (Merchenthaler y cols., 1989).

d: TRH-IR (Merchenthaler, 1988).

*: IR péptidos derivados de proTRH (Lechan y Segerson, 1989)

En resumen, el conjunto de estos resultados sugiere la existencia de diferentes patrones de procesamiento del precursor a TRH en las distintas regiones del SNC de la rata, lo cual podría depender del tipo de enzimas presentes dentro de las neuronas, o bien de señales específicas contenidas en la estructura del precursor, posiblemente glicosilaciones, ya que la secuencia del mismo contiene varios sitios potenciales de adición de azúcares complejos (Lechan y cols., 1986a). Asimismo la presencia de RNAm proTRH en regiones en las que no se ha determinado la presencia de TRH, pero que contienen péptidos derivados de la secuencia del proTRH, apoya la posibilidad de que en estas áreas las neuronas procesen al precursor a péptidos diferentes al TRH o bien a formas extendidas de este (Segerson y cols., 1987a, Lechan y Segerson, 1989; Wu, 1989). De esta manera el precursor para TRH podría dar origen a un gran número de péptidos biológicamente activos, de manera similar a lo que se ha descrito ocurre para la proopiomelanocortina (POMC), la proencefalina o las protaquininas.

Características del gene para TRH

El gene de TRH se ha aislado, a partir de 2 bancos genómicos de la rata (Lee y cols., 1988). El análisis de su estructura muestra varios aspectos importantes:

- a) Existe solo una copia del gene en el genoma de la rata
- b) En diversas regiones del cerebro como el hipotálamo, tálamo basal, bulbo olfatorio y tallo cerebral, el sitio de iniciación de la transcripción del RNAm es el mismo.
- c) El gene tiene un tamaño de 2.6 kilobases en donde se localizan 3 exones y 2 intrones intermedios, siendo en el tercer exón en donde se encuentran las 5 copias potenciales del TRH. La organización estructural del gene es similar a la que muestran los correspondientes a POMC (Cochet y cols., 1980), proencefalina A (Noda y cols., 1982) y proencefalina B (Horikawa y cols., 1983) y diferente a lo observado en muchos otros genes a neuropéptidos (pre-pro -VIP, -glucagon, -taquinina, -calcitonina/CGRP), en los cuales existen intrones entre las secuencias que codifican a los péptidos.
- d) La región 5' del gene de TRH presenta elementos reguladores y promotores presentes en otros genes eucariontes. Entre estos se encuentran la presencia de una secuencia TATA (28 bases previas al sitio de iniciación), la presencia de una secuencia idéntica a la secuencia consenso propuesta para la unión al receptor a glucocorticoides (-196bp -203), así como un área rica en nucleótidos de guanina y citosina (GC box) característica de la región de unión al factor de transcripción Sp-1. Existe además dentro de la secuencia del gene de TRH, una porción de 10 pares de bases muy similar a la reportada para el gene que codifica a la subunidad β de TSH y dentro de la cual las primeras 5 bases son homólogas a la porción del receptor a hormonas tiroideas (c-erbA placentario), la cual podría ser responsiva o sujeta a regulación por parte de las hormonas tiroideas.

La expresión en la línea tumoral CA77 de genes quiméricos que consisten de la región 5' flanqueadora (promotora) del gene de TRH fusionada al gene bacteriano de cloranfenicol muestra que las secuencias importantes para la expresión célula-específica del gene se localizan en una zona comprendida entre las bases -113 a -50 anteriores al sitio de iniciación (Lee y cols., 1989).

Liberación de TRH.

Debido al papel fisiológico que el péptido posee en la secreción de TSH y PRL en la hipófisis anterior, se ha estudiado a la liberación de TRH preferentemente en el hipotálamo, utilizando diversas preparaciones in vitro como fragmentos o rebanadas de tejido (Charli y cols., 1978; Joseph-Bravo y cols., 1979; Maeda y Frohman, 1980; Warberg, 1982; Méndez y cols., 1987; Iriuchijima y Wilber, 1987), terminales nerviosas aisladas (Warberg, 1977; Bennett y cols., 1975; Joseph-Bravo y cols., 1979) y células en cultivo (Loudes y cols., 1983; Lewis y cols., 1987b; Faivre-Bauman y cols., 1986, 1988). Mediante estos estudios se ha demostrado que la liberación del péptido en el hipotálamo ocurre tanto en respuesta a diversos estímulos depolarizantes como el alto potasio, la veratridina y la ouabaina (Charli y cols., 1978; Joseph-Bravo y cols., 1979; Maeda y Frohman, 1980; Warberg, 1982; Méndez y cols., 1987; Iriuchijima y Wilber, 1987), como a la acción de ciertos neurotransmisores como la histamina y la dopamina (Joseph-Bravo y cols., 1979; Chen y Ramirez, 1981; Biggins y cols., 1983; Lewis y cols., 1987a), efecto que depende estrictamente de la presencia de calcio en el medio de incubación (Joseph-Bravo y cols., 1979; Maeda y Frohman, 1980; Méndez y cols., 1987; Iriuchijima y Wilber, 1987). En el laboratorio se ha analizado la liberación de TRH in vitro de diferentes áreas del cerebro de la rata (Méndez y cols. 1987). Los resultados muestran que existe una gran variabilidad en la liberación basal entre las diferentes regiones estudiadas (p.ej. del 1% en 10 minutos del contenido presente en la eminencia media o en el área preóptica vs. 20% en el bulbo olfatorio). Además, solo ciertas áreas responden al estímulo depolarizante y entre ellas la respuesta también es muy variable (del 1 al 6% del contenido en 10 min). Estos resultados sugieren la posible existencia de diversas pozas de péptido liberable: una que corresponde a una liberación inmediata y otra posiblemente de reserva, las cuales podrían estar en diferente proporción en las distintas regiones estudiadas. Una segunda posibilidad podría ser que en algunas regiones la liberación del péptido no correspondiera a la zona de las terminales nerviosas sino a la de los cuerpos celulares, estando por lo tanto sujetas a mecanismos de control de la secreción diferentes (Mason y cols., 1986).

La secreción de TRH de la eminencia media in vivo es de tipo pulsátil y se ve aumentada en respuesta a una exposición del animal al frío (Arancibia y cols., 1983) y por efecto de la succión de las glándulas mamarias en ratas lactantes (Fink y cols., 1983). La liberación de TRH del hipotálamo mediobasal es controlada por efecto de otras moléculas neurotransmisoras (Vogt y cols., 1987). Por ejemplo la liberación de TRH in vitro es estimulada por acción de la histamina (Joseph-Bravo y cols., 1979; Charli y cols., 1978; Bennett y Keeling, 1981) a través de receptores H_2 , lo cual concuerda con la existencia de terminales nerviosas histaminérgicas en la eminencia media (Browstein y cols. 1974). Sin embargo no se han reportados efectos de la histamina in vivo (Tuomisto y Manisto, 1985). Por el contrario la noradrenalina que en el hipotálamo medio basal no estimula la liberación in vitro de TRH (Joseph-Bravo y cols., 1979), ejerce in vivo un efecto estimulador característico (Tuomisto y Manisto, 1985). Dado que existen terminales noradrenérgicas que se encuentran inervando cuerpos celulares de neuronas TRHérgicas en el PVN, es posible que el efecto estimulador noradrenérgico in vivo sea mediado a nivel del soma celular, lo cual podría relacionarse a su vez con la participación de la noradrenalina en el mantenimiento de la liberación basal de TRH y de la liberación estimulada por frío.

El control inhibitorio de la secreción de TRH hipotalámico podría estar mediado por intermedio de la dopamina, la cual inhibe la liberación in vitro de TRH del hipotálamo mediobasal (Joseph-Bravo y cols., 1979), efecto que se relaciona probablemente con la disminución de los niveles de TSH circulante observada in vivo. Otros grupos han observado por el contrario acciones estimuladoras de este neurotransmisor (Bennett y cols., 1975; Schaeffer y cols., 1977, Maeda y Frohman, 1980), mediante la activación de receptores tipo D_2 (Lewis y cols., 1987a). Otros mediadores que podrían participar en la regulación de la liberación de TRH incluyen a la somatostatina (Arimura y Schally, 1976; Hirooka y cols., 1978) y a los péptidos opiáceos (Tapia-Arancibia y Astier, 1983; Jordan y cols., 1986), los cuales parecen inhibir su secreción, tanto in vivo, como in vitro.

La administración intraventricular de T_3 suprime la secreción de TSH, efecto que parece deberse a una acción directa de la hormona con el hipotálamo (Iriuchijima y cols., 1986). La liberación de TRH in vitro del hipotálamo de ratas hipotiroideas se encuentra incrementada, en tanto que la del hipotálamo de ratas hipertiroideas se encuentra disminuida (Iriuchijima y cols., 1986; Yamada y cols., 1989), mientras que la liberación de TRH estimulada por ouabaina es inhibida por efecto de la T_3 (Wilber y cols., 1985). Asimismo se observa una disminución en la concentración de TRH de la sangre portal en ratas tratadas con T_4 (Roondeel y cols., 1988). Estos resultados indican un efecto regulador importante de las hormonas tiroideas sobre la liberación de TRH hipotalámico relacionado con su papel hipofisiotrópico.

Inactivación del TRH

Al igual que todas las sustancias neuroactivas, el papel que desempeña el TRH en la transferencia de información en el Sistema Nervioso debe estar asociado a la existencia, en la zona de comunicación celular, de uno (o varios) mecanismo(s) de inactivación de acción rápida y eficiente, que permitan a las células blanco responder a nuevos estímulos. Se desconocen hasta la fecha cuales son estos mecanismos, no solo para el TRH, sino para los neuropéptidos en general.

Mecanismos de inactivación de los neuropéptidos.

El mecanismo de inactivación de las moléculas neurotransmisoras se define como el proceso temporal y espacial de eliminación de la señal biológica del área en donde se localizan los receptores. Tomando en cuenta esta definición se han sugerido varias alternativas posibles para realizar tal tarea, las cuales se discutirán a continuación.

Difusión

Uno de los mecanismos postulados para la inactivación de los péptidos es la difusión o arrastre por solvente, el cual podría funcionar eficientemente en aquellas zonas ampliamente irrigadas por el flujo sanguíneo o bien en contacto con otros fluidos biológicos. Con base en las diferencias temporales existentes entre la duración del efecto electrofisiológico y las características cinéticas de unión a los receptores específicos que presenta en el ganglio simpático de la rana toro un péptido relacionado inmunológicamente con el LHRH (Jan y Jan, 1983), (McKelvy y Blumberg, 1986), se ha propuesto a la difusión como la posible alternativa funcional encargada de inactivar la señal biológica del péptido en esta preparación. Sin embargo no existen evidencias experimentales claras que sugieran que este sea un mecanismo de inactivación generalizado.

Internalización

Este mecanismo conocido también como endocitosis mediada por receptores, y que se refiere al paso al interior celular del complejo péptido-receptor se ha estudiado muy poco en el SNC. En el caso específico del TRH asociado al efecto hipofisiotrópico, existen evidencias inmunocitoquímicas que sugieren la rápida internalización in vivo del TRH exógeno, por parte de tirotropos y lactotropos (Morel y cols., 1985 a). Experimentos in vitro llevados a cabo en la línea de células GH₃, así como en cultivos primarios adenohipofisarios indican la entrada al interior celular de [³H]TRH (Gourdji y cols., 1973; Brunet y cols., 1974; Laverrière y cols., 1981; May y cols., 1987). En las células hipofisarias la marca se localiza en distintos compartimentos subcelulares como el núcleo, citoplasma, lisosomas y vesículas secretorias que contienen TSH. Resultados similares se observan en el caso del LHRH, el cual parece ser internalizado por los gonadotropos (Morel y cols., 1982; May y cols., 1987). Estas evidencias pudieran ser exclusivas de los péptidos relacionados con el eje hipotálamo-hipófisis, bien hacerse extensivas a otros neuropéptidos o quizá esten relacionadas con los fenómenos de acumulación que se han descrito en el cerebro (ver mas adelante). La existencia de poblaciones adenohipofisarias en las cuales se encuentran presentes de manera simultánea PRL y TRH, sugiere que parte del TRH presente pudiera ser producto de síntesis de novo de las mismas.

Captura

El proceso de captura (transporte activo dependiente de energía y temperatura) es probablemente el principal mecanismo de inactivación de los llamados neurotransmisores clásicos (NT). Existen muchas pruebas experimentales que indican que una vez que los NT se liberan al espacio sináptico, estos son capturados por intermedio de proteínas acarreadoras presentes ya sea en la misma terminal que los liberó, en la terminal postsináptica o bien en las células gliales vecinas.

En el caso de los neuropéptidos existen pocas evidencias experimentales que muestren la existencia de mecanismos similares de captura, ejemplo de ello es la captura del dipéptido carnosina por parte de rebanadas del cerebro de la rata, la cual es dependiente de la presencia de glucosa y oxígeno, y presenta una relación del péptido acumulado en el tejido con respecto al medio extracelular = 22 (Abraham y cols., 1964).

Para el TRH se ha demostrado que es acumulado por rebanadas de cerebelo (Pacheco y cols., 1981), por medio de un proceso de transporte activo dependiente de Na^+ y energía (acumulación de TRH tejido/medio = 5.1). Charli y cols. (1984) mostraron la acumulación de [^3H]TRH en rebanadas de hipotálamo de la rata (acumulación tejido/medio = 1.3), proceso que mostró ser saturable, dependiente de temperatura, sensible a la ausencia de glucosa y a la presencia de inhibidores metabólicos como la ouabaina o el dinitrofenol. Sin embargo, aun cuando la K_m reportada ($1 \mu\text{M}$) se encuentra en un rango apropiado, la V_{max} es muy baja ($0.35 \text{ pmol}/\text{mg proteína}/5 \text{ min}$), lo cual disminuye la probabilidad de que este proceso represente el mecanismo fisiológico principal de inactivación del TRH (Charli y cols., 1984). No se tienen datos respecto al o los tipos celulares en los cuales se acumula al tripéptido, pero ya que no se ha podido observar captura de TRH- ^3H por parte de sinaptosomas obtenidos del cerebro (Parker, 1977; Torres y cols., 1986), es posible este proceso lo lleven a cabo neuronas postsinápticas, células gliales u otras células presentes. Se ha observado la acumulación de fragmentos de las moléculas de la sustancia P (fragmento 1-5) (Nakata, 1981) y de las encefalinas (George y van Loon, 1981; La Bella, 1986), lo cual posiblemente represente un mecanismo secundario accesorio de remoción de los productos de degradación (clearance).

En resumen, las evidencias en conjunto sugieren que de existir el mecanismo de captura de los péptidos este no representa en la mayoría de los casos el mecanismo principal de inactivación de los mismos.

Degradación

El término degradación se refiere a la ruptura del enlace péptidico catalizada por peptidasas o proteasas, efecto que provoca la pérdida de la actividad biológica de un péptido determinado.

La degradación o hidrólisis enzimática de los péptidos activos es el mecanismo de inactivación más estudiado. Esto se debe probablemente a los siguientes argumentos:

- i) la susceptibilidad de los neuropéptidos a ser hidrolizados por acción de diferentes enzimas.
- ii) la descripción en diferentes tejidos (incluyendo el tejido nervioso) y fluidos biológicos (sangre, CFS) de actividades enzimáticas que in vitro son capaces de degradar rápidamente a los péptidos activos o substratos sintéticos.
- iii) la caracterización bioquímica de estas actividades (pH óptimo, dependencia de iones, aminoácidos presentes en el sitio activo, afinidad por ciertos substratos naturales y sintéticos, efecto de inhibidores, etc.)

iv) los estudios llevados a cabo sobre la distribución, localización celular y subcelular de distintas peptidasas, así como aquellos relacionados con su posible papel fisiológico o con los mecanismos hormonales de regulación a los que están sujetas.

Ya que algunas de estas enzimas se localizan en el compartimento celular citoplasmático se ha sugerido un posible papel accesorio de la degradación en el mantenimiento de las pozas intracelulares de péptidos liberables mediado por estas peptidasas solubles (Griffiths y McDermott, 1983; Schwartz, 1983).

Degradación enzimática de TRH

Debido a las características estructurales de la molécula de TRH (extremo amino ciclizado y extremo carboxilo bloqueado por un grupo amida), ésta no se muestra susceptible a la acción de exopeptidasas, en tanto que la presencia de un residuo de prolina interno le confiere resistencia particular a la acción de enzimas hidrolíticas generales. El TRH es resistente a la acción de enzimas tales como la pepsina, la papaina o la termolisina (Biggins, 1979; Burgus y Guillemin, 1970) y solo es hidrolizado inicialmente en dos de sus tres sitios potenciales de corte (Figura 1) por medio de enzimas específicas presentes en el cerebro y otros tejidos y cuyas características se mencionan a continuación:

Degradación de TRH por enzimas presentes en la fracción soluble del cerebro.

PGAI

La piroglutamato aminopeptidasa I (pirrolidonil peptidasa I ; PGAI; E.C. 3.4.19.3), es una peptidasa soluble que provoca la ruptura del enlace pGlu-His de la estructura del TRH, generando el ácido piroglutámico y el metabolito His-ProNH₂ (Figura 1). Descrita originalmente en el protozoo Pseudomonas fluorescens (Doolittle y Armentrout, 1968), se le encuentra presente en bacterias, plantas, animales y tejidos humanos. A la PGAI se le ha clasificado en la categoría de las cistein proteasas (Browne y O'Cuinn, 1983a) o tiol proteasas (Bauer, 1983), ya que exhibe una fuerte dependencia de un medio altamente reducido (requiere de grupos protectores -SH: mercaptoetanol, ditioneol y EDTA), es altamente sensible a la inhibición de reactivos que afectan los grupos SH (iodoacetamida, N-etilmaleimida) y a la presencia de metales pesados como el Hg²⁺). La PGAI rompe los enlaces de una gran variedad de péptidos naturales o sintéticos que poseen un grupo piroglutamil-aminoácido (p.ej. TRH, LHRH, neurotensina, bombensina y pGlu-βNA), a excepción de aquellos que contienen la secuencia pGlu-Pro como en el caso de la eleoisisina (Browne y O'Cuinn, 1983a; Friedman y cols., 1985).

La PGAI se ha purificado de la adenohipófisis de la rata (Bauer y Kleinkauf, 1980) y del cerebro de cobayo (Browne y O'Cuinn, 1983a). La enzima purificada del cobayo, posee un peso molecular aproximado entre 24 a 28 KDa y es activa a pH neutro (Prasad y Peterkofsky, 1976). La PGAI es inhibida reversiblemente por el 5-oxo prolil-prolinal (K_i=26 nM) (Friedman y cols., 1985) y de manera irreversible por el compuesto piroglutamil diazometil cetona (PDMK) (Wilk y cols., 1985) un compuesto dirigido contra el sitio activo de la enzima.

La PGAI se encuentra enriquecida en la fracción soluble y se le considera eminentemente citosólica (Prasad y Peterkofsky, 1976; Bauer, 1983; Garat y cols., 1985; Torres y cols., 1986), aunque también se ha reportado su presencia en la fracción particulada del mismo. En el cerebro de la rata posee una distribución uniforme (Wilk y cols., 1985; Vargas y cols., 1987).

Se ha demostrado que la PGAI es regulada positivamente en las células GH₃ por el 5-oxoprolilprolinal (Friedman y cols., 1986), el butirato de sodio (Suen y Wilk, 1989a) y por hormonas tiroideas (Suen y Wilk, 1987). La actividad de la enzima en el hipotálamo, bulbo olfatorio, hipocampo y tálamo aumenta in vivo en respuesta a la administración crónica de T₃ (Suen y Wilk, 1989b).

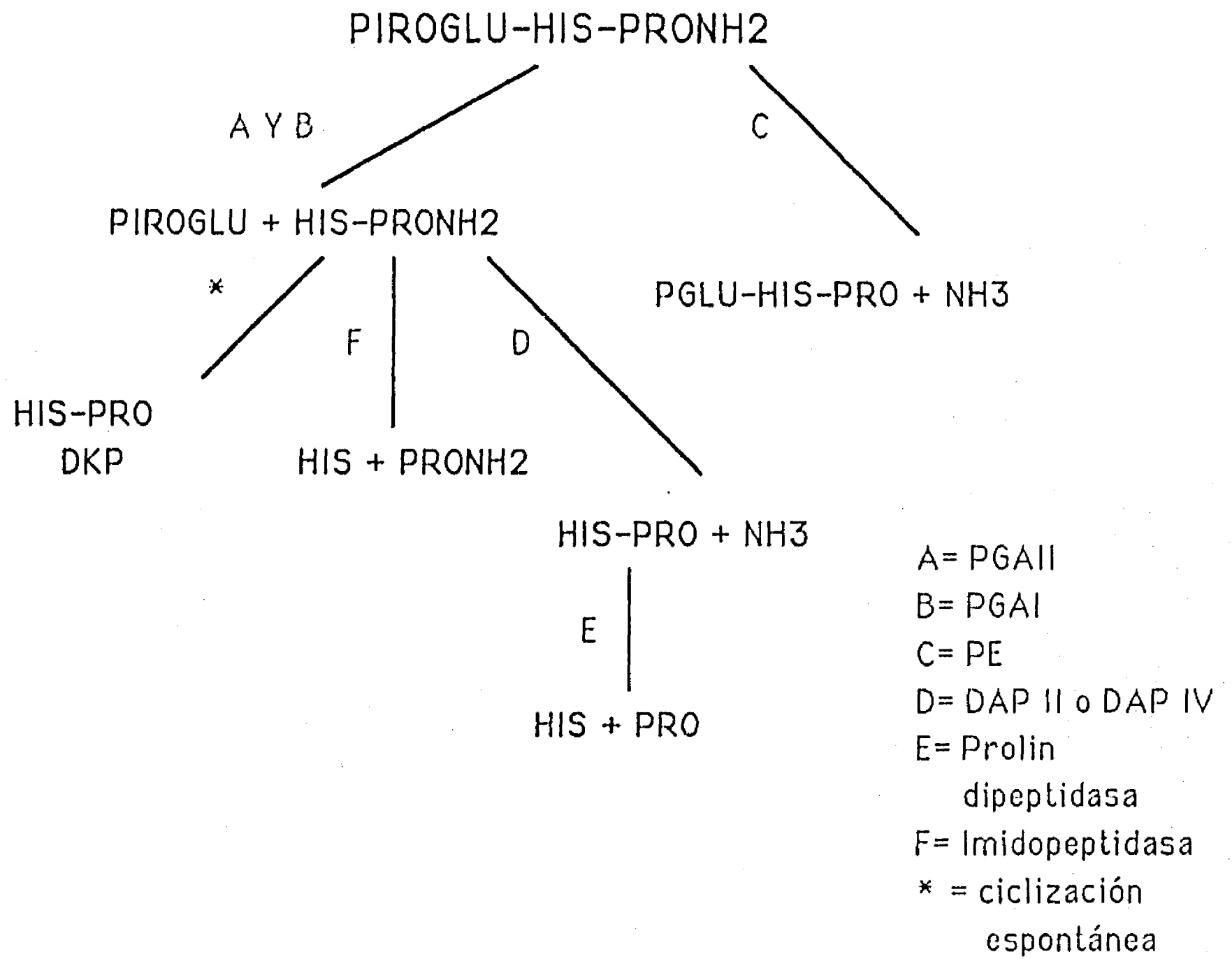
PE

La remoción del grupo amido carboxilo terminal del TRH se lleva a cabo por acción de la prolil endopeptidasa (PE), también conocida como PPCE (post-proline cleaving enzyme; E.C. 3.24.21.26). (Figura 1). Originalmente se pensó que la desamidación del péptido se llevaba a cabo por efecto de una enzima específica (TRH deamidasa) (Prasad y Peterkofsky, 1976; Rupnow y cols., 1979b). Sin embargo, al ser purificada del cerebro de bovino, se demostró que es una enzima no específica capaz de hidrolizar otros neuropéptidos en el enlace Pro-X dentro de la secuencia Y-Pro-X (donde Y = péptido, X = péptido, aminoacilamina o amida). La PE rompe no solo sobre el lado carboxilo del residuo de prolina del LHRH, angiotensina o sustancia P, sino también los extremos carboxilo de los 2 residuos internos de prolina que se localizan en las secuencias de la neurotensina y bradiquinina (Wilk y Orłowski, 1982). La enzima fue descrita originalmente en el útero humano (Walter y cols., 1971), como una enzima capaz de degradar oxitocina y vasopresina (Koida y Walter, 1975). Posteriormente se ha reportado su presencia en el cerebro de la rata (Rupnow y cols., 1979b), del conejo (Orłowski y cols., 1979) y del bovino (Hersh, 1981; Tate, 1981). La PE es una serina proteasa (Yoshimoto y cols., 1977) ya que contiene un grupo sulfhidrilo cuya integridad se requiere para la máxima expresión de la misma (Wilk, 1983), por lo que compuestos como el diisopropil fluorofosfato (DFP) y la N-etil maleimida (NEM) son capaces de afectar su actividad. La actividad de la PE disminuye por acción de la bacitracina (Brown y O'Cuinn, 1983a) y es inhibida de manera potente tanto in vivo como in vitro, por el aldehído peptídico N-benziloxycarbonil prolil prolinal (ZPP) (Wilk y Orłowski 1983; Friedman y cols., 1984). El peso molecular estimado fluctúa entre los 70-75 KDa (Wilk, 1983) y mantiene una actividad máxima a pH neutro o ligeramente alcalino. Estudios sobre su distribución subcelular en el cerebro de la rata y el cobayo indican que es una peptidasa predominantemente citosólica (Griffiths y cols., 1982; Brown y O'Cuinn, 1983a). En el cerebro de la rata menos del 10% de la actividad detectada se encuentra presente en la fracción soluble obtenida en terminales nerviosas (Torres y cols., 1986), aunque en el cerebro del conejo existe una porción substancial de esta (= 35%) en la fracción mitocondrial (Dresdner y cols., 1982). La PE se encuentra presente en numerosos tejidos de mamíferos, además del cerebro, en donde su distribución parece ser homogénea (Wilk, 1983).

Se ha purificado un inhibidor endógeno de la PE presente en la fracción soluble del cerebro de la rata (Soeda y cols., 1985), cuya actividad inhibitoria es bloqueada por distintas poliaminas como la espermina y espermidina (Soeda y cols., 1986). Se desconoce cual es la relevancia de esta molécula en la función de la peptidasa.

FIG. 1

VIAS DE DEGRADACION ENZIMATICA DEL TRH



Degradación de TRH por enzimas presentes en la fracción particulada

PGAlI

Existe una piroglutamil peptidasa asociada a la fracción membranal obtenida del cerebro de diversas especies como el cobayo, la rata y el conejo (Browne y cols., 1981; O'Connor y O'Cuinn, 1984; Garat y cols., 1985; Friedman y Wilk, 1986; Wilk y Wilk, 1989a). La enzima particulada, a diferencia de la actividad soluble PGA I antes descrita, no es afectada por reactivos que alteran los grupos sulfhidrilos, pero en cambio es fuertemente inhibida por agentes quelantes de cationes divalente como el EDTA, la 1-10 fenantrolina y la 8 hidroxiquinolina (O'Connor y O'Cuinn 1984; Wilk y Wilk, 1989a), por lo que se le clasifica como una metaloproteasa (McDonald y Barrett, 1986). La piroglutamato aminopeptidasa II (E.C.3.4.19-) (para diferenciarla de la PGA I soluble) se encuentra enriquecida en la fracción membranal sinaptosomal del cerebro del cobayo y de la rata (O'Connor y O'Cuinn, 1984; Torres y cols., 1986; Friedman y Wilk, 1986). La enzima se ha solubilizado de la fracción sinaptosomal del cerebro del cobayo por tratamiento con papaina (O'Connor y O'Cuinn, 1985) y de la fracción particulada obtenida de un homogenado del cerebro de conejo por tratamiento con tripsina (Wilk y Wilk, 1989b). En ambos casos el peso molecular determinado de la enzima purificada es de 230,000. La PGA II muestra una actividad máxima a pH neutro (O'Connor y O'Cuinn, 1985) o ligeramente alcalino (Wilk y Wilk, 1989b).

Los estudios sobre su especificidad muestran que esta peptidasa remueve el residuo piroglutamil únicamente del TRH (pGlu-His-Pro-NH₂) o de péptidos con estructura muy similar : TRH-OH (pGlu-His-Pro), TRH-Gly (pGlu-His-Pro-Gly), fragmento 1-3 de LHRH (pGlu-His-Trp); en tanto no hidroliza al pGlu-His-Pro-GlyNH₂ o al pGlu-His-Pro-Gly (O'Connor y O'Cuinn, 1985; Elmore y cols., 1990). Asimismo es capaz de hidrolizar naftilamidas de tripéptidos sintéticos que contienen la secuencia pGlu-His (p.e. pGlu-His-Pro-β naftilamida) (Wilk y Wilk, 1989a). Se han sintetizado análogos del TRH resistentes a la degradación por PGA II que presentan residuos de pGlu o His modificados (Wilk, 1989). La sustitución del anillo pGlu por Glu o de la His por Phe o N-Val abolen la capacidad del péptido para ser hidrolizado. Estas observaciones indican que existe un requerimiento absoluto de la secuencia pGlu-His para permitir que la PGAlI pueda hidrolizar a los péptidos. El decapeptido LHRH el cual posee también la secuencia pGlu-His no es hidrolizado por la PGAlI, sin embargo se comporta como un inhibidor competitivo potente de la hidrólisis del TRH (K_i LHRH = 20 μM vs. K_i TRH = 42 μM) (O'Connor y O'Cuinn, 1985).

De esta manera la especificidad de la enzima se encuentra restringida a tripéptidos, tripéptidos amidados y tetrapéptidos que contienen la secuencia pGlu-His.

Los estudios sobre el sitio activo de la enzima indican que en el mismo se localizan residuos esenciales de histidina, tirosina y triptofano (O'Connor y O'Cuinn, 1987).

El cerebro posee la actividad específica más alta de la PGA II, seguida por la retina, el pulmón y el suero (tiroliberinasa), mientras que órganos como el bazo, el corazón y el músculo esquelético no presentan actividad (Friedman y Wilk, 1986). Estudios recientes han demostrado la existencia de PGA II en la línea tumoral de retinoblastoma humano Y-79 (Wilk y cols., 1988), así como en membranas obtenidas del hígado de la rata (Scharfmann y cols., 1989), un órgano que inicialmente se había descrito que carecía de esta actividad. La distribución regional de la PGAlI en el cerebro es heterogénea siendo el bulbo olfatorio y la corteza cerebral las áreas en donde se detectan las actividades más altas (Friedman y Wilk, 1986; Vargas y cols., 1987) (Tabla 2).

TABLA 2

Actividad de PGA II en diferentes regiones del cerebro y la hipófisis de la rata.

	a	b
Bulbo olfatorio	15.7 ± 3.3	
Hipocampo	14.0 ± 2.7	6.5 ± 1.3
Núcleo accumbens-septum	10.7 ± 1.7	
Corteza cerebral	8.5 ± 0.7	*6.8 ± 0.9
Hipotálamo	8.1 ± 1.3	2.8 ± 0.3
Tálamo		2.9 ± 0.5
Corteza cerebelar		*2.9 ± 0.5
Neurohipófisis	3.2 ± 0.3	
Estriado		1.4 ± 0.1
Tallo cerebral		0.6 ± 0.2
Médula oblongada	2.2 ± 0.6	
Adenohipófisis	1.9 ± 0.4	0.2 ± 0.2
Puente	1.7 ± 0.2	
Médula espinal	1.5	

* estructura completa

Actividad expresada en

a: pmolas His-Pro-NH₂ /h/ mg prot, modificado de Vargas y cols., 1987.

b: nmolas βNA /h/ mg prot, Wilk y cols., 1986.

La PGAll muestra una similitud muy marcada con la enzima presente en suero conocida como tiroiberinasa (Taylor y Dixon, 1978; Bauer y Novak, 1979). Esta enzima sérica rompe el enlace piroglutamil del TRH o de péptidos muy similares, posee un peso molecular muy parecido al reportado para la PGA II (260,00), es inhibida de manera competitiva por la molécula de LHRH y muestra sensibilidad por agentes quelantes, pero no por compuestos que reaccionan con grupos -SH. Todas estas similitudes sugieren que la PGAll y la tiroiberinasa son en realidad la misma enzima.

Dada la importancia que la degradación extracelular del TRH podría tener en el efecto hipofisiotrófico del mismo, se ha tratado de estudiar la regulación que ejercen las hormonas tiroideas sobre la actividad de la PGAll y la tiroiberinasa en la adenohipófisis y el hipotálamo. Así, se ha observado que la actividad de la enzima sérica es influenciada por el estado tiroideo de los animales: disminuye cuando los animales son tratados con el agente goitrogénico PTU (propiltiouracil) o se incrementa en una forma dependiente de la dosis después de la inyección de hormonas tiroideas (Bauer, 1986; Emerson y Wu, 1987; Ponce y cols., 1988; Suen y Wilk, 1989b). La PGAll presente en las membranas de las células adenohipofisarias es controlada de manera similar (Bauer, 1987b; Ponce y cols., 1988; Suen y Wilk, 1989b), sugiriendo que la enzima membranal podría funcionar como un elemento de control regulatorio que influye sobre el grado de potencia y duración de las actividades endócrinas del TRH, mientras que la enzima sérica podría actuar sobre el TRH liberado a la sangre portal y por consiguiente sobre la disminución de la liberación de TSH que se ha observado en estas condiciones.

Ni en el cerebro completo (Emerson y Wu, 1987; Ponce y cols., 1988; Bauer, 1988), ni en células nerviosas en cultivo (Bauer, 1988; Redondo y cols., resultados no publicados) se observan cambios aparente en la actividad la PGAll por efecto del estado tiroideo. En contraste en el animal intacto el hipertiroidismo produce un incremento notable de la actividad de la PGAll en la corteza frontal, en tanto que en el tallo cerebral disminuye de manera significativa (Suen y Wilk, 1989b). Se desconoce el posible significado fisiológico de esta regulación en estas áreas cerebrales.

Cabe señalar que existen diferencias importantes en la actividad de la PGAll adenohipofisaria relacionadas con el sexo de los animales, las cuales están probablemente asociadas a eventos hormonales. La actividad presente en las ratas hembras (la cual es alrededor de un 75% menor que la de los machos) aumenta enormemente (300%) como resultado de la ovariectomía de los animales, efecto que es revertido al aplicarse estrógenos (Bauer, 1988). Estos efectos hormonales no se observan sin embargo a nivel de la enzima cerebral.

La exposición de las células de retinoblastoma Y-79 con ésteres de forbol provoca la inactivación de la PGAll (Suen y Wilk, 1990,1991), proceso que consta de dos fases: la primera que corresponde a una disminución rápida y profunda de la actividad enzimática, la cual es revertida espontáneamente en el lapso de una hora, mediada a través de la fosforilación de la enzima como resultado de la activación de la PKC (Suen y Wilk, 1990) y una segunda etapa con un curso temporal de inactivación-activación mucho más lento, la cual está relacionada la inhibición de la síntesis de novo de la enzima (Suen y Wilk, 1991).

CAPITULO II

CULTIVO CELULAR

Antecedentes

El interés central del laboratorio de Neuroendocrinología Molecular es el estudio del funcionamiento de las neuronas productoras de TRH (neuronas TRHérgicas), en particular de los eventos moleculares relacionados con la biosíntesis, liberación e inactivación del péptido, así como de los mecanismos involucrados en su regulación.

Para poder llevar a cabo el análisis experimental de estos eventos se consideró ventajoso utilizar cultivos primarios de células disociadas derivados de tejido nervioso, ya que representan sistemas relativamente simples de estudio de los procesos bioquímicos y moleculares que se llevan a cabo en las células nerviosas. El desarrollo en nuestro laboratorio de este tipo de cultivos a partir de tejido nervioso fetal del ratón ha sido el resultado del esfuerzo continuo durante los últimos años de diversos individuos. De particular importancia para nuestros objetivos fueron los trabajos realizados en este sentido por J.L. Redondo y C. Guerra (tesis de Licenciatura), los cuales sirvieron como el marco de referencia experimental a partir del cual se iniciaron nuestras investigaciones.

Los aspectos analizados en dichos trabajos fueron en esencia los siguientes:

a) La optimización de diversas condiciones experimentales necesarias para el mantenimiento de las células en cultivo tales como la edad fetal escogida, el método de dispersión adecuado, la densidad de siembra óptima, la frecuencia del cambio del medio de cultivo, la proporción de suero utilizada, el efecto de la inhibición de la proliferación glial, etc.

b) El efecto que estas condiciones experimentales ejercen sobre distintos parámetros relacionados con la funcionalidad de las células en cultivo en general (como la cantidad de proteína y DNA presentes o el desarrollo morfológico) o particulares de las neuronas peptidérgicas (presencia en los cultivos de distintos neuropéptidos como TRH, somatostatina y LHRH, detectada por radioinmunoensayos específicos).

Ya que la base de nuestro trabajo experimental posterior dependía de la utilización de este sistema celular in vitro, fue necesario como primera etapa optimizar ciertos parámetros del protocolo de cultivo previamente establecido, de manera tal que fuese posible obtener preparaciones más estables y reproducibles.

En esta sección se muestran los métodos empleados y los resultados obtenidos referentes a las propiedades anatómicas - funcionales de los cultivos primarios de células nerviosas obtenidos del hipotálamo y corteza cerebral del ratón. Este tipo de cultivos nos permitieron analizar no solo diversos aspectos relacionados tanto con la diferenciación, desarrollo y metabolismo in vitro de las neuronas en general, como de la regulación de la expresión de las funciones desempeñadas por las neuronas TRHérgicas, sino también sirvieron como modelos celulares del estudio del metabolismo degradativo intra y extra celular del TRH.

Importancia de los sistemas de cultivo en el estudio del metabolismo de las neuronas peptidérgicas

Un problema fundamental en la Neurobiología es la elucidación de los mecanismos celulares y moleculares bajo los cuales se sustentan el establecimiento, crecimiento, desarrollo, diferenciación y funcionamiento de las células nerviosas. La complejidad de la organización anatómica del Sistema Nervioso, la heterogeneidad de los fenotipos celulares presentes y sus múltiples interacciones hacen de su estudio una tarea excesivamente compleja. La posibilidad de llevar a cabo investigaciones sobre estos aspectos en el animal intacto, se ve obstaculizada por el hecho de que cada uno de estos procesos requiere la participación concertada en el tiempo y en el espacio de una gran diversidad de factores (la mayoría de ellos poca o nulamente definidos), lo cual dificulta tanto el desarrollo de un diseño experimental adecuado, como la interpretación de los resultados obtenidos de tales estudios *in vivo*. Se ha hecho necesario así, como una primera aproximación, el tratar de diseccionar en sus detalles más íntimos los elementos que conforman los sistemas.

Una alternativa para tratar de abordar estos problemas es el uso de métodos *in vitro* que permitan analizar componentes discretos del Sistema Nervioso en condiciones experimentales controladas.

Un ejemplo de esto lo representan las preparaciones obtenidas de terminaciones nerviosas aisladas (sinaptosomas) o de rebanadas de tejido nervioso las cuales se han utilizado por ejemplo en el estudio de los mecanismos que controlan la liberación de una amplia gama de neurotransmisores. Sin embargo debido a la pérdida progresiva de la integridad celular a lo largo del tiempo, este tipo de preparaciones presentan limitaciones importantes cuando se pretende estudiar a largo plazo este u otros aspectos del metabolismo neuronal. En el Sistema Nervioso de algunos vertebrados se han realizado avances importantes en la comprensión de la función de los péptidos, debido a los estudios realizados en preparaciones celulares que poseen una circuiteria sináptica relativamente sencilla, como las obtenidas de los ganglios pre y para vertebral simpáticos del sapo (Jan y cols., 1970; Jan y Jan, 1983) y del cobayo (Konishi y cols., 1980; Dun y Minota, 1981), en los cuales se ha demostrado que péptidos como el LHRH (o un péptido relacionado a este) y la sustancia P respectivamente, parecen cumplir con los requisitos necesarios para ser considerados como los neurotransmisores responsables de los potenciales postsinápticos excitatorios lentos que se registran en estos ganglios periféricos. Sin embargo para la gran mayoría de los péptidos activos caracterizados en el Sistema Nervioso de los vertebrados no es posible por el momento, definir de manera precisa el papel fisiológico que desempeñan.

Desde esta perspectiva la utilización de los sistemas de cultivo celular ofrecen varias ventajas en el estudio de la función de las células nerviosas y de las neuronas peptidérgicas en particular. La posibilidad de acceder e identificar fácilmente a las células de áreas del cerebro, que por su localización anatómica y por su complejidad estructural, se encuentran severamente restringidas al análisis *in vivo*, así como la oportunidad de mantener bajo condiciones controladas y por periodos de tiempo prolongados a las células intactas hacen de esta técnica *in vitro* un excelente modelo de estudio a nivel celular de una amplia gama de aspectos claves en la Neurobiología tales como la sobrevivencia, el crecimiento, la proliferación y/o diferenciación de las células nerviosas. Asimismo permite examinar la regulación de los distintos mecanismos bioquímicos y moleculares relacionados con la producción, almacenamiento, liberación y mecanismos de inactivación de las distintas moléculas que intervienen en los mecanismos de comunicación celular (e.g neurotransmisores, neuropéptidos, hormonas).

Expresión de funciones neuronales en cultivo

Se han desarrollado diferentes sistemas de cultivos a partir de la disociación celular de tejido nervioso obtenido tanto de regiones generales del Sistema Nervioso, como de zonas o áreas específicas, los cuales se han caracterizado en sus propiedades anatómicas, bioquímicas y fisiológicas: cerebro completo: (Booher y Sensenbrenner, 1972, Sotelo y cols., 1980); médula espinal: (Fishbach y Dichter, 1974; Ramson y cols., 1977); cerebelo: (Trenkner y Sidman, 1977; Messer, 1977); ganglios periféricos: (Varon y Rainborn, 1972; Mains y Patterson, 1973); corteza cerebral: (Dichter, 1978; Robbins y cols., 1982); corteza visual: (Huettner y Baughman, 1986); bulbo olfatorio: (Currie y Dutton, 1980); hipotálamo: (Wilkinson y cols., 1974; Benda y cols., 1975); estriado: (Bockaert y cols., 1986; Villijn y cols., 1988); hipocampo: (Furshpan y Potter, 1989; Khaspekov y cols., 1989).

En este tipo de cultivos se llevan a cabo diversos eventos del desarrollo, tales como la proliferación y diferenciación celular (Huettner y Vaughman, 1986), la sinaptogénesis (Benda y cols., 1975; Fukatsu y cols., 1983; Legendre y cols., 1988) y la mielinización (Yavin y Yavin, 1977; Wood y Williams, 1984; Walker y cols., 1985), los cuales en muchos casos siguen cursos temporales muy similares a los que se dan in vivo.

Las células en cultivo expresan muchas de las propiedades bioquímicas y moleculares del tejido nervioso, ejemplos de esto son: la expresión de propiedades electrofisiológicas características (potenciales de acción espontáneos y evocados, (Dichter, 1978; Masuko y cols., 1986; Legendre y cols., 1988; Leng y cols., 1990); de canales iónicos (Wang y cols., 1989; Dichter y Zona, 1989; Yarowski y Krueger, 1989); la presencia de receptores a diversos neurotransmisores (receptores a GABA: Snodgrass y cols., 1980; receptores α y β adrenérgicos: Baker y cols., 1986; Feldstein y cols., 1986; receptores a opiáceos: Jia y Nelson, 1987; receptores a glutamato: Huettner y Vaughman, 1986); la expresión de mecanismos de síntesis, captura y liberación de diversos neurotransmisores (AChE y ChAT: Sensenbrenner, 1976; ChAT y TH: Puymirat y cols., 1982; GAD: Snodgrass y cols., 1980; Neale y cols., 1983; Yu y cols., 1984; Alho y cols., 1988; Mangoura y Vernardakis, 1988); transformación de Trp a 5-HT: Sah y Matsumoto, 1987; Becquet y cols., 1990); la demostración inmunocitoquímica de células que contienen diversos neurotransmisores (GABA: Shalaby y cols., 1987; Mangoura y Vernardakis, 1988; 5-HT: Sah y Matsumoto, 1987; NA: Masuko y cols., 1986); la expresión de genes específicos (Villijn y cols., 1988; Kumar y cols., 1988).

En cultivos iniciados a partir de tejido nervioso fetal y perinatal de la rata y el ratón se han detectado mediante radioinmunoensayos específicos diversos péptidos descritos el Sistema Nervioso y en tejidos endócrinos: TRH, (Tixier-Vidal y cols., 1978; Glembotski y cols., 1986); somatostatina, (Delfs y cols., 1980); LHRH, vasopresina, β endorfina y ACTH (Denizaeu y cols., 1981; Lolait y cols., 1983); Substancia P y neurotensina, (Vaccaro y cols., 1980). Por métodos inmunocitoquímicos se ha demostrado la existencia de neuronas peptidérgicas para el TRH, (Faivre-Bauman y cols., 1980); somatostatina (Delfs y cols., 1980, 1984; Gamse y cols., 1980; Jordan y Thomas, 1987); LHRH, (Knigge y cols., 1977; Jirikowski y cols., 1981); ACTH y β endorfina (Liotta y cols., 1980; Lolait y cols., 1983); β Lipotropina (Kim, 1980); Substancia P y neurotensina (Vaccaro y cols., 1980); angiotensina I y II (Weyhenmeyer y cols., 1980a; Hermann y cols., 1988); leucin-encefalina, (Weyhenmeyer y cols., 1980b); vasopresina, (Jirikowski y cols., 1980; Theodosis y cols., 1983); neurofisina, (Jirikowski y cols., 1980; Denizaeu y cols., 1981); CCK (Delfs y cols., 1984b); VIP, (Huettner y Baughman, 1986), demostrándose en algunos casos la coexistencia en las mismas células de péptidos con otras moléculas neurotransmisoras (AChE y somatostatina: Delfs y cols., 1984a; NPY, somatostatina ó CCK con GAD: Ahlo y cols., 1988).

Estudios sobre el metabolismo de las neuronas TRHérgicas en cultivo.

Se han utilizado distintos sistemas de cultivo celular en el estudio del metabolismo de las neuronas TRHérgicas. Las investigaciones iniciales en cultivo sobre la biosíntesis y liberación de TRH se realizaron utilizando explantes de hipotálamo (McKelvy, 1974; Yiroda y cols., 1978). Sin embargo, la gran mayoría de los trabajos posteriores se han llevado a cabo en cultivos primarios de células disociadas obtenidos de tejido hipotalámico fetal de la rata y el ratón, los cuales se han caracterizado en sus propiedades anatómico funcionales (Wilkinson y cols., 1974; Benda y cols., 1975; Canick y cols., 1977; Tixier-Vidal y cols., 1978; Vaccaro y cols., 1980; Denizaeu y cols., 1981; Legendre y cols., 1982).

Se ha descrito la presencia de TRH-IR en cultivos primarios hipotalámicos mantenidos en presencia o ausencia de suero (Faivre-Bauman y cols., 1980, 1981; Glentowski y cols., 1986; Lewis y cols., 1987b), así como la existencia de neuronas TRHérgicas en cultivos derivados de hipotálamo y hemisferios cerebrales fetales del ratón (Faivre-Bauman y cols., 1980; Puymirat y cols., 1982), las cuales en los cultivos hipotalámicos representan alrededor del 30% del total de la población neuronal. Este tipo de cultivos primarios liberan TRH-IR tanto de manera basal, como estimulada por agentes depolarizantes como K^+ , veratridina y ouabaina (Loudes y cols., 1983; Faivre-Bauman y cols., 1986; Lewis y cols., 1987b). La liberación de TRH en cultivo depende del influjo de calcio externo, ya que no se observa cuando se omite el Ca^{2+} en el medio de incubación o en presencia de EGTA o Co^{2+} . Sin embargo no es del todo claro el o los tipos de canales de calcio involucrados en esta secreción: por ejemplo, en cultivos crecidos en medio definido la liberación de TRH-IR basal y estimulada por K^+ se incrementa en presencia del compuesto BAY K 8644, un agonista de los canales de calcio sensibles a dihidropiridinas (Loudes y cols., 1988), mientras que en cultivos suplementados con suero la liberación de TRH por efecto del alto K^+ que no se ve afectada por acción de la dihidropiridina nifedipina, es bloqueada por la presencia del verapamil (un antagonista de los canales de calcio dependientes de voltaje sensibles a fenil alquilaminas) (Lewis y cols., 1987b). La liberación del péptido estimulada por veratridina se inhibe por efecto de la trifluoroperazina y la trifluorpromazina, inhibidores de la calmodulina (Lewis y cols., 1987b); en tanto que los ésteres de forbol y en menor grado el diacilglicerol (DG) estimulan la liberación *in vitro* del TRH (Loudes y cols., 1988). Estos resultados sugieren la existencia de dos mecanismos intracelulares diferentes que participan en la secreción del TRH en las células en cultivo: i) mediante la apertura de distintos tipos de canales de calcio sensibles a voltaje y ii) por medio de la activación de la PKC.

De manera independiente se ha demostrado la liberación de TRH-IR en neuronas hipotalámicas mantenidas en un sistema de perfusión de membrana capilar (Scalon y cols., 1983).

La suplementación del medio de cultivo con ascorbato provoca un aumento significativo en el contenido y liberación del TRH-IR liberado (Glentowski y cols., 1986; Faivre-Bauman y cols., 1988; Loudes y cols., 1989), efecto que ocurre como resultado de la estimulación en la actividad de la PAM, permitiendo así la transformación directa del TRH-Gly a TRH (Glentowski y cols., 1986). Mediante experimentos de pulso y caza se ha demostrado la síntesis *de novo* de TRH en células hipotalámicas crecidas en medio definido (Loudes y cols., 1989), el cual a diferencia de la poza endógena de TRH ya presente, es exportado al exterior por medio de un mecanismo de liberación no regulado.

Recientemente se han definido formas de alto peso molecular derivadas del proTRH que coexisten con el péptido maduro en el interior de las neuronas TRHérgicas (Grouselle y cols., 1990). En estas células se presenta un cambio paulatino en la distribución subcelular de los distintos productos durante el desarrollo *in vitro* de los cultivos: mientras que antes y durante la formación de sinapsis al TRH-IR se le encuentra presente en los cuerpos celulares, neuritas cortas y conos de crecimiento, al término de la sinaptogénesis y en etapas posteriores a ella se le localiza únicamente en las varicosidades y botones terminales (Grouselle y cols., 1990), en tanto que los péptidos derivados del proTRH se detectan exclusivamente a nivel del soma neuronal. Estos resultados son similares a lo reportado en el PVN hipotalámico *in situ* (Lechan y cols., 1985) y confirman que el proTRH sufre un procesamiento paulatino asociado a compartimentos subcelulares específicos.

Justificación del uso de cultivos en el estudio de los mecanismos de degradación de TRH

Diferentes sistemas de cultivo primario, así como líneas celulares derivadas de tejidos nervioso, han sido utilizados como modelos celulares de estudio del metabolismo degradativo intra y extra celular de neuropéptidos tales como sustancia P (Hormstemske y cols., 1984), angiotensina II (Allard y cols., 1987) y LHRH (Yokosawa y cols., 1987); permitiendo obtener información relevante sobre la localización celular y subcelular de diversas peptidasas involucradas (Hormstemske y cols., 1983; Koshiya y cols., 1985; Stevens y cols., 1987; Mentlein y cols., 1990).

La ventaja de la utilización en particular de células intactas en cultivo sobre otras preparaciones como los homogenados celulares o las fracciones membranales crudas, reside en la generación de patrones de fragmentación menos complejos de los péptidos, lo cual está relacionado con la participación exclusiva de las enzimas localizadas sobre la cara extracelular de las membranas. Asimismo la posibilidad de mantener a las células en cultivo en presencia de inhibidores específicos de las diferentes enzimas proporciona una herramienta experimental útil que permite diferenciar la participación de las distintas actividades enzimáticas presentes.

METODOS

Protocolo del cultivo

El protocolo básico de obtención de los cultivos de hipotálamo se basó en los trabajos del grupo de Tixier-Vidal (Benda y cols., 1975; Tixier-Vidal y cols., 1978; Tixier-Vidal y de Vitry; 1979; Faivre-Bauman, y cols., 1981) y los de corteza cerebral en el trabajo de Dichter y cols. (Dichter 1978; Snodgrass y cols., 1980).

Cruzas

Se utilizaron ratones adultos de la cepa CD-1 (criados en el bioterio del CILGB) para la realización de las cruzas. A los animales desde su nacimiento se les mantuvo bajo un ciclo de luz-obscuridad de 12 horas, con acceso libre a agua y alimento (Purina Chow).

Para el apareamiento se colocaron en una misma jaula grupos de 2-3 ratones hembras en presencia de un macho, durante toda una noche. La mañana siguiente, considerada como el día cero de gestación, el macho se aisló de las hembras, manteniendo a estas bajo observación durante dos semanas. Se utilizaron en la preparación de los cultivos a las hembras preñadas en el 14o. día de gestación.

Obtención de tejido

A las hembras escogidas se les sacrificó por dislocación cervical, sumergiéndolas inmediatamente en una solución de benzal al 100%. El cuerpo se colocó sobre toallas absorbentes en posición supina y la piel a nivel del abdomen se separó del músculo subyacente, para posteriormente realizar una incisión longitudinal, dejando de esta manera al descubierto la cavidad peritoneal. Se disecó cuidadosamente al útero, el cual fue colocado inmediatamente en una caja de Petri conteniendo PBS estéril pH 7.4, suplementado con glucosa al 0.25% (PBS-glucosa), la cual se le trasladó a una campana de flujo laminar en donde se llevaron a cabo todos los pasos subsecuentes.

Se cortó y separó al músculo uterino, permitiendo de esta manera extraer a los embriones (10-14 fetos por útero) - protegidos aún en su bolsa amniótica y unidos a su placenta a través del cordón umbilical-, estructuras que en lo posible se trató de mantener intactas hasta el momento de llevar a cabo la disección del cerebro fetal. Los fetos se mantuvieron durante este periodo sumergidos en PBS-glucosa a 4°C.

Cada embrión individual se extrajo de su saco amniótico y se colocó sobre su costado izquierdo sobre una tarjeta de papel estéril. La disección de las estructuras cerebrales se llevó a cabo bajo el microscopio estereoscópico de la siguiente manera: Utilizando una hoja pequeña de bisturí y mediante un corte sagital, se separó la tapa craneana del resto del cuerpo. Se disecó cuidadosamente al cerebro completo (librandolo de las meninges y vasos capilares), separando al cerebelo y al tallo cerebral (puente y bulbo). El resto del cerebro se colocó en posición ventral para permitir la disección del hipotálamo, para lo cual se tomaron como marco los siguientes parámetros anatómicos: desde el margen anterior del quiasma óptico hasta la región de los cuerpos mamilares, lateralmente siguiendo los límites del surco lateral y en profundidad 2-3 mm hasta alcanzar el tálamo (Wilkinson y cols., 1974; Tixier-Vidal y cols., 1978). El tejido cortical se obtuvo generalmente de los mismos cerebros, para lo cual se tomó un fragmento de tejido de la región anterior frontal de un tamaño similar al del bloque hipotalámico (aprox. 1 mm³). El tiempo aproximado de la disección de una camada fue de 35-45 minutos.

Todas las estructuras correspondientes a un mismo tejido se reunieron en un tubo Eppendorf estéril que contenía medio DMEM completo (0.1 ml medio/estructura), manteniéndolas a 4°C.

Disociación celular

Una vez reunidos todos los fragmentos se substituyó el medio DMEM por un volumen similar de medio fresco, procediendo entonces a cortar las distintas estructuras en fragmentos mas pequeños, utilizando para ello tijeras de punta fina. A los fragmentos obtenidos se les permitió sedimentar en el fondo del tubo, substituyendo nuevamente el medio por un volumen similar de medio DMEM completo (dispersión mecánica) o bien por solución salina de Hank's (en el caso de la dispersión enzimática).

i) Disociación mecánica

Inicialmente la disociación celular se llevó a cabo mediante un procedimiento mecánico, forzando el tejido suavemente a través de 2 agujas hipodérmicas de diámetro decreciente (1.5 y 1.25 mm de diámetro respectivamente; 10-12 pases por aguja). Concluida esta operación, se permitió sedimentar completamente el tejido no disperso, recogiendo el sobrenadante celular correspondiente. Una vez que se agregó a los tubos un nuevo volumen de medio fresco, se repitió la operación de dispersión con la siguiente aguja.

Los cultivos utilizados en las publicaciones 1 y 2 y algunos mencionados en esta sección, se obtuvieron mediante este procedimiento de disociación.

Bajo estas condiciones se obtuvo para el caso del tejido hipotalámico un rendimiento aproximado de 1×10^6 células viables /estructura, en tanto que la viabilidad celular mostró ser en el mejor de los casos del 65%. Para el caso del tejido cortical cerebral el rendimiento obtenido fue de 1.5×10^5 células viables/estructura con una viabilidad del 67% (Tabla 3).

ii) Disociación mecano-enzimática

Como una alternativa para mejorar el rendimiento celular y/o la viabilidad de la preparación, recurrimos posteriormente al uso de tripsina. En este caso los fragmentos de tejido se incubaron durante 15 min a 37°C, en 1 ml de solución de Hank's que contenía tripsina de páncreas bovino (conc. final 0.0625%) y DNAsa tipo I (conc. final 0.125%), agitando la suspensión frecuentemente. Al término de la incubación, la preparación se colocó sobre hielo, agregando suero fetal bovino (FBS, 100 μ l), con el objeto de inhibir la actividad proteolítica de la tripsina. El sobrenadante se aspiró y desechó, lavando entonces el tejido mediante la substitución repetida de medio Hank's (3 X 1 ml). Las células fueron dispersadas bajo las condiciones descritas anteriormente, utilizando secuencialmente en este caso 2 pipetas Pasteur de diámetro decreciente (cuya punta previamente se había redondeado al fuego; 20 pases/pipeta).¹

Este método mecano-enzimático de dispersión no afectó substancialmente el rendimiento del tejido hipotalámico con respecto al procedimiento mecánico, pero si en cambio la viabilidad de la preparación, la cual se incrementó hasta un 80% (Tabla 3). Como se describirá más adelante estos cultivos hipotalámicos no se diferencian de los obtenidos por el método mecánico en relación a ciertos parámetros bioquímicos (TRH-IR, PGA II, cantidad de proteína membranal detectada etc.), sin embargo la observación al microscopio mostró que el curso temporal de los eventos iniciales de la

¹ En raras ocasiones, los fragmentos se aglutinaron, en cuyo caso se hizo necesario realizar una incubación breve con DNAsa I (2 min, sobre hielo), seguida de un lavado con 1 ml de medio Hank's, antes de llevar a cabo la dispersión mecánica.

diferenciación celular in vitro (como el desarrollo de neuritas y la formación de la capa confluyente de células basales), se llevó a cabo en un periodo de tiempo comparativamente menor (1-2 días) con respecto de los cultivos obtenidos por el método mecánico.

Del mismo modo a lo observado en el caso del tejido hipotalámico, el rendimiento obtenido en el tejido cortical fue muy parecido cualesquiera que haya sido el método de dispersión empleado, en tanto que la viabilidad celular se incrementó substancialmente por efecto de la dispersión enzimática (Tabla 3).

Siembra

Las suspensiones celulares obtenidas se centrifugaron durante 3 minutos a 450 g, descartándose el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió suavemente en 4 ml de medio completo utilizando una pipeta Pasteur. Después de calcular la viabilidad y el rendimiento celular (medida por el método de exclusión del azul Tripano) se ajustó la suspensión con medio completo hasta obtener una relación de 1×10^6 células viables/ml, sembrándose en cajas de Petri de 35 mm de diámetro (9.6 cm²), previamente tratadas con Polilisina y FBS (ver preparación de platos). El medio de cultivo se ajustó al volumen deseado (2ml cajas y pozos de 35mm, 4 ml cajas de 60 mm y 1.0 ml pozos de 16 mm), renovándose cada 3 días, substituyendo la mitad de volumen por medio completo recién preparado (ver efecto de medio condicionado homólogo).

A la mayoría de los cultivos se les añadió el antimitótico citosín arabinósido (cultivos Ara C+; 10 μ M) al 5 DIV durante 24 horas, con el objeto de inhibir la proliferación glial y estimular la sobrevivencia de las células neuronales (ver efecto de citosín arabinósido)

Preparación de los platos de cultivo

Se utilizaron preferentemente cajas de Petri individuales de 35 mm de diámetro, y en algunos casos cajas individuales de 60 mm o charolas con 6 o 24 pozos (Costar). En cualquier caso, el plástico de su superficie se trató por una noche con una solución estéril de poli D-lisina (30 μ g/ml, grado de polimerización 50,000, Sigma). Las cajas o pozos de cultivo se lavaron a término de la incubación con agua tridestilada estéril (2 x 1.5 ml).

Este procedimiento facilita la adhesión inicial de las células nerviosas en cultivo (Yavin y Yavin, 1974). En nuestras manos el uso exclusivo de este polimerización promovió el desarrollo y crecimiento de células hipotalámicas y de corteza cerebral hasta por 2 semanas in vitro, sin embargo se ha reportado su incapacidad para soportar el desarrollo celular en cultivos hipotalámicos crecidos en medio sin suero (Faivre-Bauman y cols, 1984). Es importante señalar que la preincubación con FBS al 10% en DMEM de estas cajas ya tratadas antes de ser utilizadas para la siembra estimuló la adherencia rápida de las células, acelerando con ello la colonización de la superficie y permitiendo de esta manera mejorar la "calidad" de los cultivos determinada por la observación morfológica de los mismos. Un efecto similar se reportó en el caso de cultivos hipotalámicos crecidos en medio sin suero y sembrados en cajas tratadas con gelatina (Puymirat y cols., 1982).

Tabla 3

Rendimiento y viabilidad de células nerviosas en cultivo.
Método de dispersión mecánica vs. mecánico-enzimática.

Tejido	Hipotálamo		Corteza frontal	
	a	b	a	b
Mecánico	65.3 (37)	100 ± 12	66.7 (21)	150 ± 19
Mecánico enzimático	79.8 (37)	108 ± 16	76.2 (14)	155 ± 21

Se disecaron 10-14 hipotálamos o fragmentos de corteza frontal anterior obtenidos de ratones CD-1 en el 14o. día de desarrollo fetal. La dispersión mecánica o mecánico-enzimática del tejido se llevó a cabo en Medio DMEM-suplementado con 10% de FBS como se detalla en Métodos.

La viabilidad celular se determinó por método de exclusión celular de azul tripano.

Los datos representan el promedio ± la desviación media estándar, del número de cultivos individuales indicados entre paréntesis de:

a: % de viabilidad (células vivas/total de células x 100).

b: Total de células viables por estructura (X 10⁵).

ENSAYOS BIOQUIMICOS

Captura de GABA-³H

Se utilizaron cultivos de corteza en el 12 DIV. El día señalado el medio de cultivo se aspiró, lavando las cajas con Ringer-Krebs TRIS (RKT), pH 7.4 (2 x 2 ml).

Las células se incubaron por tiempos definidos con una solución de GABA (0.1 μ Ci GABA ³H, act. esp. 38 Ci/mmola; conc. final GABA: 5×10^{-7} M; en 2 ml de RKT) a 37° C.

Al término de la incubación se aspiró el medio de las cajas, lavandose exhaustivamente con RKT (3 X 2 ml). Las células fueron recuperadas raspando los platos con un gendarme de goma en 1 ml de NaOH 1 M. El extracto se sonicó, separandose una alícuota de 100 μ l para la determinación de proteína por el método de Lowry y cols. (1951). Al volumen restante transferido a un vial se le agregó 10 ml de Tritosol, determinando la marca incorporada a las células por espectrofotometría de centelleo líquido (LSC). En algunos experimentos las células fueron preincubadas durante 5 min en presencia del ácido aminooxiacético (inhibidor irreversible del fosfato de piridoxal, el cofactor de la GAD; AOAA 10^{-3} M), no observandose diferencias notables en los resultados. Las cuentas totales se obtuvieron restando a los puntos experimentales los valores de cps obtenidos de blancos sin tejido tratados idénticamente.

La dependencia de sodio de la captura de GABA se ensayó en las mismas condiciones antes descritas a excepción de la sustitución del NaCl por cloruro de colina isomolar del medio de incubación.

Determinación de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD)

La actividad de GAD se determinó por el método radioquímico descrito por Albers y Brady (1959) y modificado por Tapia y Meza-Ruiz (1976). Las células recuperadas de los platos de cultivo, fueron homogeneizadas en 150 μ l de PBS 50 mM, DTT 1.13 mM, pH 7.0 utilizando un pistón de teflón. El homogenado se centrifugó a 12,000 g durante 15 min, separando el sobrenadante celular. Una alícuota de esta fracción se incubó a 37° C, bajo agitación constante, en una solución conteniendo 0.05 μ Ci de L-glutamato [¹⁴C] (act. esp. 49.6 mCi/mmola), 10 mM de glutamato, fosfato de potasio 50 mM, DTT 1.13 mM, 0.05% Triton X-100 y fosfato de piridoxal (PLP) 0.1 mM, pH 7.0 en un volumen final de 71 μ l. El ¹⁴CO₂ desprendido de la reacción se recuperó en otro tubo conteniendo 250 μ l de hidróxido de hiamina, acoplado al sistema de reacción por medio de una manguera flexible de hule. La reacción se detuvo inyectando a la mezcla de reacción 25 μ l de H₂SO₄. Los tubos fueron incubados 90 min adicionales para permitir la completa absorción del CO₂ liberado. Los contenidos de ambos tubos se colocaron en viales por separado, los cuales contenían 10 ml de Tritosol, determinandose la radioactividad presente por LSC.

Determinación de la conversión de glutámico a GABA

Se homogeneizaron a las células de corteza cerebral en cultivo en PBS 0.2 M, que contenía 10 mM mercaptoetanol y PLP 5 mM. Se incubaron alícuotas de estos homogenados en presencia de 5 μ Ci de DL [U-¹⁴C] Glutámico (act. esp. 250 mCi/mmola, conc. final 10 mM) disuelto en buffer PBS 0.05 pH 7.0, durante tiempos variables a 37° C, bajo agitación continua.

Al término de la incubación se agregaron 150 μ l de etanol absoluto, centrifugando la suspensión 5 min. a 10,000 g a 4° C. El sobrenadante y el sedimento celular fueron separados. El sedimento fue resuspendido nuevamente en un volumen similar de etanol absoluto y mantenido 1 hr a -20° C, para posteriormente ser homogenizado utilizando un pistón de vidrio. El homogenado se centrifugó y los sobrenadantes obtenidos fueron mezclados y evaporados a sequedad.

El producto obtenido se resuspendió en 25 µl de agua bidestilada, aplicándose sobre carriles de papel Whatman 1. Una vez seco el papel se corrieron cromatografías descendentes utilizando fenol recién destilado al 80%, como solvente. Este proceso se repitió nuevamente bajo las mismas condiciones. El papel del cromatograma se cortó a lo largo de la dirección de corrida en segmentos de 1 cm, los cuales fueron colocados en viales con Tritosol, contando la radioactividad presente por LSC. La posición de los distintos aminoácidos se determinó utilizando estándares de Glu, Gln y GABA, tratados en las mismas condiciones experimentales y revelados con ninhidrina.

Inmunocitoquímica

Se utilizó la técnica indirecta de la Avidina Biotina con segundos anticuerpos acoplados a la peróxidasa de rábano (PAP)
(Métodos publicación 2)

Análisis de aminoácidos libres

El contenido de aminoácidos de los cultivos se realizó conforme a la modificación descrita en Geddes y Wood (1984), al método de Lenda y Svenneby (1980).

a) Preparación de las muestras.

Se analizaron cultivos de corteza 12 DIV o de glia >20 DIV, de los cuales se extrajeron a las células en 100 µl de H₂O tridestilada. La suspensión celular se homogenizó en un volumen final de 200 µl de H₂O, utilizando un homogenizador tipo Potter-Elvehem con pistón de teflon. Una alícuota de 50 µl del homogenado se separó para medir proteína (Lowry y cols., 1951) y al resto se le agregó ácido perclórico HClO₄ (conc. final 0.4 N.). La suspensión se centrifugó 5 min a 12,000 rpm, neutralizando el sobrenadante con KOH 10 N. Las muestras se mantuvieron -70 °C hasta el momento de ser analizadas, lo cual ocurrió en el término de las 48 horas siguientes.

b) Análisis de las muestras por HPLC

Las muestras descongeladas se centrifugaron (5 min, 12000 rpm), mezclando 50 µl del sobrenadante (o de estándares apropiados) con un volumen similar de una solución fresca de o-ftalaldehido (1 mg/ml, disuelto en buffer boratos 0.4 M, pH 10.4). La mezcla de reacción se dejó reaccionar durante 3 min a temperatura ambiente, para posteriormente inyectar 50 µl de esta mezcla a un sistema de HPLC (Beckman), compuesto de una columna microsphere de sílica fase reversa C-18 (150 x 4.6 mm). La mezcla de aminoácidos se separó utilizando un gradiente continuo de metanol/acetato de potasio (pH 5.5, 0.1 M) (velocidad de flujo 1.5 ml/min) durante 14 minutos hasta alcanzar el 75% de metanol, manteniendo estas condiciones durante los 5 minutos posteriores y analizando fluorométricamente el eluido de la columna mediante un detector de fluorescencia acoplado (Gilson), equipado con una celda de flujo continuo (longitudes de onda: excitación 340 nm; emisión 418 nm). La integración de los picos resueltos por este sistema se llevó cabo automáticamente.

Extracción de TRH y radioinmunoensayo

La extracción de TRH de las células se llevó a cabo de la siguiente manera: A las células previamente lavadas (PBS 2x 1.5 ml) se les agregó un volumen adecuado de ácido acético 1 N frío, manteniéndolas a -20° C hasta el momento de ser procesadas. El día señalado se añadió metanol frío y se separó a las células utilizando un pistón de goma.

El extracto acético/metanol se sonicó hasta obtener una solución homogénea. El homogenado se mantuvo por lo menos 12 hr - 20° C, para resuspenderlo posteriormente mediante agitación vigorosa. La solución se centrifugó durante 5 min a 12,000 g, separándose la fracción soluble del sedimento celular, los cuales fueron recuperados, evaporados a sequedad y mantenidos a -20 ° C hasta su posterior procesamiento.

Se resuspendió el sobrenadante desecado en PBS para RIA (fosfatos 0.05 M, NaCl 0.15 M, albúmina de suero bovino, grado RIA 0.25%, pH 7.5) para ser sometido a un radioinmunoensayo específico para TRH como se describe en Méndez y cols. (1987), utilizando el anticuerpo anti-TRH específico R₂ caracterizado por Joseph-Bravo y cols., (1979).

Determinación de DNA

La determinación de DNA se llevó a cabo en los sedimentos acético/metanol desecados (Erwin y cols., 1981), los cuales se resuspendieron en 500 µl de ácido tricloroacético al 5%, hidrolizando la solución por 45 min a 80-85° C. Los hidrolizados se centrifugaron durante 5 min a 12,000 g, separando el precipitado proteínico de los sobrenadantes. Los sobrenadantes se mezclaron con 100 µl de una solución fresca del ácido 3',5'diaminobenzoico (200mg/ml), incubándose por 1 hr a 60° C. La reacción se detuvo añadiendo 1 ml de HCl 1 M. Los niveles de fluorescencia relativa emitida por los aldehídos generados del DNA celular (400 nm excitación, 520 nm emisión) fueron comparados con los valores obtenidos de una curva estándar de DNA de timo de ternera.

RESULTADOS DEL CULTIVO

Caracterización morfológica de los cultivos primarios

Cultivos hipotalámicos

La observación bajo el microscopio de los cultivos de células hipotalámicas crecidas en medio suplementado con suero, muestra que estos exhiben características morfológicas similares a las reportadas por otros sistemas de cultivos (Benda y cols., 1975; Tixier-Vidal y cols., 1978; Legendre y cols., 1988): Se observa que pocas horas después de la siembra inicial las células se adhieren directamente a la superficie de los platos, produciendo a las 24 horas cultivos que consisten de numerosos grupos de entre 10-30 células de tamaño pequeño (5 μm). Alrededor de las 48 horas se pueden distinguir dos poblaciones celulares características: por un lado células no neuronales que presentan una apariencia epitelioide (con un citoplasma transparente no refringente, algunas de las cuales semejan a fibroblastos) y que después de uno o dos días de periodo adaptativo comienzan a proliferar; y por otro lado, células pequeñas con un pericarion ovoide de apariencia neuronal, de las cuales surgen procesos delgados los cuales a medida que transcurren los días van creciendo en tamaño y grosor. Con el paso del tiempo se nota una migración progresiva de las células tipo neuronal desde los grupos, de manera tal que alrededor del 5o. día *in vitro* (5 DIV) se puede observar claramente a las mismas (en su gran mayoría de morfología bipolar o multipolar) colonizando gran parte de la superficie de los platos de cultivo. A esta etapa las neuritas son cada vez más visibles y forman un sistema reticular discreto que crece exclusivamente sobre la capa subyacente de células no neuronales (Publicación 2, fig. 1a). Alrededor del fin de la primera semana la capa basal se ha desarrollado por completo, formando una alfombra continua de células de morfología poligonal, con un citoplasma transparente y núcleo conspicuo. Esta capa basal confluyente se encuentra organizada en realidad por varias capas celulares (principalmente de astrocitos indiferenciados) formando un patrón estratificado (Benda y cols., 1975; Tixier-Vidal y de Vitry, 1979). Las neuronas a esta etapa poseen un cuerpo gris conspicuo de morfología variada con extensiones de longitud y grosor variable. A partir de este momento el número de fibras y extensiones es cada vez más visible pudiéndose observar claramente como algunas de ellas siguen un camino común formando fibras o cables que comunican grupos celulares discretos o células individuales. Asimismo la red de conexiones se hace más intrincada, formando complejas interacciones. El cuerpo celular de las células neuronales incrementa de tamaño y se hace visiblemente refringente hasta llegar a un máximo alrededor de la segunda semana. En este estadio las neuronas son principalmente de morfología bipolar pequeño (5-10 μm) o algunas son multipolares y con cuerpo celular mayor (15-25 μm) (Lámina I, Fotos c,d).

A partir del 14-15 DIV, se empiezan a observar signos de degeneración neuronal, que se manifiestan por la falta de adhesión de las neuritas (principalmente aquellas que conectan grupos celulares), por la acumulación de restos o debris celulares alrededor de los cuerpos neuronales y neuritas (las cuales aumentan de refringencia), así como a la aparición de racimos de cuerpos celulares carentes de neuritas. Las neuronas sobrevivientes, sufren un aumento en el grosor de sus neuritas y en el diámetro de su cuerpo celular en el cual se distingue perfectamente el núcleo y su nucléolo. Esta decadencia en la población neuronal se ve acompañada por la aparición de células de cuerpo pequeño, redondo y opaco con numerosas extensiones cortas y finas las cuales han sido identificadas por otros como astrocitos maduros. Esta población de astrocitos, también desaparece progresivamente de los cultivos, quedando únicamente alrededor de la tercera semana la capa basal de células poligonales aplanadas las cuales pueden sobrevivir por periodos muy largos (al menos 2 meses).

Cultivos de corteza frontal

Los eventos celulares del desarrollo in vitro de las células derivadas de la corteza frontal siguen en principio el mismo patrón descrito anteriormente y coinciden en los aspectos básicos con lo descrito en la literatura (Yavin y Yavin, 1977; Dichter, 1978; Choi y cols., 1987a). Las particularidades más importantes de estos cultivos comparados con los derivados del hipotálamo se refieren a: la existencia de un mayor número de células presentes en los agregados celulares (los cuales persisten por mayor tiempo), una mayor proporción de células neuronales presentes al término de los mismos (cuya cercanía provoca un desarrollo más restringido de la red neurítica local, lo que dificulta la visualización en algunos campos de la capa basal subyacente) (Lámina I, Fotos e y f) y a la presencia de astrocitos diferenciados, no formando "colonias" como en el caso de las células hipotalámicas, sino distribuidos de manera homogénea.

Identificación celular

La identificación de las poblaciones neuronal y glial se llevó a cabo mediante la visualización inmunocitoquímica de los cultivos fijados in situ, utilizando anticuerpos específicos contra la proteína ácida fibrilar-glial (GFAP) como marcador de la identificación de los astrocitos (Raff y cols., 1979) y contra la enolasa específica neuronal (NSE) como marcador neuronal.

La inmunoreactividad contra la GFAP se observó exclusivamente en las células que forman la capa basal (aun cuando una proporción minoritaria de las mismas no fue teñida con el anticuerpo). Dentro de las células GFAP+ se distinguieron 2 subtipos: uno constituido por células alargadas, aplanadas y teñidas ligeramente y otro formado por células fuertemente teñidas que poseían extensiones citoplasmáticas irregulares delgadas (Lámina I, Fotos a y b; Publicación 2, fig.1 b, e-f).

Las células positivas a la NSE mostraron las características antes mencionadas que distinguen a las neuronas en cultivo (Lámina I, c-f), tiñéndose preferentemente los cuerpos celulares y en menor grado las neuritas o extensiones citoplásmicas, permitiendo distinguir con mayor claridad la circuitaria establecida entre las células neuronales. Este procedimiento nos permitió realizar un conteo de estas en áreas seleccionadas al azar, teniendo así un estimado grueso de la relación de neuronas y células gliales presentes.

Es importante señalar que además de estas poblaciones celulares se observaron otros tipos de células en proporción minoritaria que se expresaron en algunos cultivos o bajo ciertas condiciones. Entre estas se encuentran: células ependimales, caracterizadas por los movimientos de los cilios, agrupadas en colonias o asociaciones alrededor de una cavidad esférica y que se manifestaron al final de la segunda semana; células de cuerpo muy pequeño, agrupadas en racimos muy compactos; así como la presencia de células de apariencia neuronal, con un cuerpo celular muy grande triangular en donde se distingue el núcleo claro y un nucléolo prominente, con múltiples ramificaciones, y que se han definido como neuronas neurosecretoras (Benda y cols, 1975; Tixier-Vidal y cols., 1978).

LAMINA I

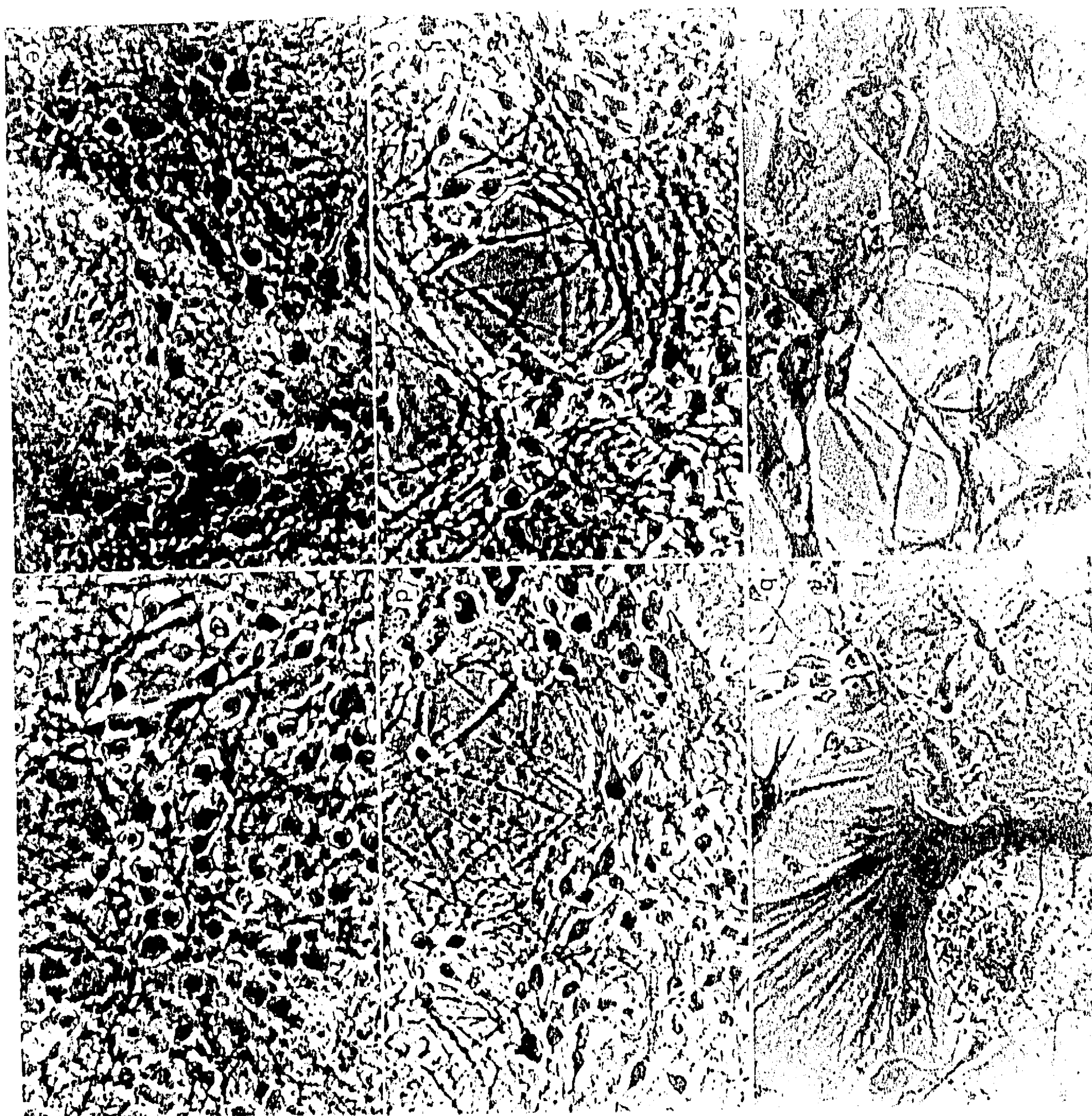
Lámina I

Cultivos primarios de células dispersas obtenidos de tejido hipotalámico y corteza cerebral del ratón.

Detalle de cultivos gliales puros (a) y corticales de 21 DIV (b), teñidos contra la proteína ácida fibrilar glial.

Detalle de cultivos hipotalámicos (c y d) y de corteza frontal (e y f) de 12 DIV Ara C+, teñidos contra la enolasa específica neuronal.

Amplificación 400X



Caracterización funcional del sistema de cultivo de células nerviosas.

Análisis bioquímico de los cultivos

Determinamos diversos parámetros bioquímicos que nos permitieran estimar la relación existente de células neuronales vs. no neuronales presentes en nuestros sistemas de cultivo, así como validar las capacidades funcionales de los mismos.

Contenido de aminoácidos libres en cultivo.

Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* muestran que el metabolismo del glutámico en el Sistema Nervioso se encuentra compartimentalizado entre las neuronas y las células gliales, lo cual resulta por una parte de la interacción dinámica existente de las diversas moléculas asociadas a este proceso, particularmente aquellas relacionadas con la síntesis de aminoácidos neurotransmisores (e.g. glutamato, glutamina y GABA) (Balazs y cols., 1973; Patel, 1981) y por otra de la localización celular específica de las distintas enzimas involucradas: glutamino sintetasa (GS) en glia y descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en neuronas GABAérgicas (Patel y cols., 1982; Schoubuse y Hertz., 1983). En apoyo a este concepto se ha demostrado que los cultivos primarios de astrocitos o las líneas celulares de origen glial poseen niveles muy distintos de Gln y GABA, comparados con sus contrapartes neuronales (Drummond y Phillips, 1977; Patel y Hunt, 1985; Lehman y Hansson, 1987).

Se analizó por lo tanto las concentraciones de Glu, Gln y GABA, así como las actividades de GAD y GS en los cultivos mixtos de corteza de 12 DIV y en cultivos gliales puros, como un parámetro de la funcionalidad y composición celular de nuestros cultivos.

El análisis de los datos obtenidos por HPLC muestra a la glutamina, la glicina y la taurina como los aminoácidos presentes en mayor proporción en los cultivos corticales (Figura 2), en tanto que se detectan concentraciones menores del ácido glutámico y el GABA. Se observan diferencias importantes en los niveles de ciertos aminoácidos en los cultivos crecidos en presencia o ausencia del citosín arabinósido (Ara C), particularmente una mayor cantidad de glutamina, glicina y taurina en cultivos no tratados con el antimetabólico (AraC-).

En los cultivos gliales se detectan concentraciones muy elevadas de Gln y Tau (similares a las presentes en cultivos corticales Ara C-, mientras que la cantidad de GABA presente es promedio 10-15 veces menor que en los cultivos de corteza.

A excepción de un mayor contenido de Gln y una baja cantidad de Glu, las concentraciones de los distintos aminoácidos libres detectadas en nuestros cultivos se encuentran dentro de los rangos reportados *in vivo* para el cerebro de la rata (Patel y Balasz, 1979; Banay-Schwartz y cols., 1979; Perry y cols., 1981) y en otros sistemas de cultivo (Drummond y Phillips, 1977; Patel y Hunt, 1985; Lehman y Hansson, 1987). Se ha sugerido que el glutamato en cultivo se distribuye de manera equivalente en neuronas y células gliales (Hertz, 1979), lo cual está de acuerdo con la similitud de los altos niveles de Glu existentes tanto en los cultivos mixtos corticales como en los gliales puros. Es posible que esta sea una característica de los cultivos, ya que *in vivo* existen concentraciones mucho menores del mismo (Storm-Mathisen y Ottersen, 1986).

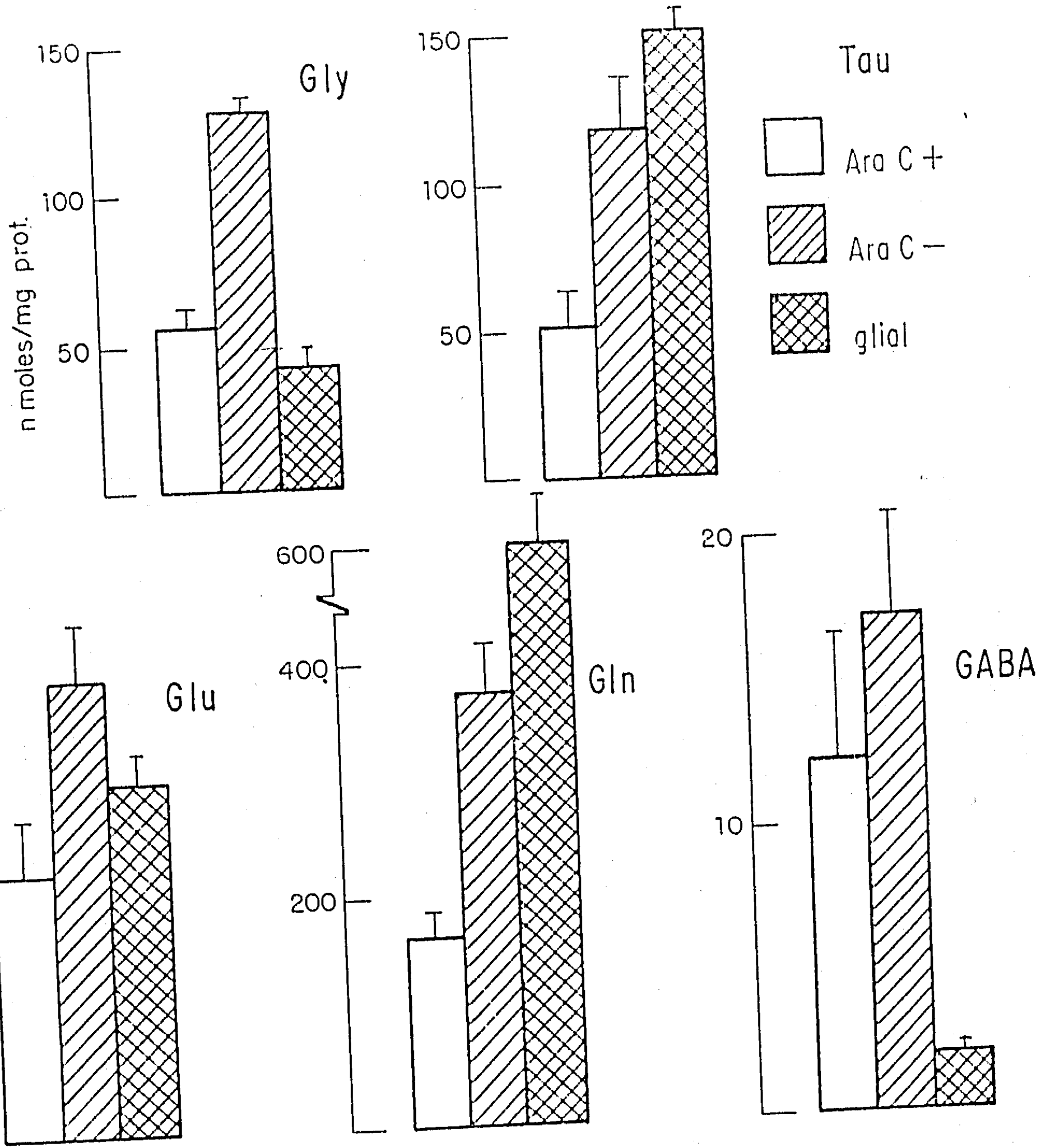
FIGURA 2

Figura 2

Concentración de glicina (Gly), taurina (Tau), glutámico (Glu), glutamina (Gln) y GABA en cultivos primarios de células nerviosas.

Se determinaron los niveles de aminoácidos libres existentes en cultivos primarios de corteza cerebral de 12 DIV (Ara C+) o (Ara C-) y gliales de 20 DIV (glia).

Cada barra representa los valores promedio \pm el error estándar de 4 cajas individuales de cada condición correspondientes a 2 cultivos distintos.



La alta concentración de glutamina presente en las células neuronales y gliales pudiera deberse en parte a la acumulación del mismo al interior de las células como resultado de la suplementación continua de este aminoácido en el medio de cultivo. Sin embargo, la concentración de Gln presente en cultivos Ara C+ mostró ser únicamente 27% de la existente en las células gliales, lo cual indica que en las células gliales participan otros mecanismos además de la captura para la formación de esta poza; una posibilidad es la biosíntesis endógena glial de Gln, lo cual es consistente con la alta actividad específica de glutamino sintetasa (GS) reportada en astrocitos en cultivo (Patel y cols., 1982; Schousboe y Hertz.,1983).

La presencia de GABA en los cultivos corticales, se encuentra asociada a la localización neuronal de la GAD (Hansson y cols., 1985; Patel y Hunt, 1985; Holopainen y cols., 1986) como lo demuestra la conversión del glutámico uniformemente marcado a GABA radioactivo (Figura 3) y la descarboxilación de específica del glutámico marcado con C¹⁴ en el carbono α (Figura 6), por parte de fracciones solubles obtenidas de las células de corteza en cultivo. Por el contrario no se detectó actividad de GAD en los cultivos de astroglia, lo cual coincide con lo reportado por otros autores (Schousboe y Hertz, 1983) y es consistente con los bajos niveles de GABA existentes en estas células (Figura 2). Estos resultados indican claramente las diferencias existentes en la composición celular de estos dos sistemas de cultivo y muestran la existencia de neuronas GABAérgicas en nuestros cultivos. Los altos niveles de taurina presentes en nuestros cultivos gliales, concuerda con lo reportado en la literatura (Lehman y Hansson, 1987) y podrían ser el resultado de la actividad conjunta de los mecanismos de captura y biosíntesis descritos en astrocitos para este aminoácido.

FIGURA 3

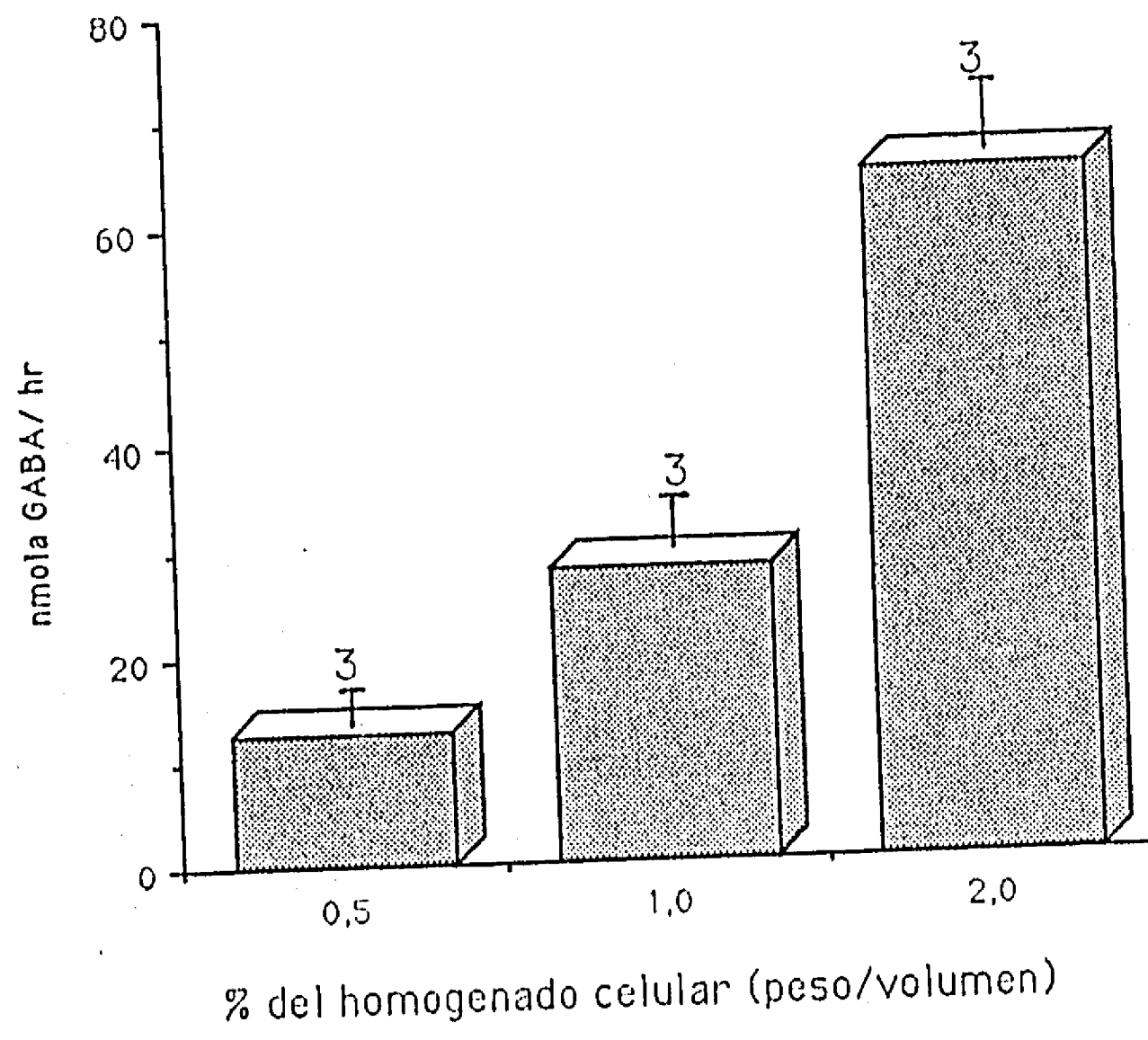
Figura 3

Conversión de Glu a GABA por células de corteza cerebral en cultivo.

Concentraciones diferentes de homogenados obtenidos de células de corteza cerebral en cultivo se incubaron en presencia de [U-¹⁴C] glutámico, por tiempos variables. El GABA radioactivo formado se detectó mediante una cromatografía descendente en papel como se describe en la sección de Métodos.

Cada una de las barras representa el promedio de las nmolas de GABA /hr \pm el error estándar obtenidas de 3 determinaciones por duplicado.

Actividad de conversión de Glu a GABA



Captura del ácido gama amino butírico (GABA-³H) en cultivos de corteza cerebral.

Se han caracterizado sistemas de captura de alta afinidad para el GABA presentes tanto en neuronas (Larsson y cols., 1983), como en células gliales en cultivo (Hertz y cols., 1978), los cuales se distinguen entre si por la sensibilidad farmacológica que muestran a la acción de diversos compuestos (Krogsgaard-Larsen, 1985).

En cultivos mixtos (que poseen tanto células neuronales como gliales) la captura del ácido γ aminobutírico resulta de la participación de ambos sistemas de transporte, por lo que la inhibición específica de uno u otro, permite valorar la contribución de cada uno de las poblaciones celulares participantes. Esta estrategia experimental se ha utilizado como un índice indirecto de la proporción de neuronas y células gliales existentes en cultivos primarios de cerebelo y bulbo olfatorio (Currie y Dutton, 1980) y de corteza cerebral (Snodgrass y cols., 1980).

Determinamos por lo tanto la captura de GABA-³H en los cultivos de corteza, así como el efecto de los análogos estructurales ácido 2,4 diaminobutírico (DABA) y β -alanina (β -Ala), los cuales inhiben de manera específica la captura de GABA por neuronas y células gliales respectivamente (Iversen y Kelly, 1975; Kelly y Fabienne, 1976) y al ácido nipecótico un inhibidor competitivo de la captura de GABA tanto en las células gliales, como en las neuronales (Larsson y cols., 1980; Larsson y Schousboe, 1981).

Las cultivos de 10 DIV acumulan GABA-³H (Figura 4a), acumulación que es dependiente de la presencia de sodio en el medio de incubación (Figura 4b), característica mostrada por los sistemas de captura descritos para este neurotransmisor en otros tipos de cultivo (Snodgrass y cols., 1980, Currie y Dutton, 1980; Yu y Hertz, 1982) y otras preparaciones *in vitro* (Wood y Sidhu, 1987). La captura del GABA marcado no se afecta por la presencia de DABA (1mM), resultado que difiere del claro efecto inhibitorio que este compuesto ejerce tanto en cultivos primarios de corteza cerebral (Snodgrass y cols., 1980), como en cultivos de células reagregadas derivadas del tectum, cuerpo estriado y tegmentum rostral mesencefálico (Shalaby y cols., 1987). La incubación de los cultivos con una concentración similar de β -alanina produce un inesperado aumento en la captura del aminoácido, en tanto que la adición del ácido nipecótico, provoca por el contrario, una fuerte disminución en la acumulación del GABA por parte de las células, efecto que se observa también cuando se le incluye conjuntamente con el DABA (Figura 4b).

La interpretación de estos resultados es ciertamente difícil; sin embargo existen reportes que indican que los sistemas de transporte de GABA presentes en las células en cultivo no se comportan con las características generalmente atribuidas a tales sistemas (Lasher, 1974; Cummins y cols., 1982). Por ejemplo en cultivos de interneuronas cerebelares enriquecidos en astrocitos diferenciados con morfología estelar (Levi y cols., 1983), la β -alanina se comporta como un inhibidor débil de la captura de GABA-³H, en tanto que el ácido ciclohexano carboxílico (ACHC, otro inhibidor potente de la captura neuronal de GABA) y el ácido nipecótico inhiben fuertemente la entrada del aminoácido en las células gliales.

FIGURA 4

Figura 4

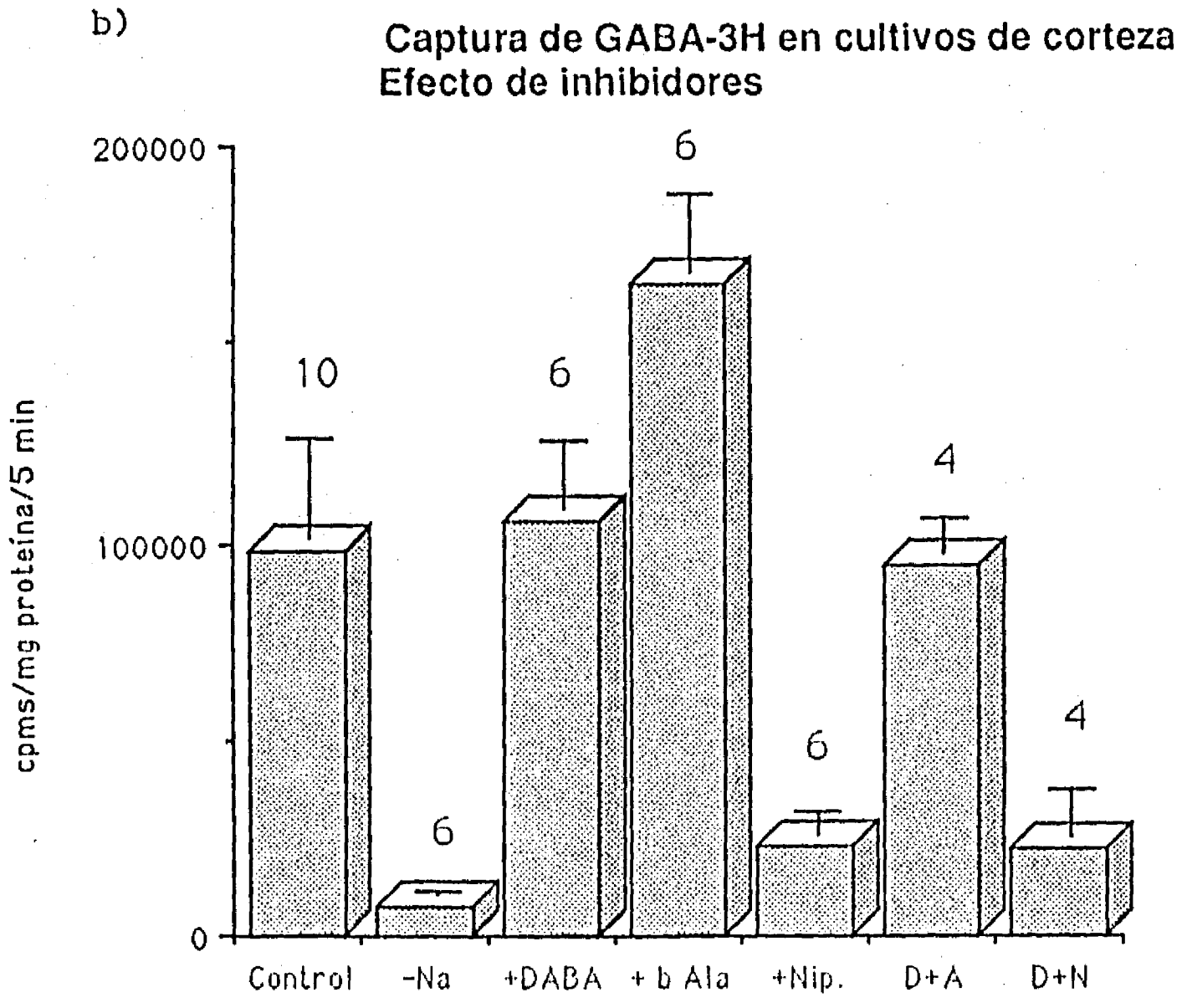
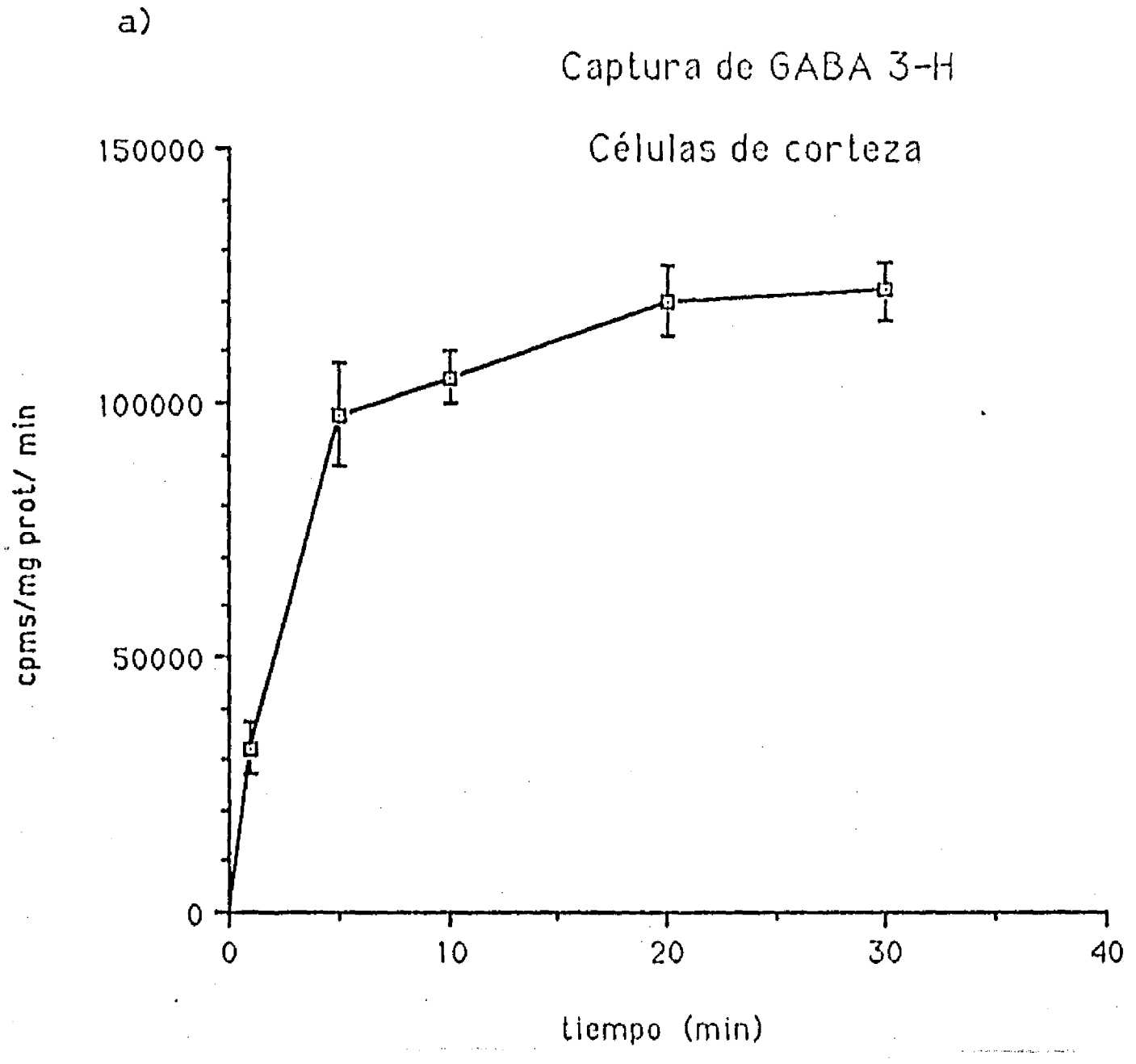
Captura de GABA [³-H] por cultivos primarios de corteza cerebral de ratón.

Se incubaron células de corteza cerebral de ratón (Ara C+ 10 DIV) en presencia de GABA [³-H] en RKB (10⁻⁷M conc. final) por distintos tiempos (a), o por 10 minutos en cultivos preincubados durante 5 minutos en presencia de diferentes inhibidores de la captura neuronal y/o glial del aminoácido (b).

La marca presente en las células se determinó por LSC.

Las barras representan el promedio de las cpm/mg proteína ± el error estándar del número de cajas individuales indicadas, correspondientes a 4 diferentes cultivos.

- Na = NaCl substituido por cloruro de colina
- DABA = ácido diamino butírico
- β Ala = β alanina
- Nip = ácido nipecótico
- N + A = DABA + β alanina
- D + N = DABA + nipecótico



Efecto de citosín arabinósido (Ara C)

Una de las características mostradas por los cultivos primarios derivados de tejido nervioso fetal es la presencia de distintas estirpes celulares, con diferentes capacidades adaptativas, las cuales compiten en los platos de cultivo por los nutrientes y espacios disponibles. Las neuronas postmitóticas ya diferenciadas no son capaces de dividirse *in vitro*, por lo cual su adaptación y mantenimiento en cultivo se ve limitada con respecto a las otras poblaciones celulares que poseen una alta capacidad proliferativa (e.g. las células gliales). El sobrecrecimiento glial que se obtiene bajo ciertas condiciones del cultivo puede por lo tanto influir en el desarrollo y funcionalidad de las células neuronales. Se hizo necesario utilizar un inhibidor de la división celular, como una estrategia experimental tendiente a modificar la relación neuronas/células no neuronales presentes y por lo tanto "enriquecer" a la población neuronal de los cultivos tratados.

Nosotros utilizamos al antimitótico citosín arabinósido (Ara C) en nuestros cultivos con este propósito. El protocolo que escogimos se basó en la inclusión de Ara C en el medio de cultivo por una sola ocasión (conc. final 1×10^{-5} M), un día antes de llevar a cabo el segundo cambio de medio (5 DIV), de manera tal que las células estuvieran en contacto con la droga por un período aproximado de 24 hr. Esta etapa se escogió en base a observaciones morfológicas previas (C. Guerra, Tesis de Licenciatura), que mostraban que el antimitótico no tenía efecto alguno sobre cultivos que ya habían llegado a confluencia (< 5 DIV), en tanto que si era administrado antes de este período se provocaba un fuerte efecto tóxico generalizado, disminuyendo considerablemente la vida media de los cultivos.

Examinamos nuevamente esta variable, extendiendo las observaciones antes mencionadas. El efecto de la droga se probó inicialmente sobre cultivos de corteza frontal. Los parámetros experimentales que se analizaron fueron las cantidades de DNA (un índice del número de células presentes) y proteína total. Los resultados reportados en la Figura 5 muestran un claro efecto inhibitor del antimitótico en la cantidad de DNA presente, a todas las densidades de siembra probadas, el cual se hace más evidente a densidades de siembra altas. En contraste, únicamente se observan diferencias significativas en la cantidad de proteína a densidades de siembra bajas e intermedias, en tanto que a densidades altas ($\leq 1 \times 10^5$ células/cm²) los valores son muy similares.

El efecto del antimitótico en los cultivos hipotalámicos (Ara C+) se caracterizó por una migración rápida de las células neuronales a partir de los grupos celulares, distribuyéndose de manera homogénea sobre la capa basal subyacente, permitiendo con ello el desarrollo de una red más compleja y profusa de extensiones nerviosas, que en el caso de los cultivos no tratados (Ara C-) (Lámina II, Foto k y l, Publicación 2, fig.1 c y d). Por el contrario la capa de células basales manifestó un desarrollo más discreto en presencia del antimitótico. Los niveles de DNA en los cultivos Ara C+ de 10 DIV representaron el 43% de los valores obtenidos en los cultivos Ara C- (Publicación 2, tabla 2). Sin embargo, y al igual que en el caso de los cultivos corticales, no se modificó significativamente la cantidad de proteína tanto soluble como membranal presente en los mismos (Publicación 2, tabla 2), lo cual podría reflejar que no obstante la menor proporción de células presentes en los cultivos Ara C+, ocurre un aumento concomitante en la síntesis de proteína necesaria para la formación de los componentes de membrana, particularmente de los asociados a los axones y dendritas. El número de neuronas presentes en cultivos hipotalámicos Ara C+ de 12 DIV (determinado por la tinción específica celular al anticuerpo específico neuronal anti-NSE), mostró ser significativamente mayor que en los cultivos no tratados (Tabla 5).

FIGURA 5

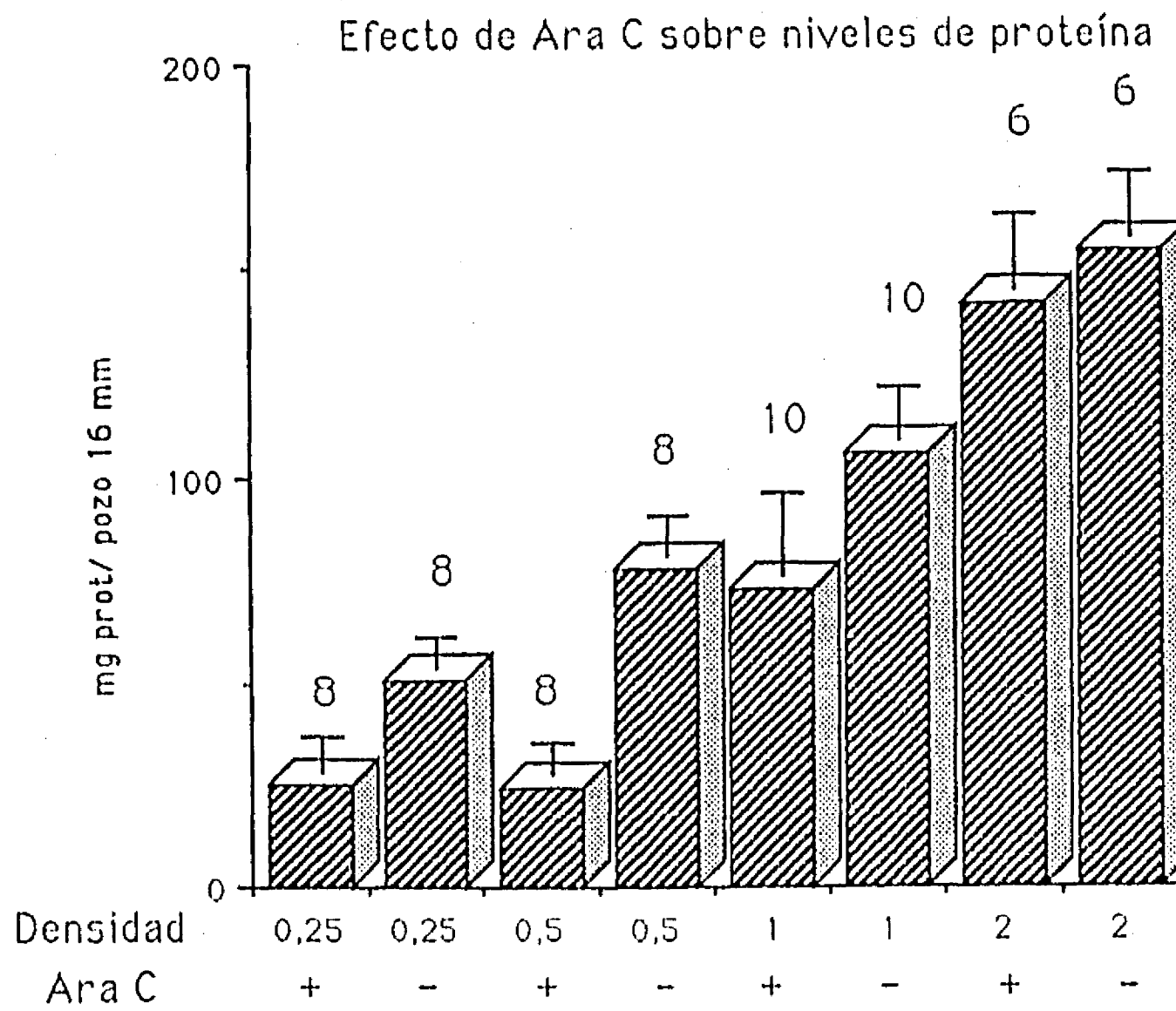
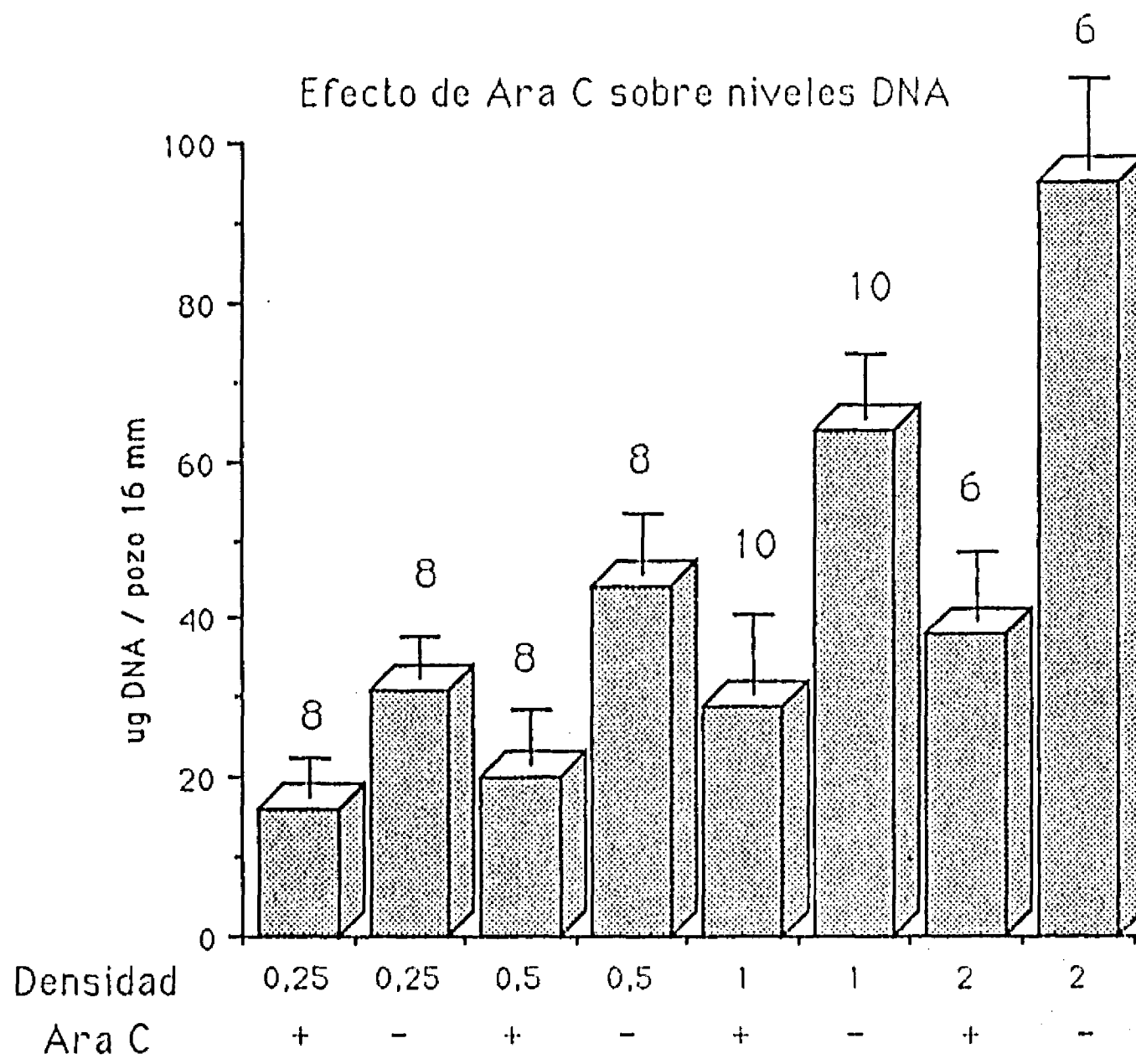
Fig 5

Efecto del citosin arabinósido sobre los niveles de DNA y proteína en cultivos de corteza cerebral de ratón.

Células de corteza frontal de ratón de 14 días de desarrollo fetal, sembradas a distintas densidades ($0.25, 0.5, 1, \text{ y } 2.0 \times 10^5$ células/cm²), se cultivaron en charolas multipozos (16 mm Ø) durante 12 DIV, en presencia o ausencia del antimitótico citosin arabinósido (Ara C), el cual fue añadido al 5 DIV. El medio de cultivo se renovó cada 3 días, substituyendolo en cada ocasión por una mezcla 1:1 de medio fresco y medio condicionado.

Los niveles de DNA se determinaron mediante la técnica espectrofluorométrica de Erwin y cols.(1981) y la proteína total por el método de Lowry y cols., (1951).

Las barras representan el promedio \pm el error estándar del número de pozos indicados.



Aunados a los efectos morfológicos antes descritos varios parámetros funcionales también se muestran afectados por la inhibición de la proliferación glial. Entre ellos figuran diferencias en la composición de diferentes aminoácidos libres presentes (Figura 2, ver sección correspondiente) y en la actividad específica de PGAlI y PGAl en cultivos hipotalámicos (Publicación 2, fig.2). A diferencia de estos resultados la presencia del antimitótico no modificó la actividad específica de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en los cultivos de corteza (Figura 6). Por el contrario la actividad total de GAD mostró ser significativamente mayor en cultivos no tratados con Ara C, que en su presencia (GAD Ara C- = 9.1 ± 0.7 nmolas CO^2 /hr / pozo vs. GAD Ara C+ = 6.1 ± 0.5 nmolas, n= 8), resultado que concuerda con los niveles más altos de GABA endógeno presentes en estos cultivos (GABA Ara C - = 4.1 ± 1.1 nmolas GABA / pozo vs. GABA Ara C+ = 2.5 ± 0.9 , n=4). Estas diferencias indican probablemente que en los cultivos Ara C- existe una mayor proporción de neuronas GABAérgicas. Se ha descrito que a diferencia del hipotálamo, la corteza cerebral del ratón se desarrolla más tardíamente, por lo que las neuronas maduran alrededor de los días 16 a 20 de edad fetal (Shimada y Nakamura, 1973). Dada la edad fetal a la cual se obtuvo el tejido (día 14) es probable que se la omisión del citosín arabinósido permitió no solo la proliferación de las células no neuronales (gliales, ependimales etc.), sino quizá también la división de los neuroblastos presentes en esta etapa del desarrollo fetal de la cual se obtiene la corteza cerebral.

FIGURA 6

Figura 6

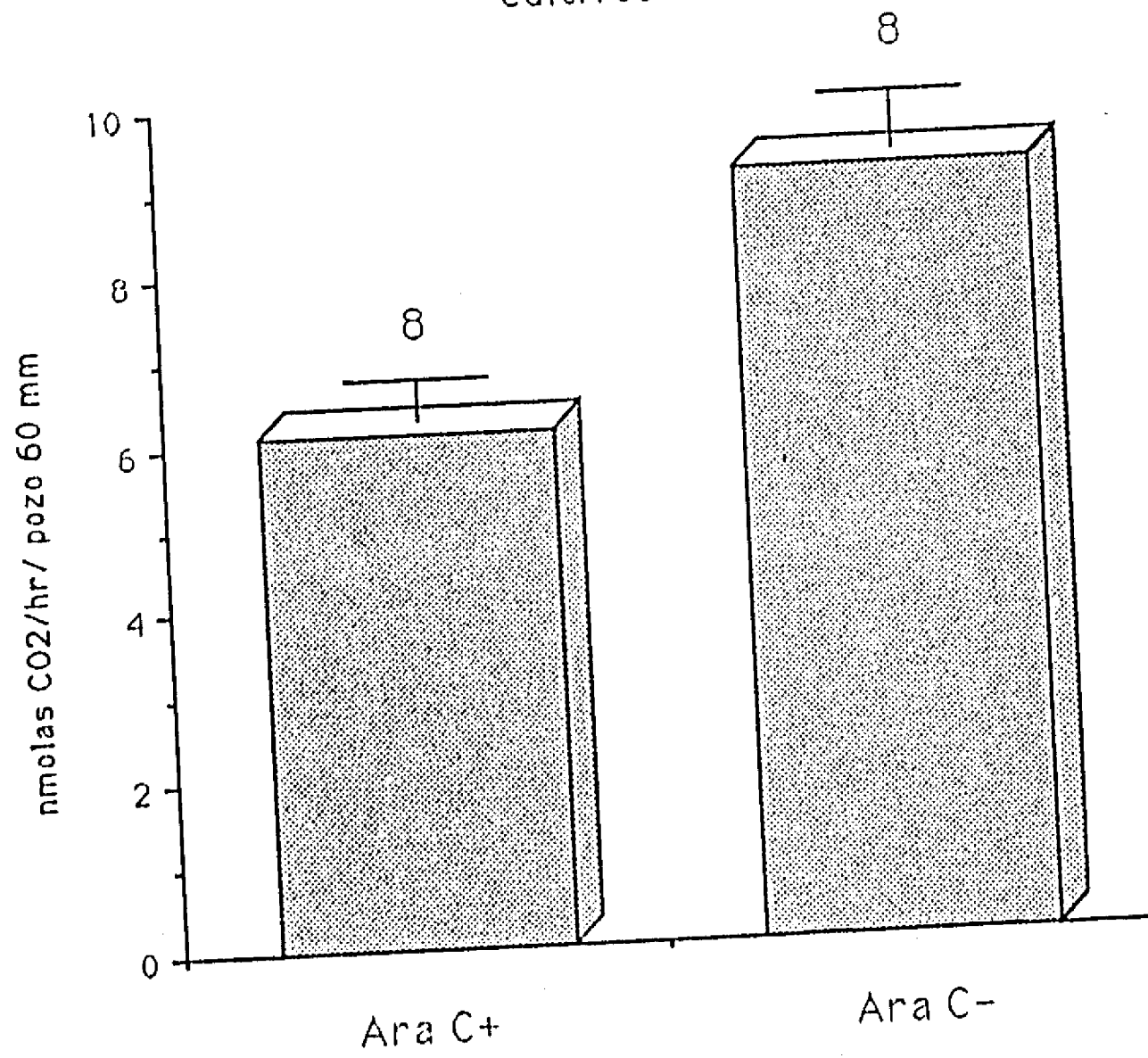
Efecto del citosín arabinósido sobre la actividad de GAD en cultivos primarios de corteza cerebral fetal.

Se utilizaron cultivos de corteza cerebral de 12 DIV crecidos en presencia (Ara C+) o ausencia (Ara C-) del antimitótico citosín arabinósido.

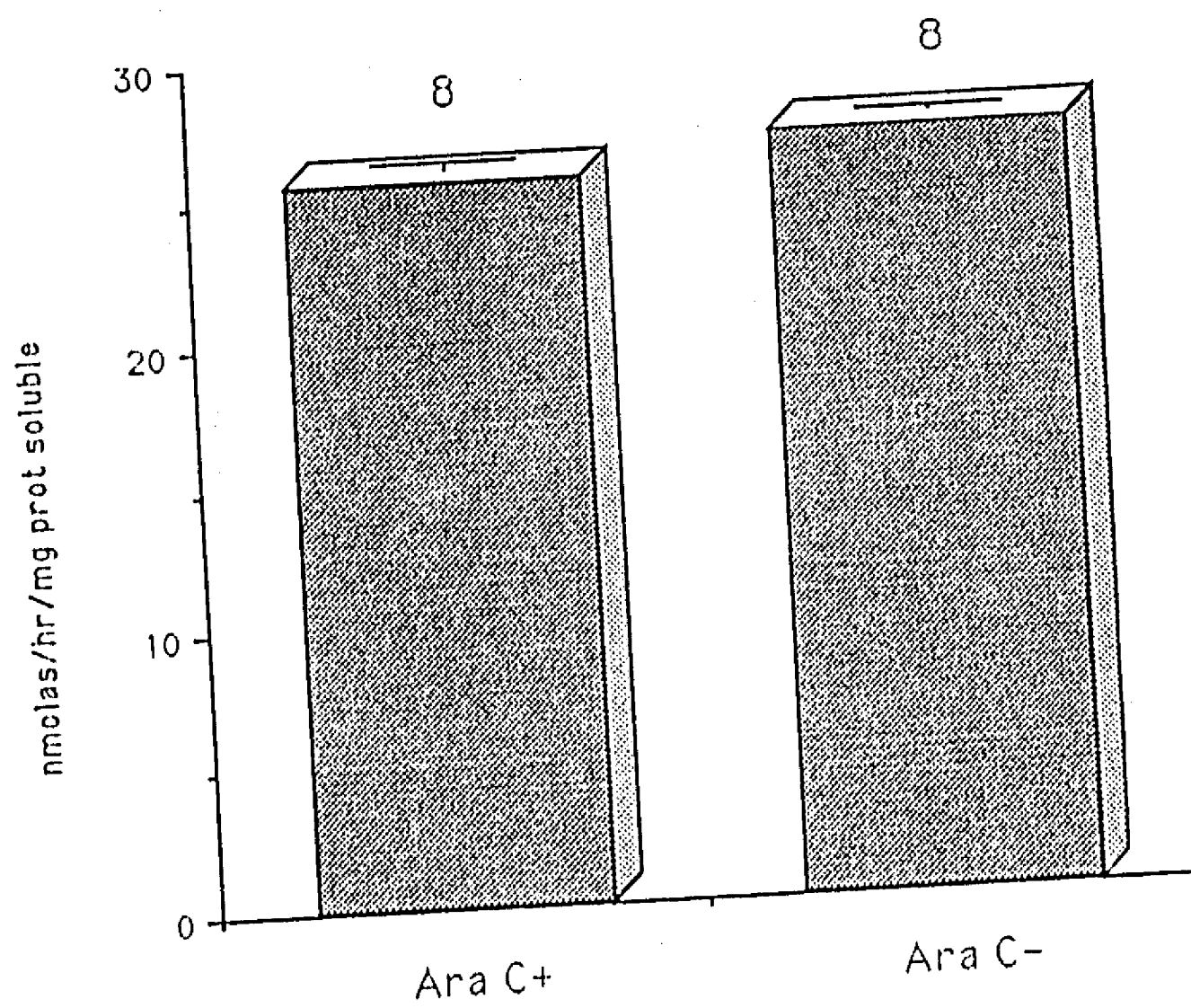
La actividad de GAD se determinó en la fracción soluble celular, midiendo la descarboxilación del glutámico [¹⁴C].

Las barras representan el promedio \pm el error estándar del número de pozos individuales indicados, correspondientes a 4 diferentes cultivos.

Actividad específica de GAD en cultivos de corteza



Actividad total de GAD en cultivos de corteza



Efecto del medio condicionado homólogo

Se ha demostrado que los extractos de tejido nervioso y el medio condicionado de cultivos primarios o líneas de células nerviosas contienen múltiples factores difusibles que regulan la sobrevivencia y diferenciación de las neuronas y células gliales (Sensenbrenner y cols., 1980; Banker, 1980), así como la expresión fenotípica y producción de diversos neurotransmisores y péptidos (Spiegel y cols., 1990). Decidimos por lo tanto analizar el efecto que tendría el medio condicionado homólogo, sobre el desarrollo celular y expresión de ciertos parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo del TRH en cultivos hipotalámicos (densidad de siembra = 1×10^5 células/cm²).

El paradigma experimental escogido para detectar un efecto trófico del medio condicionado fue el siguiente: Las células recién sembradas se mantuvieron durante 3 días en medio de cultivo (medio DMEM suplementado con aditivos y 10 % de FBS), como periodo previo de adaptación a las condiciones *in vitro*. A partir de este momento se renovó el medio cada 72 hr por un volumen similar de medio fresco (cambio completo, 1/1) o bien por una mezcla 1:1 preparada con medio fresco y medio condicionado homólogo de cultivos crecidos en paralelo (cambio de la mitad del volumen, 1/2). Los cultivos mostraron un desarrollo morfológico similar durante la primera semana. Fue a partir del segundo cambio de medio (<6 DIV) cuando se comenzaron a notar cambios importantes: la primera de las observaciones se refiere a la extensión y densidad de la capa basal de las células gliales, la cual una vez alcanzada la confluencia, muestra ser más delgada en cultivos crecidos en presencia del medio condicionado, que en aquellos en los que se renovó el medio por completo (Lámina II, Fotos g y h). A diferencia de la cantidad de proteína membranal, la cual disminuye como resultado de la adición del medio condicionado (Tabla 4), el número total de células presentes en cultivos de 12 DIV (Ara C+) (determinado por el contenido de DNA), no varía significativamente en ambas condiciones (cambio mitad volumen = 22.8 ± 2.3 µg DNA/plato vs. cambio volumen completo 30.4 ± 4.2 , n=8). En contraste, tanto la proporción de células con apariencia neuronal (determinada de manera cualitativa por las características morfológicas específicas mostradas por las mismas bajo la observación directa de los cultivos) (Lámina II, Fotos i y j), como el número de células inmunopositivas a la enolasa específica neuronal son mayores en los cultivos mantenidos en presencia del medio condicionado, que en cultivos hermanos no tratados (Tabla 5) (cambio mitad volumen = 76.4 ± 5.9 células NSE+/campo vs. cambio volumen completo = 50.4 ± 3.4 , n=10; p < 0.01). La presencia de factores presentes en el medio condicionado estimuló además no solo la distribución homogénea de las neuronas sobre los platos de cultivo, sino también el grado de desarrollo de sus neuritas (extensiones más largas y de mayor contraste), formando circuitos neuronales más complejos (Lámina II, Fotos g y h).

A diferencia de la capa basal confluyente presente en los cultivos control, se desarrollan en ciertas zonas de los cultivos tratados con medio condicionado colonias de células cuyo aspecto parece corresponder al de astrocitos diferenciados, particularidad que se hace más aparente en cultivos de más de 14 DIV, en donde además se observa paralelamente una degeneración progresiva de la población neuronal.²

² C. Guerra ensayó el efecto del medio condicionado homólogo a densidades bajas de siembra (5×10^4 células / cm²), en donde es más evidente la pérdida neuronal y la sobrepoblación de células no neuronales. Para ello cultivó durante 3 días a las células en medio DMEM suplementado con 10% de FBS, renovando el medio posteriormente con un volumen similar de medio fresco o bien por una

LAMINA II

Lámina II

Cultivos hipotálamicos 12 DIV, crecidos en diferentes condiciones experimentales.

g e i = - medio condicionado homólogo

h y j = + medio condicionado homólogo

k = - citosín arabinósido

l = + citosín arabinósido

Amplificación g, h, l y m 180X
i, j 400X

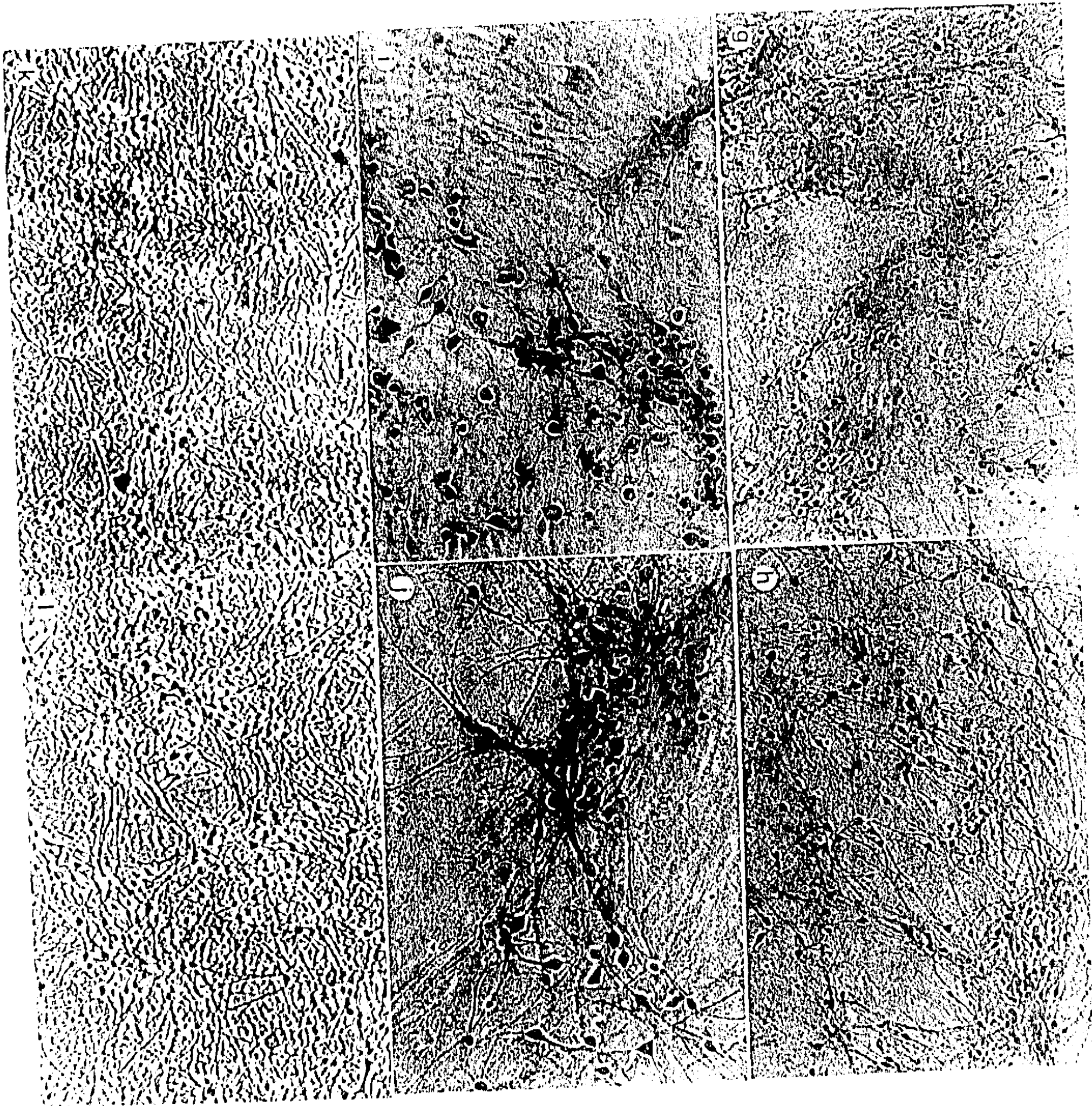


Tabla 4

Proteína membranal presente en los cultivos hipotalámicos

DIV	Ara C+		Ara C-	
	1/2	1/1	1/2	1/1
10	84.8 ± 8.6	110.3 ± 8.2*	103.0 ± 0.5	125.6 ± 7.1*
12	115.1 ± 10	165.0 ± 5.1**	ND	
14	75.3 ± 7.9	68.6 ± 6.5	54.6 ± 8.0	60.4 ± 9.2

Los datos (mg de proteína membranal) representan el promedio ± el error estándar de 12 determinaciones correspondientes a 4 cultivos diferentes.

ND = no determinado.

Ara C = citosín arabinósido

1/2 = cultivos crecidos con medio condicionado

1/1 = cultivos mantenidos con medio fresco

* = $p < 0.05$ ** = $p < .005$

Tabla 5

Células positivas a la enolasa específica neuronal (NSE+) presentes en cultivos hipotalámicos de 12 DIV.

76.4 ± 5.9
Ara C +, 1/2

56.3 ± 3.9
Ara C -, 1/2

50.4 ± 3.4
Ara C +, 1/1

Se utilizaron 4 cajas de cada condición, correspondientes a dos cultivos diferentes previamente tratados para inmunocitoquímica a la enolasa específica neuronal. Los platos teñidos se colocaron sobre la platina de un microscopio invertido. Se escogieron 10 campos al azar para cada plato, contándose todas las células teñidas (células NSE+) dentro del campo. Este conteo se repitió al menos una vez.

Los datos indican el promedio ± el error estándar del número de células NSE+ presentes en un campo.

Una propiedad probablemente asociada al efecto estimulante del medio condicionado sobre el desarrollo morfológico de las células neuronales, es el mayor contenido de TRH-IR presente en los cultivos tratados (Figura 7). Este efecto del medio condicionado se observa a todas las edades de cultivo analizadas (10, 12 y 14 DIV), tanto en cultivos tratados con Ara C (Figura 7a), como en cultivos mantenidos en su ausencia (Figura 7b), aunque las diferencias más acusadas se observaron en cultivos de 10 y 12 DIV en condiciones Ara C+ comparados con cultivos Ara C-. Es importante resaltar que estos resultados muestran el promedio de los valores obtenidos de pozos individuales de diferentes cultivos. El análisis por separado de los niveles de TRH detectados dentro de un mismo cultivo para cada una de las distintas condiciones experimentales, muestra una mayor tendencia a obtener valores de pmolas de TRH cercanos o en el límite de resolución del RIA en aquellos cultivos en los cuales se realizó el cambio total del medio.

Se analizó otro parámetro bioquímico relacionado con el catabolismo del TRH, la actividad de la piroglutamato aminopeptidasa II (PGA II). La actividad total por pozo de la enzima detectada en cultivos de hipotálamo Ara C+ de 12 DIV en condiciones en donde se llevó a cabo el reemplazamiento de medio por medio condicionado homólogo no muestra ser diferente de la condición control (Figura 8a). Sin embargo, ya que la cantidad de proteína membranal detectada en esta etapa *in vitro* es menor en esta condición (Tabla 4), la actividad específica de la PGA II se eleva significativamente (Figura 8) PGAII Cultivos + medio condicionado = 0.71 ± 0.08 pmolas HisProNH₂/min/ mg prot. membranal vs. PGAII cultivos - medio condicionado = 0.46 ± 0.5 , n= 12; p ≤ 0.005).

Las acciones del medio condicionado homólogo antes descritas podrían ser el resultado de un efecto mitogénico sobre la población neuronal y/o glial, o bien podrían deberse al efecto trófico de mantenimiento y prevención de la muerte neuronal, reflejado en cualquier caso como un aumento en el número de neuronas y en la promoción del crecimiento de sus neuritas. Aunque es difícil descartar cualquiera de estas posibilidades es poco probable que el fenómeno se deba a la estimulación de la división celular ya que no se observan diferencias significativas en los niveles de DNA por efecto del medio condicionado. Además se ha mostrado que en el hipotálamo de los roedores las últimas divisiones celulares se llevan a cabo entre los días 11 a 14 de gestación (Shimada y Nakamura, 1973), por lo que los cultivos murinos iniciados con tejido fetal de 14 días poseen una población compuesta esencialmente de neuronas diferenciadas (Faivre-Bauman y cols., 1984a), eliminando la posibilidad de la existencia de neuroblastos responsivos a factores mitogénicos. Por otra parte se ha descrito que la presencia de medio condicionado homólogo de células ganglionares de la retina del pollo permite a estas sobrevivir al reto de la exposición a la tetradoxina, la cual provoca una muerte neuronal extensiva (Lipton, 1986), por lo tanto es plausible la alternativa de un efecto trófico del medio condicionado sobre el mantenimiento de la población neuronal. El aumento en el contenido de TRH-IR observado en los cultivos crecidos en medio condicionado homólogo en los diferentes estadios *in vitro* analizados, podría ser el reflejo directo del estado general de "salud" o "calidad" de los mismos, o

mezcla 1:1 de medio condicionado de cultivos crecidos en paralelo y medio fresco sin suero. De esta manera la combinación resultante contenía a lo sumo 5 % de FBS. En estas condiciones los niveles de DNA, proteína y el desarrollo de las células neuronales y gliales mostró ser afectado de manera similar a nuestras observaciones (C. Guerra tesis de Licenciatura).

FIGURA 7

Figura 7

Efecto del medio condicionado homólogo sobre los niveles de TRH-IR en células hipotalámicas en cultivo.

Se emplearon cultivos hipotalámicos crecidos durante diferentes periodos in vitro (10, 12, 14 DIV) en presencia (Ara C+) o ausencia (Ara C-) del antimitótico citosín arabinósido.

El efecto del medio condicionado se determinó substituyendo cada 3 días el volumen total medio del cultivo, por un volumen similar de medio fresco (1/1) o por una mezcla 1:1 de medio fresco y medio condicionado homólogo (1/2).

El TRH presente en las células se determinó mediante un RIA específico (Joseph-Bravo y cols., 1981).

Las barras representan los pg de TRH / plato de 35 mm promedio \pm el error estándar del número de pozos individuales indicados, correspondientes a 4 cultivos distintos.

n.d.= no determinado

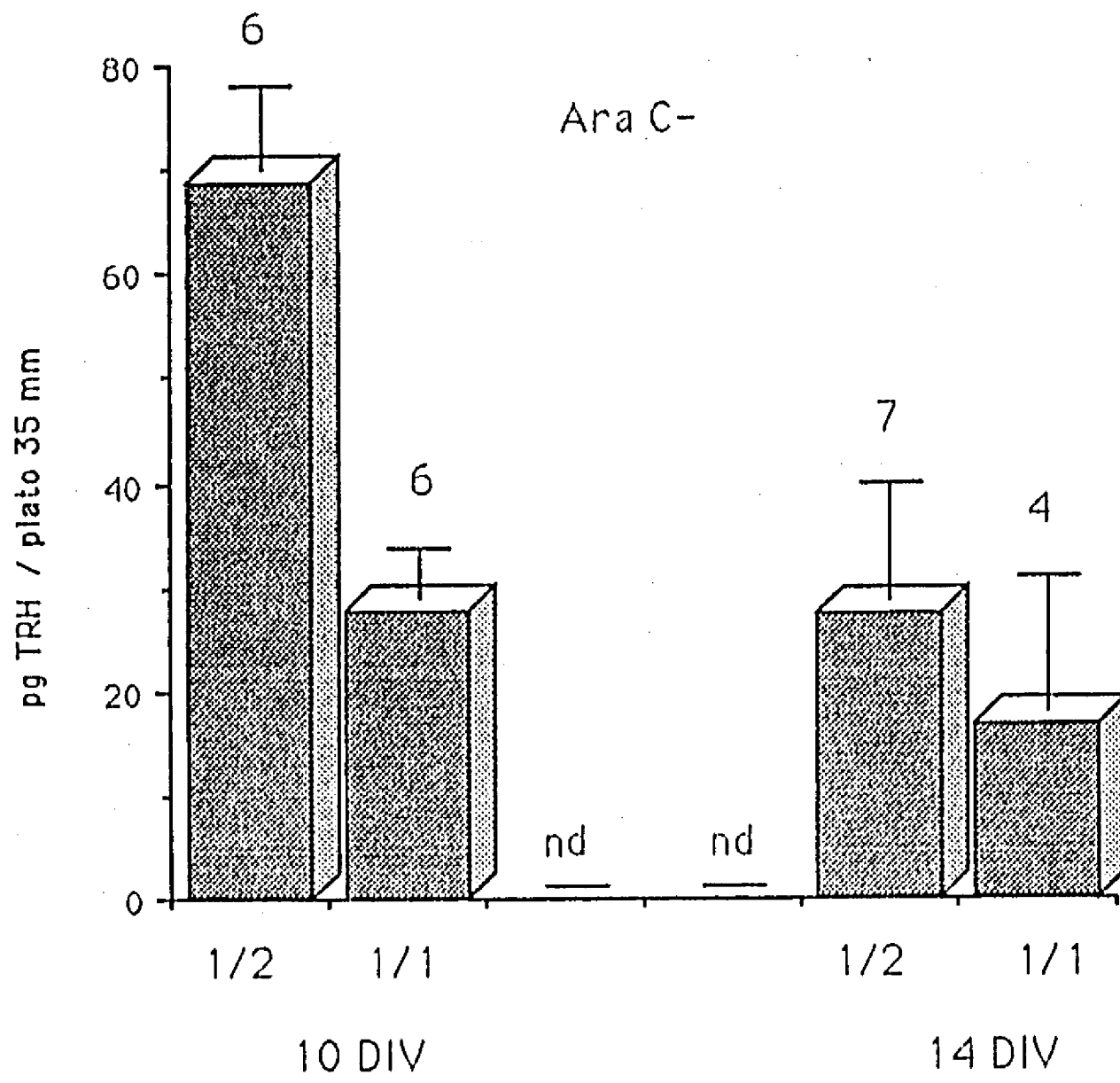
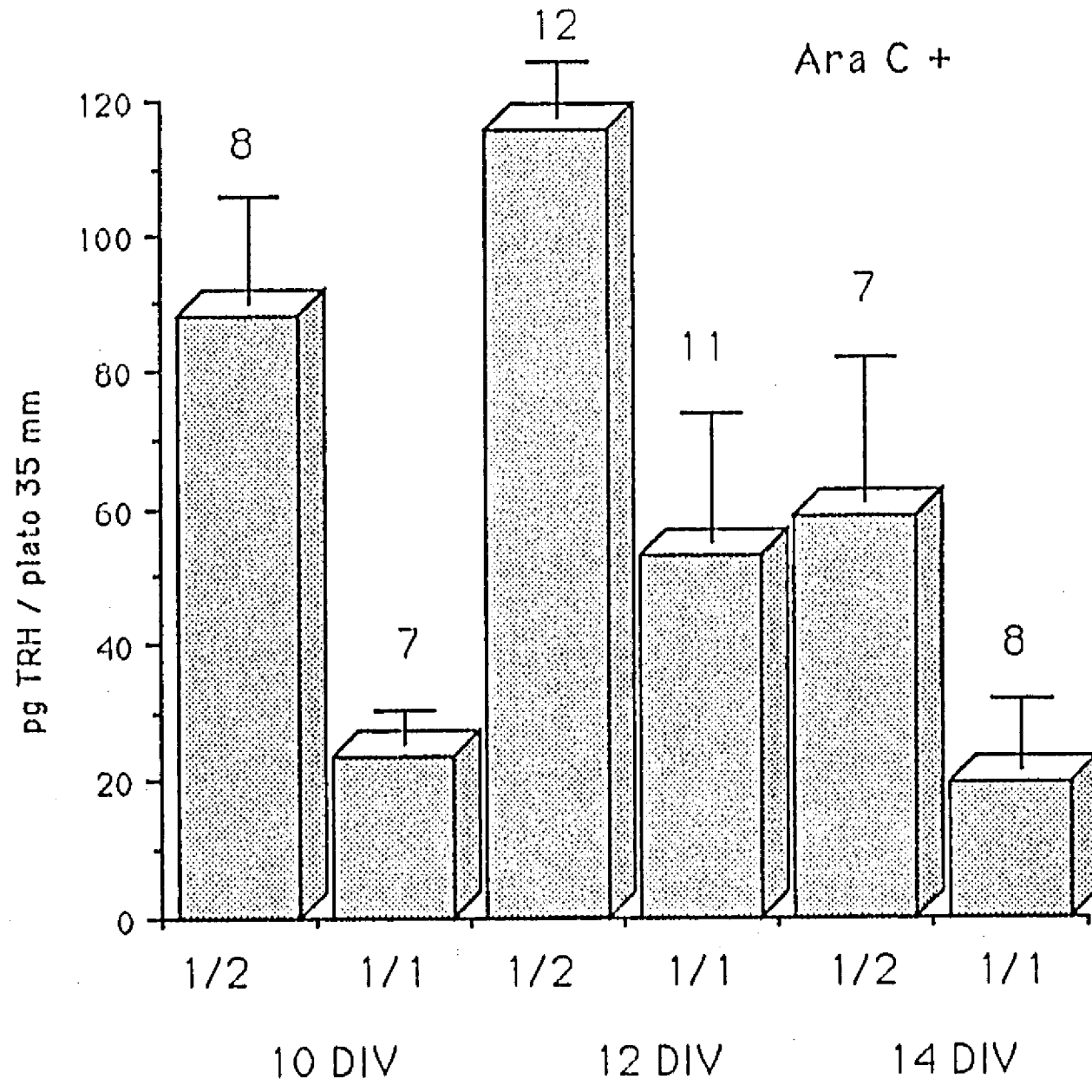


FIGURA 8

Figura 8

Efecto del medio condicionado sobre la actividad de PGAll en cultivos primarios de hipotálamo fetal.

Se emplearon cultivos hipotalámicos (Ara C+) en el 12 DIV.

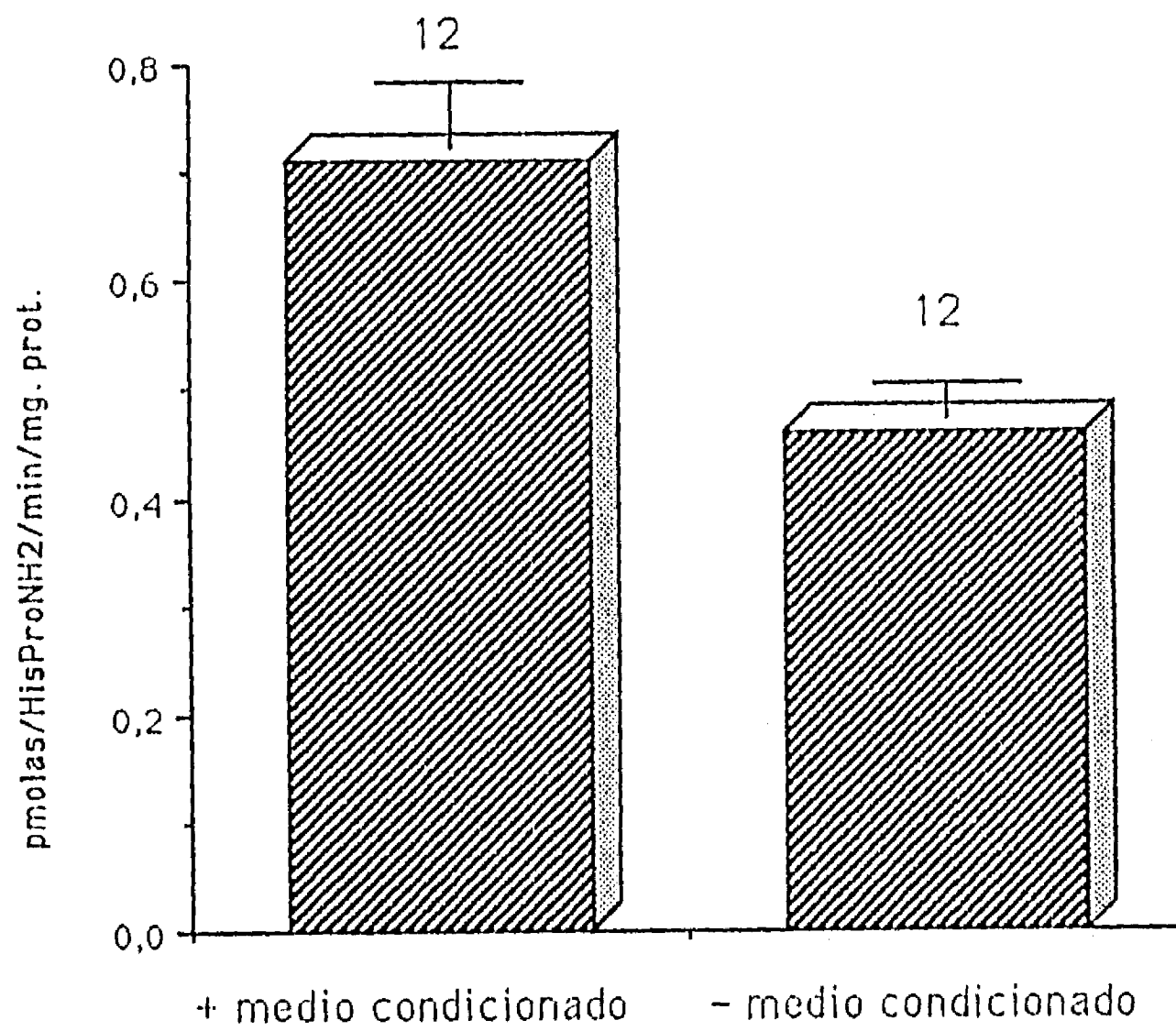
Se determinó el efecto de medio condicionado substituyendo cada 3 días el volumen total del medio de cultivo, por un volumen similar de medio fresco

(- medio condicionado) o por una mezcla 1:1 de medio fresco y medio condicionado homólogo (+ medio condicionado).

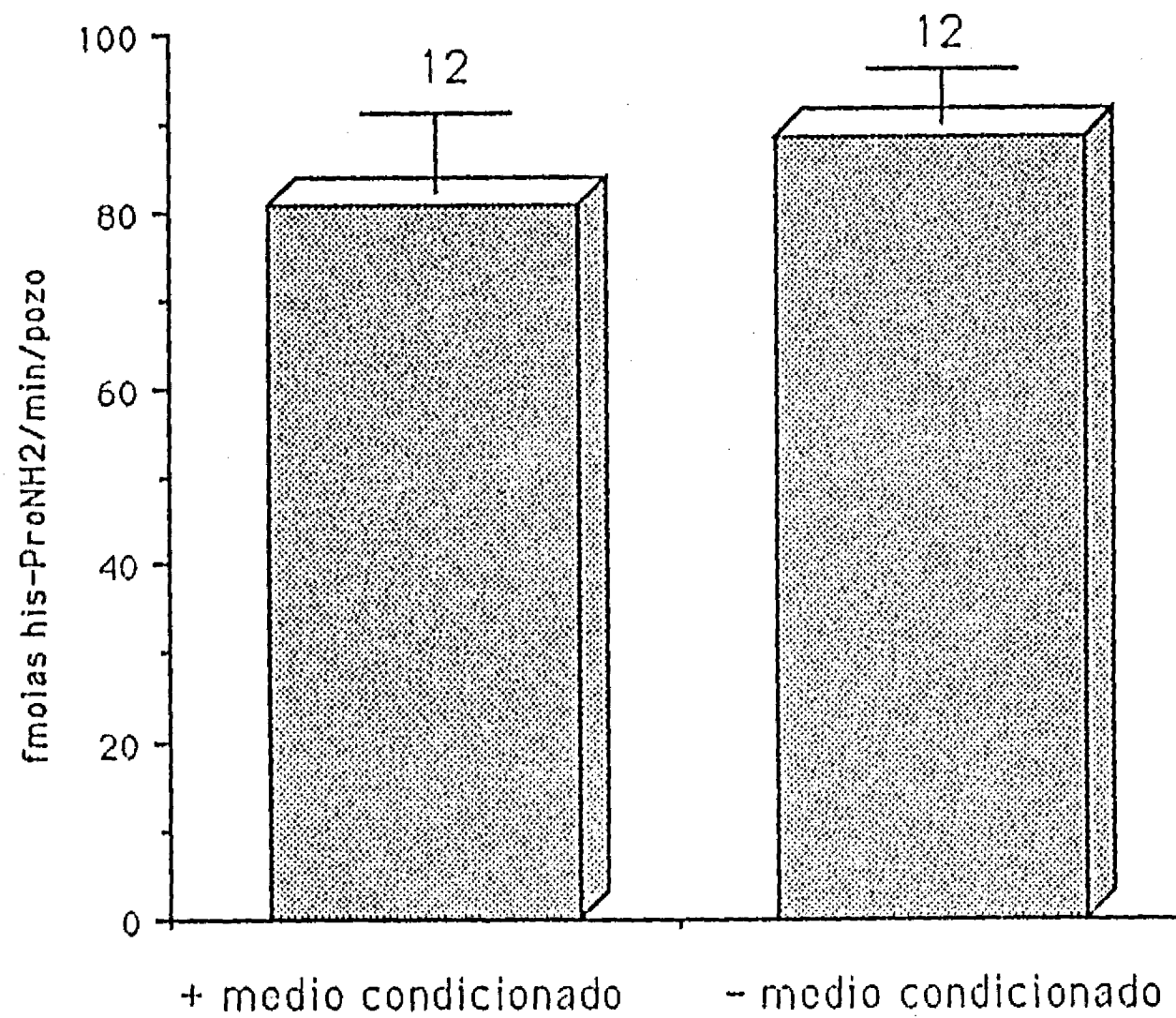
La actividad de la PGAll se ensayó en la fracción membranal, utilizando TRH-³H como substrato.

Las barras representan el promedio \pm el error estándar del número de platos individuales indicados correspondientes a 4 diferentes cultivos.

Actividad específica PGAll cultivos hipotálamo 12 DIV



Actividad total PGAll cultivos hipotálamo 12 DIV



bien deberse a un efecto específico por parte de factores presentes en el medio sobre la preservación y desarrollo de la población neuronal, en particular sobre las neuronas TRHérgicas.

Como se mencionó en la sección anterior la inclusión del citosín arabinósido al medio de cultivo, provoca en relación con cultivos no tratados una disminución en el número total de células presentes (determinado por el contenido de DNA), efecto asociado con la inhibición de la proliferación y desarrollo de la capa basal de células gliales. Este efecto del Ara C sobre la relación neurona/glia en los cultivos provoca, probablemente de manera indirecta, un efecto estimulador en el desarrollo de red neurítica. No obstante estas diferencias los niveles de TRH son similares en cultivos tratados o no con el antimetabólico, Ara C+ vs. Ara C- en las distintas etapas analizadas (Figura 7), lo cual parece ser indicativo que otros eventos además del mantenimiento de la población neuronal están relacionados con el efecto del medio condicionado sobre el contenido intracelular del péptido. Se ha mostrado que en este tipo de cultivos hipotalámicos los distintos mecanismos relacionados con el metabolismo de TRH, como la síntesis, procesamiento y mecanismos de liberación se desarrollan progresivamente *in vitro* (Faivre-Bauman y cols., 1988; Loudes y cols., 1989) y muestran paralelismo con el grado de desarrollo neuronal, de manera tal que a los 12 DIV las células ya han desarrollado sinapsis funcionales por criterios anatómicos y electrofisiológicos (Legendre y cols., 1988) y son capaces de sintetizar y liberar cantidades importantes de TRH (Faivre-Bauman y cols., 1986; **Publicación 3, tabla 1**). Por lo tanto la estimulación en el procesamiento del proTRH, una disminución en la liberación del péptido o una baja actividad de los mecanismos de degradación intracelulares, no pueden ser descartadas como alternativas para explicar este aumento en el contenido intracelular de TRH.

Existe la posibilidad de que los efectos promotores del desarrollo neuronal antes descritos en los cultivos tratados con el medio condicionado, se deban al uso de una concentración menor de suero (o de cualquiera de los otros componentes presentes), como resultado de la dilución del medio cada vez que se realiza el cambio ³. Sin embargo experimentos previos en el laboratorio (C. Guerra, tesis de Licenciatura) mostraron que los cultivos hipotalámicos a los cuales se cambió periódicamente el volumen total de medio, son muy similares tanto el patrón de desarrollo neuronal a lo largo de los mismos, como en las cantidades de DNA y proteína presentes, independientemente del porcentaje de suero presente en el medio de cultivo (5% o 10% de FBS); y únicamente se distinguen en el menor grado de desarrollo y diferenciación mostrado por la capa basal de células gliales de cultivos mantenidos en presencia de 10% de FBS.

La capacidad del medio condicionado homólogo de promover el desarrollo neuronal sugiere la mediación de factores difusibles celulares liberados al medio de cultivo. Se han descrito diversas actividades tróficas relevantes para el desarrollo del tejido nervioso tanto central como periférico presentes en medios condicionados de diferentes tejidos y sistemas (Nawa y Patterson, 1990; Nawa y Sah, 1990). Destacan en particular las que promueven la sobrevivencia neuronal (Banker, 1980; Varon y cols., 1984; Muller y cols., 1984, Grau-Wagemans y cols., 1984), las que estimulan la elongación

³ Es lógico suponer que en nuestras condiciones cada vez que se realiza un cambio de medio debe existir 10% de suero en el medio de los cultivos en los cuales se substituye el volumen total (al menos durante el periodo inicial del cambio), a diferencia de la condición del cambio de la mitad del volumen, en donde la proporción del suero en el medio debe ser 5% cuando menos.

neurítica (Collins, 1978; Dribin y Barret, 1982; Henderson y cols., 1981; Banker, 1980; Muller y cols., 1984) y aquellas que ejercen un efecto sobre la expresión fenotípica de alguna característica específica como el tipo de neurotransmisor sintetizado (Patterson y Chun, 1977). Se han aislado y caracterizado a lo largo de estos últimos años varios de estos factores neurotróficos permisivos; entre ellos se encuentran: el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico ciliar (CNF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) (Levi-Montalcini y Angeletti, 1968; Barden y cols., 1982; Barbin y cols., 1984; Walicke y cols., 1986, 1988; Unsicker y cols., 1987). En el caso particular de las células hipotalámicas se ha observado recientemente que factores como el IGF-I y el bFGF poseen efectos tróficos potentes tanto sobre la sobrevivencia y desarrollo de las células neuronales, como sobre la proliferación de las células gliales (Torres-Alemán y cols., 1990a,b).

Basados en el carácter eminentemente glial de la población no neuronal en cultivos hipotalámicos murinos (Benda y cols., 1975; Puymirat y cols., 1982), es posible especular sobre la participación de las células astrogiales en los efectos antes descritos. Se ha caracterizado a la astroglia como una fuente importante de factores tróficos solubles necesarios en el mantenimiento de neuronas centrales (Banker, 1980; Varon y cols., 1984; Muller y cols., 1984; Grau-Wagemans y cols., 1984). Se ha observado por ejemplo que el medio condicionado glial estimula la maduración morfológica, crecimiento y sobrevivencia de cultivos neuronales (Sensenbrenner y cols., 1980; Banker, 1980). En el caso de las neuronas peptidérgicas se ha sugerido que los astrocitos participan en los mecanismos de control de la liberación de oxitocina y vasopresina por parte de neuronas hipotalámicas (Hatten y cols., 1984). La descripción de que en cultivos corticales, la presencia de células gliales o el medio condicionado glial modifican la liberación basal y estimulada por forskolina de la somatostatina (Pares-Herbute y cols., 1988), mientras que el tratamiento de cultivos de neuronas simpáticas con medio condicionado de células no neuronales derivadas del ganglio cervical superior (formadas principalmente por células gliales de Schwann) estimula la expresión del RNAm a somatostatina, (Spiegel y cols., 1990), son resultados que ejemplifican la importancia que tiene la producción de factores solubles por parte de las células gliales en el control de la expresión y liberación de un mismo péptido en dos sistemas distintos.

No es posible descartar sin embargo otros efectos accesorios mediados por las células gliales. Por ejemplo se ha mostrado que las células astrogiales producen laminina la cual promueve la adhesión neuronal así como la elongación de neuritas en cultivos de células hipotalámicas (Faivre-Bauman y cols., 1984b), lo cual podría estar relacionado con el efecto trófico mostrado por los astrocitos sobre la regulación de la densidad sináptica en cultivos cerebelares (Meshel y cols., 1987), afectando de manera indirecta el contenido de los productos presentes en las terminales nerviosas.

Conclusión

Actualmente se reconoce que la funcionalidad del Sistema Nervioso Central depende en gran medida de las complejas interacciones que existen en el tiempo y en el espacio, entre los diversos tipos celulares que lo constituyen. Evidencias experimentales obtenidas *in vitro* muestran que la expresión de diversas actividades neuronales se ve influenciada por la presencia de células no neuronales, particularmente por células gliales (Pares-Herbutte y cols., 1988; Spiegel y cols., 1990), efectos que parecen ser mediados tanto por contactos celulares directos, como por la producción y liberación al medio de factores solubles. Probablemente como consecuencia de lo anterior se ha mostrado en algunos casos que el desarrollo y expresión de actividades metabólicas en cultivos puros es diferente de los cultivos celulares mixtos formados por poblaciones celulares de ambos tipos. De esta manera uno de los objetivos planteados al inicio de este trabajo fue el compromiso de desarrollar cultivos mixtos que en lo posible reflejaran las interacciones neurona-glia existentes *in vivo*. Los cultivos primarios derivados de tejido nervioso fetal de ratón que hemos desarrollado se encuentran compuestos por una mezcla de diferentes estirpes celulares. El análisis de los mismos muestra la existencia de una población importante de células neuronales, (identificadas tanto por sus características morfológicas, como por su inmunoreactividad a la enolasa específica neuronal) y cuya presencia se relaciona con el desarrollo de actividades asociadas a diversas subpoblaciones neuronales: neuronas GABAérgicas (actividad de GAD y síntesis *de novo* de GABA; neuronas TRHérgicas (síntesis y liberación de TRH).

Uno de los objetivos específicos de estos estudios fue el establecimiento de condiciones metodológicas que permitieran mejorar la "calidad" de los cultivos, reflejada particularmente en la producción de TRH. Estudios en otros sistemas de cultivo de células hipotalámicas muestran que factores como el substrato empleado o el método de dispersión influyen en el establecimiento de la población neuronal TRHérgica. (Faivre-Bauman y cols., 1986; Glentowski y cols., 1986). En nuestras manos, las modificaciones en el protocolo original relacionados con el método de dispersión, la preparación de los platos, el uso de antimitóticos o de medio condicionado homólogo, han permitido obtener preparaciones que expresan y liberan niveles significativos de TRH, y que comparados con los cultivos desarrollados al inicio de estos trabajos muestran un mayor grado de reproducibilidad. Otras estrategias como la utilización de ascorbato en el medio (Glentowski y cols., 1986) podrían ser empleadas para la obtención niveles superiores del péptido. Las propiedades electrofisiológicas y anatómicas a nivel de microscopía electrónica mostradas por las neuronas en cultivos murinos muy similares a los nuestros (Legendre y cols., 1988), en conjunto con las características anatómico-funcionales antes descritas, permiten validar la utilización de los mismos como modelos experimentales *in vitro* del estudio de la bioquímica celular de las neuronas en general, en especial de aquellas que sintetizan TRH y otros neuropéptidos.

OBJETIVOS y METAS

Como se mencionó anteriormente, existe en el cerebro de los mamíferos una piroglutamato aminopeptidasa membranal (PGAII) que degrada *in vitro* al TRH. La alta especificidad mostrada por la enzima con respecto al TRH, su localización heterogénea en el cerebro y su abundancia en la fracción enriquecida en terminales nerviosas, son características que sugieren un posible papel de la enzima en el metabolismo extracelular del neuropéptido. Consideramos sin embargo que la definición de características tales como la localización celular específica de la PGAII y la topología que presenta en la membrana plasmática eran eventos celulares de gran importancia para establecer el papel específico y la relevancia fisiológica que esta peptidasa posee en la inactivación de la señal biológica del TRH.

El trabajo experimental realizado tuvo así como propósito fundamental el tratar de resolver las siguientes preguntas:

- a) ¿ Como se encuentra orientada la PGAII en la membrana plasmática de las células nerviosas ?
- b) ¿Cuál o cuáles son los tipos celulares en donde se localiza a la PGAII ?,

Los resultados obtenidos se describen en el siguiente capítulo y en las siguientes publicaciones:

1.- J-L Charli, C. Cruz, M.A. Vargas and P. Joseph-Bravo (1988). The narrow specificity Pyroglutamate Amino Peptidase degrading TRH in rat Brain is an ectoenzyme. Neurochem. Int. 13(2): 236-242.

2.- C. Cruz, J.L. Charli, M.A. Vargas and P. Joseph-Bravo (1991). Neuronal localization of Pyroglutamyl Peptidase II in primary cultures of fetal mouse brain. J. Neurochem., 56: 1594-1601.

De manera paralela a estos trabajos, se llevaron a cabo experimentos tendientes a resolver la participación de las enzimas solubles PGAI y PE en el control de los niveles intracelulares del TRH en el hipotálamo de los roedores, trabajo que se llevó a cabo en colaboración con M. Méndez y cuyos resultados relevantes a cultivo se encuentran descritos en la publicación 3 y en el apéndice anexo a esta tesis.

3.- M. Méndez, C. Cruz, P. Joseph-Bravo, S. Wilk and J-L Charli (1990) Evaluation of the role of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I in the metabolism of LHRH and TRH in brain. Neuropeptides 17:55-62.

Estrategias experimentales

Orientación sobre la membrana plasmática de las células nerviosas de la PGAlI

La determinación de la orientación de la PGAlI sobre la membrana plasmática de las células nerviosas se llevó a cabo en dos modelos experimentales in vitro: la preparación de terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) obtenidas del cerebro completo de la rata y los cultivos primarios de células de corteza fetal del ratón; las cuales poseen actividades significativas de la enzima presentes en las fracciones de membrana plasmática correspondientes (O'Connor y O'Cuinn, 1984; Torres y cols., 1986 y resultados publicación 2).

Las estrategias experimentales utilizadas consistieron en:

- a) Determinar si en la preparación sinaptosomal y en células en cultivo intactas incubadas en presencia de TRH [3 -H Pro] se detectaba la aparición del metabolito His-Pro[3 H]NH₂ en el medio de incubación, un índice de la actividad de PGAlI.
- b) Mostrar si la lisis de los sinaptosomas por medio de un shock osmótico o la permeabilización de la membrana plasmática de las terminales nerviosas por efecto de diversos detergentes como el Triton X-100 y la saponina eran capaces de exponer sitios internos y por lo tanto incrementar la actividad de PGAlI. El efecto permeabilizante de la saponina se ensayó también en la preparación de células intactas.
- c) Determinar si la digestión suave de las proteínas presentes en la membrana plasmática de los sinaptosomas ó de las células intactas en cultivo, mediante el tratamiento previo de la mismas con tripsina, estaba asociada a la disminución de la actividad de la enzima membranal. La especificidad de la acción de la tripsina sobre la actividad de las proteínas membranales y no sobre todas las proteínas en general por ruptura membranal, se verificó midiendo la actividad presente de las enzimas solubles LDH y PGAl; además en el caso de la preparación de células intactas se determinó la viabilidad de la preparación mediante la tinción de las células con el colorante vital azul tripano.

Localización celular de la PGAlI

Se utilizaron cultivos primarios de corteza e hipotálamo fetal del ratón, sometidos a diferentes condiciones experimentales que estimularon el enriquecimiento o la desaparición de un tipo celular específico, de manera tal que los resultados obtenidos fueran indicativos de la presencia de la PGAlI en una población celular determinada (neuronas y/o células gliales). Con tal objeto se decidió:

- a) Comparar la actividad de PGA II presente en cultivos hipotalámicos mantenidos en presencia del antimitótico citosín arabinósido (por efecto del cual se modifica la relación neuronal/glial), con respecto a la existente en cultivos no tratados.
- b) Establecer si la desaparición específica de la población neuronal en los cultivos de corteza por efecto del agente neurotóxico glutamato, se veía acompañada de la disminución paralela en la actividad de PGAlI.
- c) Determinar la actividad presente en cultivos puros de astroglia.

RESULTADOS PUBLICADOS (Trabajos)

Publicación 1

Orientación membranal de la PGA II

Los sinaptosomas intactos obtenidos del cerebro de la rata incubados en presencia de ^3H -TRH mostraron una actividad degradativa de PGAll similar a la observada en la preparación de membranas sinaptosomales obtenidas por shock osmótico (tabla 1). La permeabilización de la membrana sinaptosomal por efecto de la saponina produjo un aumento significativo en la actividad de la enzima (42% sobre el control), en tanto que el tratamiento de los sinaptosomas intactos con el detergente Triton X-100 solo causó un pequeño, pero no significativo aumento en su actividad (tabla 1). El pretratamiento de las terminales nerviosas con tripsina redujo fuertemente la actividad de la PGAll, efecto que se mostró dependiente del tiempo de incubación con la tripsina y que alcanzó un grado de inhibición del 75% a los 20 minutos. Bajo las mismas condiciones la actividad de la enzima soluble LDH no se modificó, lo cual indica que la acción de la tripsina ocurrió únicamente sobre las ectoproteínas de la membrana y no fue un efecto generalizado sobre todas las proteínas celulares (tabla 2). Estos datos en conjunto sugieren que un alto porcentaje de la actividad detectada en los sinaptosomas se encuentra sobre la cara externa de la membrana plasmática.

Las células intactas de corteza cerebral en cultivo fueron capaces de transformar ^3H TRH exógeno a His- ^3H ProNH₂, proceso degradativo que mostró ser proporcional al tiempo de incubación hasta por 30 minutos. La actividad total detectada en las células intactas fue similar a la observada en la preparación membranal equivalente. La actividad de PGAll detectada en las membranas de las células no se modificó preincubar con yodoacetamida, la cual inhibe por completo a la PGAI (5 min, 37° C, 0.25 mM), ni con un lavado previo de las membranas con 1 M de NaCl, lo cual apoya la especificidad del ensayo utilizado en la determinación de la PGAll y descarta la posibilidad de que la actividad detectada sea el resultado de la acción de la PGAI soluble, cuya actividad específica en cultivo es muy elevada (tabla 4). Estas evidencias son indicativas de la presencia de la PGAll en el lado externo de la membrana de las células nerviosas.

La permeabilización de las células intactas con saponina (efecto determinado por la tinción celular con azul tripano) produjo un hinchamiento generalizado de las células, principalmente en las que poseen apariencia neuronal, lo que ocasionó la alteración de la red de neuritas. Estos eventos morfológicos estuvieron acompañados por una disminución significativa de la actividad total de PGA II y proteína membranal, pero no de la actividad específica (tabla 3, exp. 1), lo cual sugiere que el decremento en la actividad se debe a la pérdida de material celular durante el proceso de lavado de la preparación subsecuente a la incubación con la saponina. A concentraciones mucho menores de saponina las células permeabilizadas mantuvieron su organización y apariencia características, sin pérdida aparente de la proteína membranal. Bajo estas condiciones solo se observó una ligera disminución de la actividad de PGAll tanto total, como específica (tabla 3, exp. 2 y 3).

La preincubación de las células corticales con tripsina produjo una disminución considerable de la actividad de PGAll (70% del control), sin afectar la actividad de la LDH y PGAI o alterar la organización histotípica de los cultivos (tabla 4).

La caracterización del tipo o tipos celulares en donde se localiza la PGAll se llevó a cabo en células intactas y en preparaciones membranales obtenidas de cultivos mixtos de corteza e hipotálamo fetal de ratón, así como en cultivos puros gliales.

Se detectó actividad de la PGAll en cultivos de corteza e hipotálamo fetal a lo largo del desarrollo *in vitro* de los mismos (tabla 1). Dado que la actividad total y la proteína membranal siguieron un curso paralelo durante los distintos días no hubo diferencia en la actividad específica al inicio o al final de los mismos (4 DIV - 14 DIV), sin embargo la actividad detectada en las células corticales mostró ser ligeramente mayor que la determinada en las células del hipotálamo (tabla 1). En estas etapas se localizaron neuronas en diferentes etapas de desarrollo (identificadas por su tinción positiva contra el anticuerpo anti NSE) (fig. 1 a,c).

La adición del antimetabólico citosín arabinósido (Ara C+) al 5 DIV a los cultivos primarios hipotalámicos detuvo la proliferación extensiva de las células no neuronales: los niveles de DNA en cultivos tratados (Ara C+) de 10 DIV fueron 67% mayores a los observados en los cultivos no tratados (Ara C-) (tabla 2). El efecto del antimetabólico se vió reflejado en diferencias morfológicas relacionadas con el grado de desarrollo de las células neuronales (fig. 1c, 1d). Los cultivos hipotalámicos Ara C+ mostraron mayor número de células NSE positivas (Resultados sección cultivo, Tabla 5), así como un desarrollo más extenso de la red neurítica. La actividad específica de PGAll en los cultivos Ara C+ fue 1.6 mayor que en los cultivos Ara C- (fig. 2); por otra parte la relación entre la actividad de PGAll y el número de células (PGAll/ μ g DNA) aumentó 3 veces comparado con los cultivos no tratados (Tabla 2). En contraste, la actividad específica de la PGAl aumentó de manera significativa en los cultivos no tratados con el antimetabólico (fig. 2).

La adición del glutamato a los cultivos de corteza de 12 DIV (0.5 mM, 5 min) provocó un hinchamiento inmediato del cuerpo celular de las neuronas (fig. 3b vs.3a), las cuales regresaron a su morfología original minutos después de la eliminación del aminoácido del medio de cultivo. Sin embargo con el paso de las horas, se observó una progresiva y extensa degeneración neuronal (fig. 3c), la cual se hizo más evidente en las células neuronales organizadas en pequeños grupos. Este proceso degenerativo mostró ser específico de la población neuronal, ya que no se observaron cambios aparentes en la morfología de las células que conforman la capa basal glial subyacente. La destrucción de las células neuronales por efecto del glutamato mostró ser un proceso dependiente del tiempo (observaciones cualitativas) que correlaciona con una disminución concomitante en la actividad de PGAll tanto en la fracción membranal (fig. 4), como en las células intactas (fig. 5). Como un control del efecto neurotóxico específico del glutamato, se midió la actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), enzima presente exclusivamente en la población de neuronas GABAérgicas. La determinación de la enzima se llevó a cabo en cultivos derivados de corteza debido a la mayor proporción de células GABAérgicas existentes en esta área cerebral comparada con el hipotálamo. La actividad específica de la GAD en los cultivos tratados con el glutamato disminuyó alrededor de un 35% cuando se le compara con la presente en cultivos no tratados (fig. 4).

Cuando los cultivos corticales se mantuvieron por espacio de más de 3 semanas *in vitro* se produjo una degeneración neuronal espontánea y progresiva, al término de la cual solo sobrevivieron células poligonales aplanadas identificadas como células gliales mediante la tinción con el anticuerpo específico contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). En estos cultivos al igual que en cultivos gliales puros obtenidos a partir de tejido cortical de ratones recién nacidos (McCarthy y de Vellis, 1980) (fig. 1f) no se pudo detectar PGAll. En contraste los cultivos gliales mostraron una actividad muy alta de la PGA I soluble (fig. 2), comparable a la presente en los cultivos Ara C- del hipotálamo y superior a la existente en cultivos de hipotálamo o corteza Ara C+ (fig. 2 y Apéndice Fig.10).

DISCUSION GENERAL

Topología transmembranal de la PGA II

Se han establecido diversos requisitos que deben ser cumplidos para que una enzima pueda ser considerada dentro de la categoría de las ectoenzimas (es decir proteínas intrínsecas de la membrana plasmática que poseen su sitio activo localizado sobre la cara extracelular (Tabla 6).

Los datos obtenidos en dos sistemas experimentales *in vitro* (sinaptosomas y células en cultivo primario) muestran que la PGAll presente en las células en cultivo es una auténtica ectoenzima. Esta conclusión se deriva de las siguientes observaciones:

1) Se detectó a la actividad degradativa de la enzima tanto en la preparación sinaptosomal, como en la de células intactas mediante la utilización de un sustrato no permeable.

La posibilidad de que el HisProNH₂ detectado en el medio de incubación haya sido el producto de la acción de la PGA I soluble (o de una poza intracelular de PGAll) en el interior celular como resultado de la captura del TRH y su posterior expulsión, no es consistente con las características del curso temporal de la degradación, la cual mostró un comportamiento lineal antes de alcanzar una meseta. Se ha mostrado que las terminales nerviosas son incapaces de internalizar al TRH-³H (Parker y cols., 1977; H.Torres, J.L. Charli y P. Joseph-Bravo, resultados no publicados) y aunque se ha descrito la acumulación de TRH marcado por parte de rebanadas hipotalámicas (Charli y cols., 1984), la V_{max} del fenómeno es muy baja, por lo que no se considera que juegue un papel significativo en los mecanismos de inactivación del TRH. Además en el caso de los cultivos primarios los ensayos se llevaron a cabo en condiciones en donde la actividad de la enzima soluble PGA I se encontraba inhibida casi al 100% (Apéndice, Fig. 9 y Publicación 3), por lo que se descarta la participación de esta enzima.

2) La actividad de PGAll se redujo drásticamente como resultado de la digestión mediada por tripsina de las proteínas membranales.

Es posible descartar la posible participación de PGA I (o PGAll) liberadas al medio extracelular como resultado de la muerte de las células o de la ruptura de las terminales nerviosas por efecto del tratamiento con tripsina ya que tanto la actividad de la PGA I, como la de LDH otra enzima soluble, se mantuvieron intactas (Publicación 1, tablas 2 y 4).

Cuando los cultivos corticales se mantuvieron por espacio de más de 3 semanas *in vitro* se produjo una degeneración neuronal espontánea y progresiva, al término de la cual solo sobrevivieron células poligonales aplanadas identificadas como células gliales mediante la tinción con el anticuerpo específico contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). En estos cultivos al igual que en cultivos gliales puros obtenidos a partir de tejido cortical de ratones recién nacidos (McCarthy y de Vellis, 1980) (fig. 1f) no se pudo detectar PGAlI. En contraste los cultivos gliales mostraron una actividad muy alta de la PGA I soluble (fig. 2), comparable a la presente en los cultivos Ara C- del hipotálamo y superior a la existente en cultivos de hipotálamo o corteza Ara C+ (fig. 2 y Apéndice Fig.10).

DISCUSION GENERAL

Topología transmembranal de la PGA II

Se han establecido diversos requisitos que deben ser cumplidos para que una enzima pueda ser considerada dentro de la categoría de las ectoenzimas (es decir proteínas intrínsecas de la membrana plasmática que poseen su sitio activo localizado sobre la cara extracelular (Tabla 6).

Los datos obtenidos en dos sistemas experimentales *in vitro* (sinaptosomas y células en cultivo primario) muestran que la PGAlI presente en las células en cultivo es una auténtica ectoenzima. Esta conclusión se deriva de las siguientes observaciones:

1) Se detectó a la actividad degradativa de la enzima tanto en la preparación sinaptosomal, como en la de células intactas mediante la utilización de un substrato no permeable.

La posibilidad de que el HisProNH₂ detectado en el medio de incubación haya sido el producto de la acción de la PGAl soluble (o de una poza intracelular de PGAlI) en el interior celular como resultado de la captura del TRH y su posterior expulsión, no es consistente con las características del curso temporal de la degradación, la cual mostró un comportamiento lineal antes de alcanzar una meseta. Se ha mostrado que las terminales nerviosas son incapaces de internalizar al TRH-³H (Parker y cols., 1977; H.Torres, J.L. Charli y P. Joseph-Bravo, resultados no publicados) y aunque se ha descrito la acumulación de TRH marcado por parte de rebanadas hipotalámicas (Charli y cols., 1984), la Vmax del fenómeno es muy baja, por lo que no se considera que juegue un papel significativo en los mecanismos de inactivación del TRH. Además en el caso de los cultivos primarios los ensayos se llevaron a cabo en condiciones en donde la actividad de la enzima soluble PGAl se encontraba inhibida casi al 100% (Apéndice, Fig. 9 y Publicación 3), por lo que se descarta la participación de esta enzima.

2) La actividad de PGAlI se redujo drásticamente como resultado de la digestión mediada por tripsina de las proteínas membranales.

Es posible descartar la posible participación de PGAl (o PGAlI) liberadas al medio extracelular como resultado de la muerte de las células o de la ruptura de las terminales nerviosas por efecto del tratamiento con tripsina ya que tanto la actividad de la PGAl, como la de LDH otra enzima soluble, se mantuvieron intactas (Publicación 1, tablas 2 y 4).

Tabla 6

Criterios para definir a una ectoenzima

- a) La actividad de la enzima debe ser detectada utilizando células intactas.
- b) La enzima no debe ser liberada al medio externo
- c) El substrato utilizado para detectar a la enzima, debe ser alguno que en lo posible no penetre a las células.
- d) La ruptura de la células no debe estar acompañada por un aumento en la actividad de la misma.
- e) Los productos de la reacción enzimática se deben localizar en el exterior de la célula.
- f) Se debe inhibir a la enzima selectivamente, mediante la utilización de reactivos que se unan a la misma de manera covalente y que además no penetren a la célula.

(Tomado de Karnovski M.L., 1986; Cellular Biology of Ectoenzymes.)

La actividad de tiroliberinasa presente en el medio recién suplementado con suero fetal bovino al 10% fue muy baja (2.0 ± 0.5 fmolas His-ProNH₂/min/ml medio) y representó únicamente el 0.5% de la actividad total detectada en el caso de las células intactas no lavadas previamente antes del ensayo, eliminando la posibilidad de un efecto inespecífico debido a la adsorción de la enzima sobre la membrana de las células. Tampoco se detectó actividad degradativa significativa de PGAll en el medio de cultivo mantenido en presencia de las células por espacio de 3 días, lo cual descarta una posible liberación constitutiva de la enzima por parte de las células.

3) La actividad de la PGA II no se incrementó por efecto de la homogenización, permeabilización o solubilización de la membrana tanto en las células, como en las terminales nerviosas, a excepción de un incremento en los sinaptosomas tratados con saponina. La posibilidad de que exista una poza intracelular de la enzima no se descarta, sin embargo es probable que este detergente pueda haber desenmascarado sitios de la enzima presentes en la membrana, como se ha descrito para otras ectoenzimas como la 5'nucleotidasa de los granulocitos del cobayo (De Pierre y Karnovsky, 1974). Este efecto no se observó en las células en cultivo debido posiblemente a las menores concentraciones de saponina utilizadas en los experimentos 2 y 3 y a que en el caso del experimento 1 la saponina produjo una pérdida de material membranal (Publicación 1, tabla 3).

Localización celular de la PGAll

Como se mencionó anteriormente nuestros cultivos primarios de corteza fetal crecidos en medio suplementado con suero fetal bovino, poseen una actividad considerable de la PGAll. En contraste a estos datos se ha descrito que cultivos hipotalámicos murinos mantenidos en medio definido no son capaces de degradar TRH exógeno añadido al medio de incubación (Faivre-Bauman y cols., 1986, 1988). Esta discrepancia de resultados no se debe a diferencias regionales ya que una actividad muy similar a la de corteza se encuentra también presente en los cultivos hipotalámicos, ni tampoco a la contaminación de tiroliberinasa presente en el suero fetal añadido al medio de cultivo (ver inciso anterior). Es probable que factores presentes en el suero sean necesarios para inducir la actividad de la enzima en las células en cultivo.

La actividad de PGAll se detectó tanto en cultivos hipotalámicos como de corteza cerebral en etapas tan tempranas como 4DIV⁴. En cultivos hipotalámicos murinos esta etapa representa una fase primitiva del desarrollo neuronal, en donde se observa tanto excitabilidad como actividad eléctrica espontánea, pero en donde aún no se desarrollan contactos sinápticos maduros (Legendre y cols., 1988). Estos datos sugieren que la expresión de la enzima *in vitro* es parcialmente independiente de la formación de sinapsis funcionales. Estudios ontogenéticos llevados a cabo en nuestro laboratorio sobre el patrón de desarrollo de la PGAll *in vivo*, muestran que la actividad más alta de la enzima en el cerebro se observa en etapas tempranas postnatales, mientras la sinaptogénesis se lleva a cabo (M.A. Vargas, J. Herrera, J.L. Charli y P. Joseph-Bravo, sometido).

⁴ Experimentos recientes en nuestro laboratorio muestran al igual que nuestros resultados que la actividad específica de la PGAll es muy similar a lo largo del desarrollo de cultivos de corteza cerebral derivados de tejido fetal de la rata. (J.L.Redondo no publicado)

Una evidencia importante de la presencia de PGAlI en las células neuronales es el incremento significativo de su actividad específica observado en los cultivos hipotalámicos en donde se estimuló un aumento en la relación neurona/glia, como resultado de la inclusión del antimetabólico Ara C. No se puede sin embargo excluir la posibilidad de otros efectos indirectos mediados por la Ara C, como ha sido reportado en otros sistemas de cultivo (Sisken y cols., 1985; Patel y cols., 1988).

Una de las estrategias experimentales utilizadas *in vivo* e *in vitro* para tratar de definir la localización celular de algunas peptidasas, ha sido el empleo de moléculas que afectan la sobrevivencia de las células neuronales (neurotoxinas) (Koshiya y cols., 1984; Waskman y cols., 1986b). Dentro de estas neurotoxinas es de especial interés el glutamato, el cual se encuentra presente en alta concentración en el Sistema Nervioso Central de los mamíferos (rango milimolar), en donde participa normalmente en el proceso de la transmisión sináptica excitatoria (Curtis y Johnston, 1974). Sin embargo se sabe también que la exposición sostenida de este aminoácido provoca la degeneración selectiva neuronal en todas las áreas del cerebro en donde se ha probado (Olney y cols., 1969, 1971; Coyle y cols., 1981). Se ha propuesto que este efecto neurotóxico del glutamato podría participar específicamente en la pérdida neuronal asociada a diversas enfermedades neurológicas, como la atrofia olivopontocerebelar, la enfermedad de Huntington, la epilepsia y las embolias entre otras (Choi, 1988). Se ha mostrado que el glutamato tiene un efecto más potente que el kaínico en la destrucción neuronal *in vitro* (Choi y cols., 1987a), de manera tal que su exposición por un tiempo breve provoca la destrucción extensa de neuronas de corteza cerebral del ratón mantenidas en cultivo, sin afectar a la capa basal de células gliales (Choi y cols., 1987a), efecto que se muestra altamente dependiente de factores como iones, temperatura, pH, tiempo de exposición y edad del cultivo (Choi y cols., 1987b; Favaron y cols., 1988). Este antecedente sirvió como base experimental para definir la localización celular de la PGA II.

La reducción significativa en la actividad de la enzima, asociada a la degeneración neuronal selectiva *in vitro* que observamos como resultado de la exposición de los cultivos corticales al glutamato, es un argumento que apoya la localización neuronal de la PGAlI. La actividad de la GAD, otra enzima neuronal, disminuyó también de manera significativa pero en menor grado por efecto de la neurotoxina que la PGAlI ($34 \pm 4\%$ vs $56 \pm 6\%$ de los valores controles respectivos). Esto podría ser atribuible a la resistencia selectiva que muestran ciertas poblaciones celulares al efecto de las neurotoxinas (Monaghan y cols., 1982; Greenamyre y cols., 1985). En particular, las neuronas inmunoreactivas a GABA en cultivos corticales parecen tener una resistencia moderada después de la exposición de ciertas concentraciones del análogo del glutamato, el N-metil D-aspartato (Tecoma y Choi, 1989). Otras subpoblaciones de neuronas del cerebro anterior que contienen somatostatina y la enzima NADPH-diaforasa, muestran resistencia al quinolinato (un análogo del NMDA), en tanto son muy vulnerables al efecto del glutamato (Koh y cols., 1986). Es posible que las actividades residuales de la PGAlI y GAD pudieran ser el reflejo de una distribución celular específica de los receptores al glutamato o bien deberse a la eliminación incompleta de las diferentes poblaciones neuronales, como resultado de las condiciones del ensayo utilizadas.

No se ha observado degradación de TRH en cultivos primarios de astroblastos, ni en astroblastos diferenciados a astrocitos por efecto de AMPc (Bauer, 1987b), y solamente una actividad muy pequeña de PGAlI se encuentra presente en la línea celular glial C6 (Wilk y cols., 1988), la cual por el contrario posee una actividad muy alta de PGAlI. Estos reportes coinciden con la ausencia de actividad degradativa de PGAlI observada en los cultivos gliales puros y en la población de células poligonales de naturaleza glial que permanecen luego de la degeneración neuronal espontánea.

Un reporte preliminar en la literatura mostró la degradación de TRH asociada a la actividad de PGAlI por parte de cultivos puros neuronales (Bauer, 1987), dato que ha sido confirmado recientemente (Bauer y cols., 1990). Además se ha descrito la presencia de la enzima en células de la línea tumoral neuronal neuro-2A (Wilk y cols., 1988). Estos datos aunados a los resultados aquí reportados proporcionan evidencias que sugieren fuertemente la presencia de la actividad degradativa de TRH mediada por la PGAlI asociada a la membrana plasmática de las neuronas en cultivo.

Es importante señalar sin embargo que en el caso de la endopeptidasa 24.11 (encefalinas) descrita inicialmente como una enzima glial a partir de su presencia en cultivos de astrocitos puros (Horthemske y cols., 1983), se mostró posteriormente su localización neuronal específica mediante diversos estudios *in vitro* o *in vivo* (Waskman y cols., 1986; Barnes y cols., 1988; Back y Gorenstein, 1989), por lo que la presencia neuronal de PGAlI deberá ser confirmada mediante el uso de técnicas complementarias (histoquímica, hibridización in situ del RNAm específico, inmunohistoquímica acoplada a substratos fluorogénicos).

CONCLUSION

Papel de la degradación extracelular en el metabolismo de los neuropéptidos.

Uno de los requisitos básicos que deben ser cumplidos para que un péptido funcione en la comunicación nerviosa, es la existencia de mecanismos de inactivación rápidos y eficientes que terminen la acción biológica del mismo. En analogía con lo que ocurre en la unión neuromuscular en el proceso de hidrólisis de la acetilcolina por parte de la enzima acetilcolinesterasa, se ha sugerido la posibilidad de que existan peptidasas en la vecindad de los receptores a estos péptidos, de manera tal que la acción concertada de los mismos permita la transmisión continua de las señales biológicas de estas moléculas neurotransmisoras. De esta manera las enzimas podrían influir de manera directa en la concentración de las sustancias en sus sitios "blanco", así como también en la duración de su acción y por lo tanto en la respuesta biológica.

Esta opción resulta atractiva dado que los péptidos activos son susceptibles de ser hidrolizados por peptidasas presentes en el tejido nervioso (Schwartz y cols., 1983). Sin embargo, el papel que estas enzimas poseen depende además de su identificación en el cerebro, de otros factores tales como sus características cinéticas y de especificidad a los substratos endógenos, así como de su localización celular y subcelular específica.

El estudio de la degradación enzimática de los neuropéptidos resulta difícil debido a varias razones:

- i) generalmente un mismo neuropéptido puede ser hidrolizado por una multiplicidad de enzimas distintas, de manera tal que en muchos casos se producen patrones de fragmentación complejos. No obstante las restricciones conformacionales impuestas por la estructuras secundarias y terciarias de los péptidos para que se lleve a efecto el corte inicial y los cortes subsecuentes por parte de enzimas particulares, es claro que a medida que aumenta el tamaño de los péptidos se incrementa también el número de metabolitos producidos, dificultando de esta manera el análisis de los productos;
- ii) la dificultad existente en aislar y purificar a las enzimas involucradas;
- iii) las bajas concentraciones de péptidos presentes o sus metabolitos en ciertas regiones;
- iv) la ausencia en muchos casos de substratos sintéticos y de inhibidores específicos de las enzimas que dificultan el establecimiento de ensayos in vitro apropiados.

Por otra parte se ha mostrado que el metabolismo de péptidos exógenos por enzimas cerebrales purificadas o fracciones de tejido no refleja necesariamente la ruta metabólica exacta de degradación. El uso de preparaciones celulares intactas como los sinaptosomas y los cultivos primarios, ha simplificado los estudios, permitiendo por ejemplo descartar la participación de numerosas enzimas inicialmente propuestas en los mecanismos de inactivación de las encefalinas (Rose y cols., 1989).

De esta manera se ha podido establecer que de todas las enzimas descritas hasta la fecha capaces de degradar in vitro a los neuropéptidos, quizá solo unas cuantas posean las propiedades adecuadas para desempeñar un papel funcional en el metabolismo degradativo de los mismos. Dentro de estas se encuentran varias enzimas presentes sobre la membrana de terminales sinápticas como la llamada enzima convertidora de angiotensina (ACE, EC 3.4.15.1) (Skidgel y Erdos, 1985), la endopeptidasa 24.15 (EC 3.4.24.15) (Acker y cols., 1987, Molineaux y cols., 1988) y la endopeptidasa neutral 24.11 (NEP, EC 3.4.24.11), también conocida como "encefalinasasa" (Hersh, 1982; McKelvy, 1986, Turner, 1988), las cuales poseen la capacidad de degradar una gran variedad de péptidos activos (Tabla 7).

Tabla 7

Péptidos hidrolizados por la endopeptidasa 24.11 in vitro

Substrato	Km(μ M)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m
Neurokinina A	113	21560	191
Substancia P	32	5062	159
Bradiquinina	92	6364	69
Leu-enk	86	3781	44
CCK ₁₋₈	67	1924	29
Dinorfina	219	5340	24
Neurotensina	78	1280	16
LHRH	755	840	1.1

Péptidos hidrolizados por la enzima convertidora de angiotensina (ACE) in vitro.

Substrato	Km(μ M)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m
Bradiquinina	0.4	500	1250
Angiotensina I	4	500	125
Substancia P	25	225	9
Neurotensina	14	34	2.4
LHRH	167	210	1.3
Leu-enk	1000	700	0.7

Datos tomados de Littlewood y cols., 1988, a su vez de Matsas y cols., 1984 y Hooper y cols., 1985 (endopeptidasa 24.11) y de Erdos y Skidgel, 1985 y Skidgel y Erdos, 1985 (ACE).

La NEP es quizá la peptidasa más estudiada: la enzima cataliza la hidrólisis del enlace Gly-Phe de la secuencias de Met y Leu encefalinas (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met y Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu respectivamente) (Malfroy y cols., 1978; Gorenstein y Snyder, 1979, 1980), así como de otros péptidos activos como sustancia P (Matsas y cols., 1983, 1985), neurokinina A o sustancia K (Hooper y cols., 1985), CCK_{1,6} (Zuzel y cols., 1985), e interleukina -1b (Pierart y cols., 1988). La peptidasa se encuentra presente en el cerebro, y en otros tejidos como el riñón (Kerr y Kenny, 1974; Malfroy y Schwartz 1982; Matsas y cols., 1983) y la hipófisis (Orlowski y Wilk, 1981). La enzima muestra una localización celular asociada a la membrana de las neuronas (Waskman y cols., 1986b; Barnes y cols., 1988), además de poseer las características estructurales y funcionales de una verdadera ectoenzima (Malfroy y cols., 1987; Devault y cols., 1987). Una gran proporción de la NEP se localiza en la fracción membranal sinaptosomal (Almenoff y cols., 1981; Fulcher y cols., 1982; Almenof y Orlowski, 1984). Su distribución heterogénea en el cerebro (Matsas y cols., 1986; Barnes y cols., 1988), correlaciona en ciertos casos con la de receptores a opioides (Waskman y cols., 1986a) y otros neuropéptidos de la familia de las takininas (sustancia P y K) (Matsas y cols., 1986a; Lee y cols., 1986). La inhibición de la actividad de la NEP, así como de la aminopeptidasa M (EC 3.4.11.2) (otra peptidasa asociada al proceso de degradación de las encefalinas) produce un aumento en la recuperación de Met-enk liberada de rebanadas estriatales (Patey y cols., 1981; Fournié-Zaluski y cols., 1985), un efecto similar se observa en la recuperación de la SP liberada en respuesta al alto K⁺ en rebanadas de la sustancia nigra (Littlewood y cols., 1988). Se ha mostrado que la administración *in vivo* de distintos inhibidores generales o específicos de la NEP producen analgesia (Lecomte y cols., 1986), aumento en la frecuencia de disparo espontánea de neuronas en la sustancia nigra (Bier y cols., 1987), así como cambios conductuales (Giros y cols., 1987), efectos que se han asociado a la inhibición de la degradación de encefalinas y sustancia P y/o sustancia K. Estas evidencias experimentales cumplen de manera general los criterios necesarios propuestos por Schwartz y cols. (1981) y Loh y cols. (1984) (Tabla 8) para establecer de manera concluyente que la endopeptidasa 24.11 posee un papel funcional relevante en la degradación de encefalinas y probablemente de otros neuropéptidos de la familia de las takininas en el Sistema Nervioso. Sin embargo muestra también que en general el concepto de peptidasas específicas para un neuropéptido no parece cumplirse.

Una función accesoria de las enzimas que degradan a los neuropéptidos pudiera ser la de producir metabolitos que posean propiedades biológicas propias, cuyos efectos podrían estar relacionados a los del péptido parental o bien ser completamente independientes, proceso que se ha denominado como biotransformación (Griffiths y McDermott 1984; McKelvy y Blumberg, 1986). Un ejemplo de esto lo representan los fragmentos amino terminal de la sustancia P, (SP₁₋₇ y SP₁₋₈), los cuales poseen propiedades nociceptivas similares a del undecapéptido, pero no tienen efecto sobre la presión sanguínea o la contracción del músculo esquelético (Stewart y cols., 1982). En el caso de la β endorfina se ha observado que la remoción del residuo amino terminal de tirosina abole su actividad opiacea, pero en cambio se produce un nuevo péptido (des-Tyr β endorfina), el cual posee actividad en varios procesos adaptativos (de Wied y Jolles, 1982).

Tabla 8

**Criterios establecidos para la identificación de peptidasas
relevantes en la inactivación extracelular de neuropéptidos.**

- a) La enzima debe ser activa a pH fisiológico.
- b) Los productos de hidrólisis deben ser inactivos o al menos no deben exhibir la misma actividad biológica que la molécula de la cual se originaron en el contexto de la neurotransmisión.
- c) la enzima inactivante debe estar localizada de manera estratégica para permitir la hidrólisis de los péptidos liberados al espacio sináptico.
- d) La inhibición de la enzima debería proteger a los péptidos liberados sinápticamente
- e) La inhibición de la enzima debería reproducir las acciones biológicas de los neuropéptidos.
- f) La actividad de la enzima podría exhibir cambios adaptativos como respuesta a una transmisión nerviosa modificada.
- g) La especificidad del sustrato debería ser la base de la actividad biológica aumentada de análogos sintéticos.

(Tomado de Elmore y cols., 1990; a partir de Schwartz y cols., 1981 y Loh y cols., 1984)

En el caso específico del TRH la ruptura del enlace pGlu-His en la estructura del TRH genera el metabolito His-ProNH₂, el cual podría seguir dos rutas diferentes (Figura 1):

i) ser degradado por dos enzimas distintas: o bien por una iminopeptidasa (que daría origen al ProNH₂) (Matsui y cols., 1979); o por la dipeptidil aminopeptidasa tipo IV (DAP IV) (Browne y O'Cuinn, 1983b), en cuyo caso se generaría al dipéptido His-Pro (Tabla 9)

La DAP IV es una enzima que se localiza en membranas sinaptosomales (Garat y cols. 1985; Torres y cols., 1986; O'Connor y O'Cuinn, 1984), en fracciones membranales del cerebro (Tadashi y cols., 1978; Garat y cols., 1985) y en rebanadas de hipotálamo lavadas exhaustivamente (A. Baez, no publicado). Se ha demostrado la formación *in vitro* de His-Pro por parte de membranas sinápticas del cerebro de la rata (Coggins y cols. (1987a), dipéptido que posee actividades biológicas propias distintas al TRH (Coggins y cols., 1986) y para el cual existen sitios de unión de alta afinidad presentes en el Sistema Nervioso (Coggins y cols., 1987b); resultados que sugieren la posible participación de la DAP IV (en concierto con la PGAll) en la formación de His-Pro en el medio extracelular.

Se ha descrito la formación de ProNH₂ a partir de TRH por parte de fracción mitocondrial del cerebro de la rata (Kreider y cols., 1981b), en tanto que la incubación del tripéptido con fracciones membranales del cerebro produce solo cantidades muy pequeñas de este metabolito, unicamente cuando se encuentra activa la PGAll (Torres y cols., 1986). Es posible por lo tanto que el ProNH₂ sea producido por la iminopeptidasa como resultado del metabolismo secundario del His-ProNH₂. Recientemente se describió la formación de piroGlu-His por parte de fracciones particuladas de la sustancia nigra y médula espinal humana (Griffiths y cols., 1989). Sin embargo no existen evidencias claras de la existencia de una actividad que hidrolice directamente el enlace ==His-Pro== de la molécula del TRH,

ii) Alternativamente el His-ProNH₂ que escape a esta degradación podría ciclizarse espontáneamente para dar origen al metabolito ciclo His-Pro dicetopiperazina (His-ProDKP), el cual parece ser un compuesto estable tanto *in vivo* como *in vitro* (Prasad y cols., 1986). Esta molécula se encuentra presente en el en el hipotálamo y áreas extrahipotalámicas del diversas especies, así como en en otros órganos como el páncreas (Prasad y cols., 1982). El His-ProDKP es liberado de las rebanadas de hipotálamo por estímulos depolarizantes (Prasad y cols., 1986; Iruichijima y Wilber, 1987) y aunque no posee actividad estimulante de la liberación de TSH, sin embargo si inhibe la liberación de prolactina de la adenohipófisis tanto *in vitro* como *in vivo* (Prasad y cols., 1980; Brabant y cols., 1981), además de poseer otras acciones biológicas propias (Peterkofsky y cols., 1982). No se han descrito receptores específicos para el DKP en el Sistema Nervioso o en las células adenohipofisarias y por consiguiente se desconocen el o los mecanismos moleculares a través de los cuales produce sus efectos. La distribución regional de la DKP en el cerebro es diferente de la descrita para el TRH (Mori y cols., 1982), existiendo áreas que poseen niveles aún mayores que los de TRH (Peterkofsky y cols., 1982), además de que un porcentaje importante del mismo se encuentra presente en la fracción soluble celular (Yanagisawa y cols., 1980). Por otra parte se ha observado que la disminución en los niveles de TRH en la médula espinal producto de la administración de 5,7 HT no correlaciona con la del DKP (Jackson y Lechan, 1983). Estos resultados han llevado a sugerir que en algunas regiones del cerebro el His-ProDKP detectado no es un producto de la hidrólisis enzimática extracelular de la molécula del TRH en las terminales nerviosas, sino probablemente resulte del procesamiento alternativo del precursor en el interior de las células (Jackson y cols., 1988).

Tabla 9

Enzimas del cerebro que poseen la capacidad para introducir un corte primario o secundario en la estructura del TRH.

Enzima	P.M.	Clase	Inhibidores	Localización
PGA I	24	Tiol	Iodoacetamida	Citoplasma
PE	70	Serina	Bacitracina	Citoplasma
DAPII	200	Serina	Puromicina	Citoplasma y lisosomas
Imidopeptidasa	---	Tiol	Netilmaleimida	Fracción particulada
PGAII	231	Metalo	EDTA	Membrana sinaptosomas, neuronas en cultivo
DAPIV	---	Serina	Bacitracina	Membrana sinaptosomas.

No existen evidencias que sugieran que la desamidación del TRH sea un mecanismo funcional de inactivación de la molécula en las células nerviosas. Por el contrario la molécula de TRH-OH (la cual es inactiva sobre los receptores a TRH), ejerce efectos similares a los del tripéptido cuando se administra *in vivo* (Boschi y cols., 1980; Andrews y Sahgal, 1983). Ya que la PGAll es capaz de degradar al TRH-OH (O'Connor y O'Cuinn 1985; Elmore y cols., 1990), un efecto inhibitorio competitivo de este metabolito sobre la actividad de la enzima podría explicar en parte estos efectos, idea que esta de acuerdo con la sugerencia de que las acciones farmacológicas de numerosos péptidos podrían deberse a la inactivación de proteasas específicas, más que a efectos directos sobre receptores específicos (La Bella y cols., 1985).

Papel de la PGAll

La PGAll es hasta ahora la única enzima que posee las características de una peptidasa específica para un sustrato endógeno, el TRH (Wilk, 1986). La alta especificidad por el TRH, (O'Connor y O'Cuinn, 1985; Wilk y Wilk, 1989a, Elmore y cols., 1990), su localización en la membrana plasmática de las terminales nerviosas (O'Connor y O'Cuinn, 1984; Garat y cols., 1985), su distribución heterogénea en el Sistema Nervioso (Friedman y Wilk, 1986; Vargas y cols., 1987), así como la demostración de que se localiza preferentemente sobre las membranas de las células nerviosas como una verdadera ectoenzima (Publicaciones 1 y 2, Bauer y cols., 1990), apoyan la idea de un papel fisiológico relevante de esta enzima en la transmisión sináptica TRHérgica. Recientemente se demostró en el laboratorio que existe un aumento en la recuperación del TRH liberado de rebanadas de hipotálamo incubadas en presencia de CPHNA, un inhibidor específico de la enzima (Charli y cols., 1989), reforzando esta propuesta. De esta manera la remoción del piroglutamato de la molécula de TRH por parte de la PGAll parece ser el mecanismo de inactivación inicial del tripéptido.

Existen sin embargo ciertos criterios que deben de ser corroborados experimentalmente antes de poder establecer de manera irrefutable su relevancia fisiológica en el SNC. Por ejemplo, a excepción de la retina en donde existe una relación estrecha entre la actividad de la PGAll (Wilk y cols., 1988), los niveles de receptores a TRH (Taylor y Burt, 1982) y los niveles de TRH (Martino y cols., 1980), en otras regiones del cerebro de la rata no se han podido determinar correlaciones similares (Vargas y cols., 1987). De esta manera la definición clara de la función de la PGAll en el cerebro requerirá obtener información accesoria tanto sobre la relación anatómica que existe entre la enzima con los receptores a TRH y los sitios de liberación del péptido, como sobre los efectos farmacológicos o conductuales provocados por la inhibición de la actividad enzimática, o por análogos estructurales del TRH resistentes a su degradación.

La demostración de que la PGAll es regulada de manera tejido específico en la adenohipófisis por las hormonas tiroideas (Bauer, 1987b; Ponce y cols., 1988; Suen y Wilk, 1989b) y por estrógenos (Bauer, 1988), así como su localización específica en células productoras de PRL (Bauer y cols., 1990), sugieren que esta peptidasa podría tener un papel importante y específico en los mecanismos de señalamiento químico del TRH en los lactotopos y quizá explique las distintas respuestas mostradas al TRH hipotalámico por los diferentes tipos celulares presentes en la adenohipófisis.

La investigación a realizar en el futuro deberá estar orientada a caracterizar la localización exacta de la PGAll, ya sea en las terminales nerviosas TRHérgicas, en la membrana postsináptica de las células blanco, o en otros sitios accesorios. Para ello será necesario llevar a cabo experimentos *in vivo* en una vía específica en donde participe el TRH, preferentemente asociada con una función, comportamiento o conducta específica, y observar si la inhabilitación de la vía o la inactivación de la enzima, se ve acompañada por cambios en la actividad de la enzima o del péptido liberado y si esto modifica la función o conducta asociada.

La vía que proyecta de los núcleos de rafé del bulbo raquídeo al asta ventral de la médula espinal, la cual probablemente este relacionada con la inervación de motoneuronas α ; así como el efecto ejercido por el TRH sobre la liberación de dopamina del estriado asociado con la actividad locomotora del animal, son probablemente modelos adecuados.

Ya que se ha purificado a la PGAll de diversas fuentes (O'Connor y O'Cuinn, 1985; Wilk y Wilk, 1989a,b), se podrá intentar producir baterías de anticuerpos específicos de alta sensibilidad (tanto policlonales, como monoclonales) contra la estructura de la enzima, lo cual será una herramienta experimental que permitirá desarrollar los estudios histo e inmunocitoquímicos necesarios para confirmar los datos obtenidos en este trabajo, tal y como se ha hecho para el caso de la endopeptidasa 24.11 (Waskman y cols., 1986b; Barnes y cols., 1988). Recientemente se describió una metodología que combina el uso de un substrato fluorescente, con técnicas de histoquímica e inmunocitoquímica clásicas, que permite comparar directamente la distribución relativa de la NEP y las encefalinas dentro de la misma preparación (Back y Gorenstein, 1989). Es posible en un futuro que se pueda desarrollar un método similar para el caso de TRH o sus receptores y la PGAll.

El desarrollo de inhibidores específicos para la PGAll se ha convertido en una herramienta extremadamente útil en la definición de la relevancia de la enzima en la inactivación del TRH liberado en el hipotálamo (Charli y cols., 1989), nuevos compuestos con afinidades aún mayores permitirán extender estos resultados al animal intacto.

En los últimos años se han clonado varias peptidasas que degradan neuropéptidos, permitiendo obtener la secuencia primaria de sus estructuras: NEP (Malfroy y cols., 1987; Devault y cols., 1987); DAP IV (Shigenori y cols., 1989). Al igual que estas enzimas la clonación de la PGAll permitirá definir las características estructurales mediante las cuales se encuentra asociada a las membranas (proteína integral o anclada por enlaces covalentes a fosfolípidos específicos). Esto es relevante dada la posibilidad de que la enzima sérica tiroliberinasa pudiera originarse como una enzima membranal para posteriormente ser liberada. La disponibilidad de sondas moleculares (cDNA, gene) permitirá por otra parte estudiar a otros niveles los procesos de control y regulación a los que esta sujeta la enzima en distintas regiones bajo diferentes condiciones fisiológicas.

ANEXO 1

Publicaciones 1 y 2

THE NARROW SPECIFICITY PYROGLUTAMATE AMINO PEPTIDASE DEGRADING TRH IN RAT BRAIN IS AN ECTOENZYME

JEAN-LOUIS CHARLI,* CARLOS CRUZ, MIGUEL-ANGEL VARGAS
and PATRICIA JOSEPH-BRAVO

Departamento de Bioquímica, Centro de Investigaciones sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62270, México

(Received 12 June 1987; accepted 10 March 1988)

Abstract—In order to determine the pathway of extracellular metabolism of the thyrotropin releasing hormone (pyroglu-his-proNH₂) in brain, the topographical organization of pyroglutamate aminopeptidase II on the plasma membrane was investigated. Its activity was only slightly increased when intact brain synaptosomes were lysed by osmotic shock or detergent treatment. Trypsin treatment of intact synaptosomes destroyed 70-80% of enzyme activity without affecting lactate dehydrogenase. Pyroglutamate aminopeptidase II activity was present in primary cultures of foetal mice cortical cells. It was detected in intact cells, was not released by the cells and its activity was not increased by saponin pretreatment. Trypsin treatment of the cells reduced pyroglutamate aminopeptidase II by 70% but did not affect pyroglutamate aminopeptidase I and lactate dehydrogenase. These data support that brain pyroglutamate aminopeptidase II is an ectoenzyme. They suggest that this enzyme could be responsible for thyrotropin releasing hormone extracellular catabolism in brain.

Thyrotropin releasing hormone (TRH; pyroglu-his-proNH₂) has been suggested as a participant of information transfer in the central nervous system. The existence of such a role should be accompanied by mechanism(s) of TRH removal from active sites. Neuropeptides are easily degraded by peptidases. Two soluble enzymes present in brain are able to degrade TRH *in vitro*: prolylendopeptidase (PE; EC 3.4.21.26) and pyroglutamate aminopeptidase (PGAI; EC 3.4.11.8) (Bauer, 1983). Current evidence suggests they might not participate in extracellular catabolism of TRH (Charli *et al.*, 1987) and their involvement in intracellular degradation remains controversial (Favre-Bauman *et al.*, 1986; Charli *et al.*, 1987; Torres *et al.*, 1986). On the other hand, on brain membranes exists a pyroglutamate aminopeptidase (PGAII) distinct from the widely distributed PGAI. PGAII is a metalloenzyme of narrow specificity (O'Connor and O'Cuinn, 1984, 1987; Garat *et al.*, 1985; Friedman and Wilk, 1986); only small peptides whose structure is pglu-his-X are

cleaved (O'Connor and O'Cuinn, 1985a; Wilk, 1986). The papain solubilized form of the enzyme has a molecular weight of 230,000 Da (O'Connor and O'Cuinn, 1985a). These properties are similar to those of serum thyroliberinase (Bauer, 1983). PGAII is mainly localized on synaptosomal membranes (O'Connor and O'Cuinn, 1984; Torres *et al.*, 1986), at the plasma membrane level (O'Connor and O'Cuinn, 1984). Highest activity is found in brain (Friedman and Wilk, 1986), where regional distribution is not homogeneous (Friedman and Wilk, 1986; Vargas *et al.*, 1987). PGAII properties are indicative of a true neuropeptide specific peptidase (Wilk, 1986). However, before such a hypothesis can be confirmed, further properties of the enzyme have to be studied. In this paper we have investigated if its orientation on brain plasma membranes is suited for inactivating an extracellularly localized peptide.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

Male Wistar rats (200-300 g) kept under controlled lighting conditions (lights on at 7 a.m. and off at 7 p.m.) and fed *ad libitum* were used in most experiments. 14 days CD1 foetal mice were used for the primary cultures. [1-2,3,4,5-³H]proline-TRH ([³H-pro]TRH) (107 Ci/mmol)

*Address correspondence to: Dr J. L. Charli, Centro de Investigaciones sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM, A.P. 510-3, Cuernavaca, Mor. 62270, México.

was purchased from New England Nuclear Co. TRH was obtained from Peninsula Laboratories. Media, sera, glutamine, the antibiotic-antimycotic mixture and the vitamin mix were from Gibco Laboratories; plasticware for cell culture from Costar and glucose for cell culture from Difeo Laboratories. All other chemicals were reagent grade from Sigma Chemical Co. or J. T. Baker. Ion exchange paper chromatography was performed on Whatman cellulose phosphate P81 sheets. N-benzyloxycarbonyl prolyl proline (ZPP) and pyroglutamyl diazomethylketone (PDMK) were generous gifts from Dr S. Wilk.

Purification of [³H-pro]TRH

When necessary, [³H-pro]TRH was repurified to 95% radiochemical purity by high performance thin layer chromatography (Charli *et al.*, 1984).

Degradation of TRH by rat brain synaptosomes

Synaptosomes were prepared according to Bradford (1972) and Joseph-Bravo *et al.* (1979). The 0.8–1.2 M interphase of sucrose gradient was diluted to 0.45 M sucrose with water and centrifuged at 35,000 *g* for 30 min. The pellet was either gently resuspended in 0.32 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 (intact synaptosomes) or sonicated in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4. After sonication, synaptosomal membranes were recovered by centrifugation at 75,000 *g* for 30 min. All steps were performed at 4°C.

TRH degradation by PGAI was measured using a specific assay essentially as described (Vargas *et al.*, 1987) except for TRH concentration. Briefly, after 5 min preincubation of the membranes (60 µg protein) or synaptosomes (75 µg protein) in 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.5, containing 2.5 mM bacitracin (BAC) and 2.5 mM N-ethylmaleimide (NEM) (final concentrations), 100,000 cpm [³H-pro]TRH (10⁻⁶ M) were added and incubation carried out at 37°C (final vol. 31 µl). Incubation medium of synaptosomes also contained 0.25 M sucrose. Sucrose increased membrane PGAI activity; data were corrected accordingly. At time 0 and subsequent times, 5 µl aliquots were immediately spotted on cellulose phosphate paper. Chromatography was developed with 1 M acetic acid; his-[³H]proNH₂ produced was eluted from the first centimetre (Bauer and Kleinkauf, 1980) and counted by liquid scintillation. Zero time values were subtracted from other time values and each determination performed in duplicate. Initial velocities were determined from the linear part of the time-course curve (up to 15 min for intact synaptosomes).

Degradation of TRH by primary cultures of foetal cortical cells

Cortical tissue was obtained from 14 day mice foetuses. Initiation of cultures was essentially that described by Faivre-Bauman *et al.* (1980) with some modifications. Briefly, mothers were killed by cervical dislocation, embryos removed, placed in cold sterile phosphate buffered saline (PBS), frontal cortex dissected under a stereoscopic microscope and placed in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% foetal bovine serum (FBS). Pooled fragments from a whole litter were mechanically dissociated in DMEM-FBS by passage through 2 hypodermic needles of decreasing diameter. After dissociation, the cellular suspension was centrifuged 10 min at 450 *g*, and the cells were resuspended in DMEM supplemented with 10% FBS, 0.25% glucose, 1 mM glutamine, 8 U/100 ml

insulin, 1% vitamin mix and antibiotic-antimycotic solution (100 U/100 ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml fungizone) (final concentrations). Viable cells, determined by trypan blue exclusion, were plated in poly-D-lysine-coated 35 or 16 mm wells at 10⁵ cells/cm² in a total volume of 4 or 1 ml respectively. Cultures were maintained at 37°C in an atmosphere of 8% CO₂, 92% air and 95% relative humidity for up to 14 days. Medium was changed every 3 days, replacing half volume by fresh medium every-time. Cytosine-arabino-furanoside (10 µM) was included at the fifth day for inhibiting proliferating non-neuronal cells. Morphology of cells was similar to previous reports (Dichter, 1978). An extended report on the properties of these cells will be published elsewhere (C. Guerra, J. L. Redondo, C. Cruz, J. L. Charli and P. Joseph-Bravo, in preparation).

To study TRH degradation by intact cells, cultures (10 days *in vitro*) were washed twice with PBS and preincubated in DMEM containing glucose (0.25%), glutamine (1 mM), ZPP (10⁻⁵ M) and PDMK (10⁻⁵ M) (final concentrations; medium A) with or without saponin for 3 min at 37°C. ZPP and PDMK are potent specific inhibitors of PE and PGAI respectively (Friedman *et al.*, 1984; Wilk *et al.*, 1985). After discarding the medium, cells were rinsed with PBS, preincubated for 5 min in medium A before adding [³H-pro]TRH (10⁻⁶ M final concentration); degradation was linear with time up to 1 h. 10 µl aliquots per duplicate of the medium were spotted on P-81 chromatography paper and his-[³H]proNH₂ produced determined as described.

To study TRH degradation by PGAI or PGAI from broken cells, cultures were washed 3 times with PBS, scrapped and homogenized in 300 µl, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, per plate; membranes and soluble fractions prepared as described (Vargas *et al.*, 1987). Briefly, the 1000 *g* supernatant was centrifuged at 12,000 *g* for 15 min at 4°C. Supernatant was used to measure PGAI essentially as reported (Bauer and Kleinkauf, 1980) except that substrate and inhibitors concentrations were: 10⁻⁶ M TRH, 2 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and 2.5 mM BAC. Pellet was used to determine PGAI as described for synaptosomes. PGAI or PGAI independent values reported are the mean of 2 determinations taken from the linear part of the time-course curve; up to 15 min for PGAI and 60 min for PGAI. Mean protein concentrations used in the assays were 638 (membranes) and 749 µg/ml (soluble fraction).

Lactate dehydrogenase (LDH) activity was determined (Johnson and Whittaker, 1963) after 15 min preincubation of the samples with 0.1% (final) Triton X-100 at 37°C. Protein was quantified following Lowry *et al.*, (1951). Statistical analyses were performed using Student's *t*-test.

RESULTS

To determine the transmembrane topology of PGAI on brain membranes, we isolated synaptosomes and measured PGAI activity from intact or broken preparations with a specific assay for PGAI (Torres *et al.*, 1986; Vargas *et al.*, 1987). Synaptosomes' lysis by osmotic shock did not cause a significant increase in activity (Table 1). No loss of membrane proteins or PGAI activity was observed

Table 1. Effects of osmotic shock, Triton X-100 and saponin treatments on synaptosomal PGAlI and LDH activities

Preparation	PGAlI†	LDH†
Osmotic shock		
Intact synaptosomes	100 ± 5 (5)	100 ± 5 (6)
Synaptosomal membranes‡	110 ± 24 (5)	49 ± 8 (4)*
Detergent treatment of synaptosomes§		
Intact	100 ± 8 (6)	ND
Triton X-100	112 ± 13 (6)	ND
Saponin	141 ± 14 (6)**	ND

Brain synaptosomes were prepared and PGAlI and LDH activities evaluated as indicated in Experimental Procedures. Activities are not expressed on a per mg basis but referred to the same amount of starting material.

†Data indicate the mean ± SEM of the activities normalized to control (intact synaptosomes). The number of independent determinations is indicated in parentheses. For intact synaptosomes, mean PGAlI specific activity was 4.5 pmol his-proNH₂/min/mg protein and mean LDH specific activity was 2.2 μmol NADH₂/min/mg protein.

‡Synaptosomal membranes were prepared by resuspension and sonication of the synaptosomal pellet in 10 mM Tris-HCl pH 7.4. The membranes were separated from synaptoplasm by centrifugation at 75,000 g.

§Intact synaptosomes were pretreated in 0.25 M sucrose with or without 0.1% Triton X-100 or 0.5% saponin (final concentrations) for 30 min at 37°C before preincubation and incubation with TRH. Synaptosomes were not separated from pretreatment medium before PGAlI assay. Saponin reduced purified PGAlI activity by 10%.

ND, not determined. *P < 0.0005; **P < 0.01 compared to control.

during centrifugation steps following lysis. Triton X-100 or saponin treatment of synaptosomes increased PGAlI activity by 12 or 41% respectively (Table 1). This suggested that a considerable part of the enzyme activity has its active site facing the extracellular space. In agreement with this hypothesis, 70–80% of the activity could be abolished by trypsin treatment of intact synaptosomes (Table 2) while being stable at least for 20 min when incubation was performed in control conditions (Table 2). Digestion of ectoproteins only and not of whole synaptosomal proteins is inferred by the lack of modification of LDH activity associated with the synaptosomes (Table 2).

Foetal cortical cells were used to confirm the orientation of PGAlI in intact cells. These cultures were composed of a mixture of viable neuronal and non-neuronal like cells (viability verified in control plates by complete trypan blue exclusion). PGAlI activity was much higher than PGAl (Table 4); however, neither a 5 min preincubation at 37°C with 0.25 mM 2-iodoacetamide, which inhibits PGAl (Bauer, 1983), nor a 1 M NaCl wash of the membranes, changed the specific activity of PGAl supporting the specificity of the assay used for PGAlI determination (data not shown). Moreover, TRH

was degraded linearly with time by intact cells to his-proNH₂ due to PGAlI activity since PGAlI was completely inhibited by PDMK [(preincubation of hypothalamic slices with 10⁻⁵ M ZPP and PDMK completely inhibits PE and PGAl activities (Charli *et al.*, 1987)]. Serum thyrolyberinase activity was very low in the serum supplemented medium (2.0 ± 0.5 fmol his-proNH₂ produced/min/ml, mean ± SEM, n = 3) as well as in culture medium that had been in contact with the cells for 3 days. Total PGAlI activity observed with intact cells was similar to that observed in an equivalent membrane penetration. These results suggested that PGAlI activity is expressed by intact cells and not by thyrolyberinase or a released enzyme.

Saponin, at reported concentrations (Czajkowski and Farb, 1986), induced swelling of cells and decrease of neurites network, mainly on neurone-like cells, as well as loss of membrane proteins (Table 3, experiment No. 1) and DNA (not shown). Total PGAlI activity was significantly reduced; but not activity/mg membrane proteins (Table 3, experiment No. 1) or activity/μg DNA (not shown). This suggested loss of cellular material and PGAlI during the rinse following saponin treatment. At much lower concentrations, cells were still permeabilized (as evidenced by staining with trypan blue) but maintained their appearance and organization and there was no loss of membrane protein (Table 3, experiments No. 2 and 3). In this case, we could not detect PGAlI in the first rinse coming from saponin-treated cells;

Table 2. Effect of trypsin treatment on synaptosomal PGAlI and LDH activities

	PGAlI		LDH
	Control	Trypsin treated	Trypsin treated
0 min	100 (2)	100 ± 4 (3)	100 ± 8 (4)
10 min	122 (2)	46 ± 6 (3)*	100 ± 16 (4)
20 min	92 (2)	26 ± 4 (4)*	99 ± 7 (4)
30 min	ND	17 (2)	78 (2)

Brain synaptosomes were prepared and PGAlI and LDH activities measured as described in Experimental Procedures. For trypsin treatment of the synaptosomes, these were resuspended in 95 μl of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 2 mM CaCl₂ and 0.25 M sucrose (3.3 mg protein/ml). Digestion with 0.06% trypsin at 37°C was stopped by addition of 0.23 mg/ml trypsin inhibitor and transfer of synaptosomes at 4°C for 10 min. Data (mean ± SEM; number of independent determinations indicated in parentheses) are not expressed on a per mg basis since trypsinization causes a loss in general cell membrane protein as well as a loss of PGAlI. Thus expressing the data on a per mg basis would not reflect the absolute sensitivity of the PGAlI to trypsin. They are expressed in percentage of value at time 0.

ND, not determined. *P < 0.0005 compared to time 0.

Table 3. PGAIH activity in primary cultures of cortical cells; effect of saponin treatment

	PGAIH (activity per well)	PGAIH; (specific activity)	Protein§ (per well)
<i>Experiment No. 1</i>			
Control	131 ± 23 (4)	2.0 ± 0.5 (4)	65 ± 5 (6)
Saponin 0.125%	71 ± 5 (4)**	2.1 ± 0.1 (4)	35 ± 2 (6)***
0.50%	72 (2)	2.1 ± 0.1 (4)	33 ± 1 (6)***
<i>Experiment No. 2</i>			
Control	67 ± 9 (8)	2.0 ± 0.1 (8)	34 ± 6 (4)
Saponin 0.002%	49 ± 9 (8)	1.4 ± 0.2 (8)**	40 ± 6 (4)
<i>Experiment No. 3</i>			
Control	189 ± 8 (6)	4.1 ± 0.2 (6)	46 (2)
Saponin 0.002%	161 ± 20 (6)	3.4 ± 0.4 (6)*	48 (2)

Experiments No. 1 and 2 were performed in 16 mm wells; experiment No. 3 in 35 mm wells. Cultured cortical cells [10 days *in vitro* (DIV)] were rinsed twice with PBS and pre-incubated in medium A (DMEM, 0.25% glucose, 1 mM glutamine, 10^{-5} M ZPP and 10^{-5} M PDMK) with or without saponin (3 min, 37°C). The medium was discarded, cells were rinsed with PBS, pre-incubated for 5 min in medium A and incubated at 37°C in 150 or 300 µl medium A containing 200,000 or 300,000 cpm [3 H]-pro[TRH] (final concentration 10^{-6} M) for experiments No. 1 and 2 or 3 respectively. 10 µl aliquots per duplicate of the medium were drawn and spotted on P-81 Whatman paper at time 0, 30 and 60 min to measure PGAIH activity. Values are mean ± SEM of the number of independent determinations indicated in parentheses. The highest saponin concentrations used inhibited partially purified PGAIH activity 20% at most.

†fmol his-proNH₂/min/well.

‡pmol his-proNH₂/min/mg membrane proteins.

§µg membrane proteins per well.

ND, not determined. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.0005$ compared to control.

activity per well and specific activity were only slightly decreased by the treatment (Table 3).

Finally, treatment of cells with trypsin prior to their homogenization decreased PGAIH activity by 70% without substantially decreasing LDH or PGAI activities or inducing cells rupture (Table 4).

Table 4. Effect of trypsin on PGAI, PGAIH and LDH activities in cortical cells in culture

	PGAI	PGAIH	LDH
Control	100 ± 3 (4)	100 ± 3 (4)	100 ± 6 (4)
Trypsin	86 ± 8 (4)	26 ± 3 (5)*	122 ± 18 (6)

Cortical cell cultures (propagated in 16 mm wells) were washed with PBS, incubated with or without 0.125% trypsin for 10 min at 37°C, transferred at 4°C and maintained for 10 min in the presence of 190 µg bovine pancreas trypsin inhibitor. After trypsin treatment, most cells remained intact while others lost intercellular contacts and became globular. No debris appeared suggesting there was no cell rupture. Unbound cells were recovered by centrifugation; attached cells were rinsed, recovered in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.5, and pooled with cells recovered by centrifugation. Enzymatic analyses were performed as described. Data are expressed in percentage of control value. They correspond to 2 independent experiments made from cultures maintained for 6 or 14 days *in vitro*. For control, mean activities were: PGAI: 7.8 (6 DIV) or 16.9 (14 DIV) pmol his-proNH₂ produced/min/well; PGAIH: 21 (6 DIV) or 81 (14 DIV) fmol his-proNH₂ produced/min/well; LDH: 1.9 µmol NADH₂/min/well. Values are mean ± SEM of the number of independent determinations indicated in parentheses.

* $P < 0.0005$ compared to control.

DISCUSSION

We have studied PGAIH activity in synaptosomes and brain cells in culture in an effort to determine the localization of its active site on brain plasma membranes.

The data presented, consistent in two experimental models, demonstrate that most of the PGAIH is an ectoenzyme (i.e. an intrinsic plasma membrane enzyme with an extracellularly localized active site) in brain. This conclusion is supported by the following observations:

(1) The enzyme activity is detected in intact cells with a non-penetrating substrate. Although accumulation of TRH has been reported in hypothalamic slices (Charli *et al.*, 1984), no uptake has been observed in nerve ending preparations (Parker *et al.*, 1977; H. Torres, J. L. Charli and P. Joseph-Bravo, unpublished observations). Further evidence that activity observed was not due to TRH uptake by cells or synaptosomes or through their rupture during incubation came from the linear characteristics of the time-course curves before a plateau was reached.

(2) PGAIH is not released from the cells.

(3) Serum thyrolyberinase contaminating the cells is not accounted for in this activity since it was very low in the serum supplemented medium (even if PGAIH assay of cells was performed without rinsing,

only 0.5% of intact cell activity at most could be attributed to thyroliberinase).

(4) PGAI activity is not increased by homogenization, solubilization or permeabilization of cells or synaptosomes except when synaptosomes were treated with saponin. This slight increase with saponin is more likely due to unmasking part of ectoenzyme activity and not to revealing intracellular activity, as suggested for 5'nucleotidase from guinea pig granulocytes (De Pierre and Karnovsky, 1974). This effect may not have been seen on cells because low concentrations were used in experiments No. 2 and 3 and higher concentrations used in experiment No. 1 induced loss of cell membrane (decrease of material was not detected in the synaptosomes experiments since the assay was performed without separating synaptosomes from medium).

(5) PGAI activity is strongly decreased by trypsin treatment of cells or synaptosomes. This is not due to rupture of cells or synaptosomes, or degradation of intracellular proteins.

This evidence fulfils most of the criteria mentioned by Karnovsky (1986) to qualify an enzyme as an ectoenzyme. From our data we can estimate that at least 70% of the enzyme is an ectoenzyme.

Further data that support the concept of PGAI being an ectoenzyme come from the observations that PGAI is the main enzyme degrading TRH added in the extracellular space of hypothalamic slices (J. L. Charli, A. Baez and P. Joseph-Bravo, unpublished observations) and inhibition of PGAI increases TRH recovery from hypothalamic slices (Charli *et al.*, 1988). Together with previous studies (O'Connor and O'Cuinn, 1984; Torres *et al.*, 1986), this suggests that the majority of the enzyme active site is localized on the external face of a synaptosomal plasma membrane. The data from these studies as well as the heterogeneous distribution of PGAI in brain (Friedman and Wilk, 1986; Vargas *et al.*, 1987, and its narrow specificity (O'Connor and O'Cuinn, 1984; Wilk, 1986) make it a prime candidate for inactivating TRH or related peptides present in the brain extracellular fluid. This reaction could be responsible for his-proNH₂ production in brain extracellular space so that part of histidyl prolyl diketopiperazine present in brain in a non-synaptosomal compartment (Yanagisawa *et al.*, 1980), may be in the extracellular fluid. Critical experiments showing that endogenous TRH is released in the vicinity of the enzyme and degraded by it are needed to demonstrate PGAI involvement in controlling TRH levels at the synaptic cleft.

On the other hand, there is no evidence that PE and PGAI are able to degrade TRH present in the extracellular space: specific inhibitors of these enzymes do not modify *in vitro* TRH release from hypothalamic slices (Charli *et al.*, 1987); exogenous TRH added to hypothalamic slices is not degraded substantially by these enzymes (J. L. Charli, A. Baez and P. Joseph-Bravo, unpublished observations) and finally they are not released by KCl stimulation of primary cultures of hypothalamic cells (Faivre-Bauman *et al.*, 1986) or hypothalamic slices (M. A. Vargas, M. Mendez, J. L. Charli and P. Joseph-Bravo, unpublished observations).

Finally, although TRH can be accumulated by hypothalamic slices (Charli *et al.*, 1984), V_{max} of the phenomenon was low and there is no evidence that it plays a significant role in TRH inactivation.

In conclusion, this study demonstrates that PGAI is an ectoenzyme in brain and supports the hypothesis that the main pathway of extracellular inactivation of TRH is through action of PGAI.

Acknowledgements—The authors wish to thank the generous gifts of ZPP and PDMK from Dr S. Wilk and the skilful technical assistances of Dr E. Mata and M. Cisneros. The excellent typing of the manuscript by V. Aldama is acknowledged. We also thank Dr S. Wilk and Dr G. O'Cuinn for providing data and their manuscript before publication. This work was supported in part by grants from CONACyT (IBXNA-021044), "Fondo de Estudios e Investigaciones R.J.Zevada" and "Fundacion Miguel Aleman A.C."

REFERENCES

- Bauer K. (1983) Biochemical properties of TRH-inactivating enzymes. In: *Thyrotropin Releasing Hormone* (Griffiths E. C. and Bennett G. W., eds), pp. 103-107. Raven Press, New York.
- Bauer K. and Kleinkauf H. (1980) Catabolism of thyroliberin by rat adenohypophyseal tissue extract. *Eur. J. Biochem.* 106, 107-117.
- Bauer K. and Nowak P. (1979) Characterization of a thyroliberin degrading serum enzyme catalyzing the hydrolysis of thyroliberin on the pyroglutamyl-histidine bond. *Eur. J. Biochem.* 99, 239-246.
- Bradford H. F. (1972) Cerebral cortex slices and synaptosomes. *In vitro* approaches to brain metabolism. In: *Methods of Neurochemistry* (Fried R. L., ed.), Vol. 3, pp. 155-202. Marcel Dekker, New York.
- Charli J. L., Mendez M., Joseph-Bravo P. and Wilk S. (1987) Specific inhibitors of pyroglutamyl aminopeptidase I and prolylendopeptidase do not change TRH *in vitro* release or content in rodent brain. *Neuropeptides* 9, 373-378.
- Charli J. L., Ponce G., McKelvy J. F. and Joseph-Bravo P. (1984) Accumulation of thyrotropin releasing hormone by rat hypothalamic slices. *J. Neurochem.* 42, 981-986.

- Charli J. L., Cruz C., Ponce G., Vargas M. A., Mendez M., Cisneros M., Pasten J. and Joseph-Bravo P. (1988) Physiological relevance of pyroglutamate aminopeptidase II. In: *Recent Advances in the Biomedical Significance of Thyrotropin Releasing Hormone* (Metcalf G. and Jackson I. M. D., eds). The New York Academy of Sciences, New York. In press.
- Czajkowski C. and Farb D. H. (1986) Transmembrane topology and subcellular distribution of the benzodiazepine receptor. *J. Neurosci.* **6**, 2857-2863.
- De Pierre J. W. and Karnovsky M. L. (1974) Ecto-enzymes of the guinea-pig polymorphonuclear leukocyte II. Properties and suitability as markers for the plasma membrane. *J. biol. Chem.* **249**, 7121-7129.
- Dichter M. A. (1978) Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Res.* **149**, 279-293.
- Faivre-Bauman A., Nemeskeri A., Tougard C. and Tixier-Vidal A. (1980) Immunological evidence for thyroliberin (TRH) neurons in primary cultures of foetal mouse brain cells. Ontogenic aspects. *Brain Res.* **185**, 289-304.
- Faivre-Bauman A., Loudes C., Barret A., Tixier-Vidal A. and Bauer K. (1986) Possible role of neuropeptide degrading enzymes on thyroliberin secretion in foetal hypothalamic cultures grown in serum free medium. *Neuropeptides* **7**, 125-136.
- 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 prolylendopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase. *J. Neurochem.* **46**, 1231-1238.
- Friedman T. C., Orlowski M. and Wilk S. (1984) Prolylendopeptidase: inhibition *in vivo* by N-benzyloxycarbonyl-prolylproline. *J. Neurochem.* **42**, 237-241.
- 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.
- Johnson N. K. and Whittaker J. P. (1963) Lactate dehydrogenase as a cytoplasmic marker in brain. *Biochem. J.* **88**, 404-409.
- Joseph-Bravo P., Loudes C., Charli J. L. and Kordon C. (1979) Subcellular distribution of brain peptidases degrading luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) and thyrotropin releasing hormone (TRH). *Brain Res.* **166**, 321-329.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Karnovsky M. L. (1986) Ecto-enzymes: their modulation and similarity. In: *Cellular Biology of Ecto-enzymes* (Kreutzberg *et al.*, eds), pp. 3-13. Springer, Berlin.
- O'Connor B. and O'Cuinn 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'Cuinn G. (1985a) 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'Cuinn G. (1985b) Some properties of a synaptosomal membrane-bound pyroglutamate aminopeptidase from guinea pig brain. *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 485-486.
- O'Connor, B. and O'Cuinn G. (1987) Active site studies on a narrow specificity thyroliberin-hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase purified from synaptosomal membranes of guinea pig brain. *J. Neurochem.* **48**, 676-680.
- Parker C. R., Neaves W. B., Barnea A. and Porter J. C. (1977) Studies on the uptake of ³H-Thyrotropin Releasing Hormone and its metabolites by synaptosome preparations of the rat brain. *Endocrinology* **101**, 66-75.
- 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.
- Vargas M. A., Mendez M., Cisneros M., Joseph-Bravo P. and Charli J. L. (1987) Regional distribution of the membrane bound pyroglutamate aminopeptidase degrading TRH in rat brain. *Neurosci. Lett.* **79**, 311-314.
- Wilk S. (1986) Neuropeptide specific peptidases: does brain contain a specific TRH degrading enzyme? *Life Sci.* **39**, 1487-1492.
- Wilk S., Friedman T. C. and Kline T. B. (1985) Pyroglutamyl diazomethylketone: potent inhibitor of mammalian pyroglutamyl peptide hydrolase. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **130**, 662-668.
- Yanagisawa T., Prasad C. and Peterkofsky A. (1980) The subcellular and organ distribution and natural form of histidyl proline diketopiperazine in rat brain determined by a specific radioimmunoassay. *J. biol. Chem.* **255**, 10290-10298.

Neuronal Localization of Pyroglutamate Aminopeptidase II in Primary Cultures of Fetal Mouse Brain

Carlos Cruz, Jean-Louis Charli, Miguel Angel Vargas, and Patricia Joseph-Bravo

Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico

Abstract: Pyroglutamate aminopeptidase II is a highly specific membrane-bound ectopeptidase proposed to inactivate thyrotropin releasing hormone (TRH) in brain extracellular space. Its activity was measured in primary cell cultures of fetal brain in an attempt to define its cellular localization. Enzyme activity was detected in hypothalamic or cortical cell membrane fractions from 4- to 12-day-old cultures. When proliferation of nonneuronal cells was abolished by cytosine arabinoside treatment, pyroglutamate aminopeptidase II specific activity was increased as compared to untreated cultures, the opposite was observed for pyroglutamate aminopeptidase I activity. Treatment of cortical cells with the neurotoxic agent glutamate reduced simultaneously pyrogluta-

mate aminopeptidase II and glutamate decarboxylase activities. Glial cell cultures expressed pyroglutamate aminopeptidase I or glutamate synthase activities but not pyroglutamate aminopeptidase II. The data suggest that pyroglutamate aminopeptidase II is predominantly localized in neuronal cells. This is consistent with a role for pyroglutamate aminopeptidase II in TRH-ergic synaptic transmission. **Key Words:** Pyroglutamate aminopeptidase II—Thyrotropin releasing hormone—Peptidase—Neuronal cultures—Pyroglutamate aminopeptidase I—Synapsis. Cruz C. et al. Neuronal localization of pyroglutamate aminopeptidase II in primary cultures of fetal mouse brain. *J. Neurochem.* 56, 1594–1601 (1991).

Thyrotropin releasing hormone (TRH; pGlu-His-ProNH₂), whose hypophysiotropic role is well recognized, is also involved in neurotransmission. This evidence comes from data about its distribution, neurochemical properties, and electrophysiological and behavioral effects (Metcalf and Jackson, 1989). Recent data suggest that once released into the extracellular space, TRH is inactivated by pyroglutamate aminopeptidase II (PGA II) (EC 3.4.19.-). PGA II is a membrane-bound peptidase that hydrolyzes the pGlu-His bond of TRH (O'Connor and O'Cuinn, 1984; Garat et al., 1985). It has a narrow specificity: its only known substrates are peptides of structure pGlu-His-X (where X = Pro or Trp) or pGlu-His-Pro-Y (Y = Gly or NH₂) (O'Connor and O'Cuinn, 1985; Wilk and Wilk, 1989; Elmore et al., 1990). This peptidase is concentrated mainly in brain, not homogeneously distributed (Friedman and Wilk, 1986; Vargas et al., 1987). In

adenohypophysis, PGA II is stringently controlled by several hormones including triiodothyronine and estrogens (Bauer, 1988; Ponce et al., 1988) and may be involved in regulating some adenohypophysial response to TRH. In brain, PGA II is highly concentrated at the nerve ending plasma membrane (O'Connor and O'Cuinn, 1984; Torres et al., 1986) as an ectoenzyme (Charli et al., 1988). These data as well as the fact that its specific inhibition increases recovery of TRH released from brain slices (Charli et al., 1989) suggest that it plays a key role in TRH inactivation in brain extracellular space.

Two soluble peptidases are also known to degrade TRH in vitro: prolyl endopeptidase (PE; EC 3.4.21.26) and pyroglutamate aminopeptidase I (PGA I; EC 3.4.19.3); they are nonspecific enzymes of ubiquitous distribution (for review see O'Cuinn et al., 1990). However, their involvement in regulating TRH levels

Received August 8, 1990; revised manuscript received October 24, 1990; accepted October 25, 1990.

Address correspondence and reprint requests to Dr. P. Joseph-Bravo at Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3, Cuernavaca, Mor. 62271, Mexico.

Part of this work was presented in the 18th annual meeting of the Society for Neuroscience, Toronto, Ontario, Canada, 1988.

Abbreviations used: Ara-C, cytosine arabinoside; DIV, days in vitro; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DTT, dithiothreitol; GAD, glutamic acid decarboxylase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; NMDA, N-methyl-D-aspartate; NSE, neuron-specific enolase; PBS, phosphate-buffered saline; PDMK, pyroglutamyl diazomethyl ketone; PE, prolyl endopeptidase; PGA I, pyroglutamate aminopeptidase I; PGA II, pyroglutamate aminopeptidase II; TRH, thyrotropin releasing hormone; ZPP, N-benzyloxycarbonylprolylprolinal.

in vivo is doubtful. Specific inhibition of these enzymes in vivo or in vitro does not increase TRH levels or release (Charli et al., 1987; Mendez et al., 1990).

Defining the exact cellular localization of PGA II should give a further clue in understanding extracellular TRH catabolism. We therefore decided to look for this activity in primary cell cultures obtained from mouse fetal cortex or hypothalamus. Due to the importance of cell interactions we chose a mixed cell culture system where enrichment of a specific cell type, or its further disappearance, could be indicative of the presence of PGA II in a given cell population. PGA II activity was detected preferentially under conditions in which neuronal enrichment is induced, in contrast to PGA I. Our results suggest that PGA II is localized mainly in neuronal cells.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), vitamin mix, and antibiotic-antimycotic solution were purchased from GIBCO (Grand Island, NY, U.S.A.); fetal bovine serum was from Hyclone (Logan, UT, U.S.A.). Plasticware for cell culture was obtained from Costar (Cambridge, MA, U.S.A.). L-Glutamine, bovine pancreatic insulin, poly-D-lysine, cytosine arabinoside (Ara-C), and salts for balanced salt solutions were purchased from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.). [*Pro*-³H]TRH and L-[¹⁴C]glutamate were obtained from New England Nuclear (Boston, MA, U.S.A.). TRH was obtained from Peninsula Laboratories. Ion-exchange paper chromatography was performed on Whatman cellulose phosphate P81 sheets (Whatman, Maidstone, England). *N*-Benzyloxycarbonylprolylproline (ZPP) and pyroglutamyl diazomethyl ketone (PDMK) were kindly provided by Dr. S. Wilk (Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, U.S.A.).

Primary cell cultures

Hypothalamic and cortical cell cultures were initiated and maintained as previously described by Charli et al. (1988). In brief, hypothalamus and frontal cortex were dissected from 14-day fetal mice (CD-1). Pooled fragments were mechanically dissociated. Dispersed cells were plated (1×10^6 cells/dish) in 35-mm petri dishes previously coated with poly-D-lysine, and cultured in a total volume of 2 ml of medium. Half of the medium was replaced every 3 days. When indicated, Ara-C (10 μ M) was added at the fifth day in vitro (5 DIV) to inhibit proliferation of nonneuronal cells. Cultures were maintained for up to 14 days (14 DIV). Cortical glial cell cultures were obtained from 2-day-old animals (Booher and Sensenbrenner, 1972; McCarthy and de Vellis, 1980) and cultured as described above except that dissociated cells were seeded in noncoated dishes.

PGA I and PGA II assays

PGA I and PGA II activities were measured as previously reported by Vargas et al. (1987) and Charli et al. (1988). HPTLC-repurified [*Pro*-³H]TRH (112.9 Ci/mmol) was used as substrate.

Immunocytochemical staining

Cultures were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed by immersion in 4% paraformaldehyde for 120 min at room temperature. Fixative was removed and cells

were exposed to normal goat serum (diluted 1:20 with PBS) for 30 min, followed by 1 h of incubation at room temperature with a rabbit anti-glial fibrillary acidic protein antiserum (anti-GFAP, DAKO; 1:100 dilution in PBS, 0.3% Triton X-100) or overnight at room temperature with a rabbit anti-neuron-specific enolase antiserum (anti-NSE, PolySciences, 1:1,000 dilution in PBS, 0.3% Triton X-100). At the end of incubation, cells were rinsed three times for 10 min in PBS. They were processed for antibody binding using the avidin-biotin-peroxidase system (Vectastain ABC kit, rabbit immunoglobulin G, Vector Laboratories) and reacted with 0.05 mg/ml of diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma) for 10 min. Controls were processed as described above except that first antibody was omitted.

Cells were quantified taking from each plate five different fields which were marked and analyzed (four plates per determination). Before staining, total cell bodies were counted; after staining, those positive to NSE antibody were counted.

Glutamate exposure

Cells were exposed to glutamate as reported by Choi et al. (1987) and Favaron et al. (1988) with minor modifications. Before treatment, medium from cortical cells at 11 DIV was collected and kept sterile (conditioned medium). Cells were washed in PBS, and pre-incubated in DMEM-glucose 0.25% for 10 min, followed by 10 or 20 min of incubation at room temperature with glutamate 0.5 mM in PBS. Cells were then rinsed three times with 2 ml of PBS, the conditioned medium restored, and dishes returned to the incubator for an additional 36 h. Controls were treated as described above with PBS only. Cultures were examined before, during, and after treatment under an inverted microscope (Zeiss IM 35) and representative fields were photographed with Pan-X film or Kodacolor Gold 100 (Kodak).

Glutamic acid decarboxylase (GAD) activity

GAD activity was determined by the radiochemical method described by Albers and Brady (1959), modified by Tapia and Meza-Ruiz (1976). Cells were scraped in 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, containing 1.13 mM dithiothreitol (DTT), and homogenized. The soluble fraction obtained after 15 min of centrifugation at 12,000 g was immediately assayed. The reaction mixture contained 0.05 μ Ci of L-[¹⁴C]glutamate (49.6 mCi/mmol), 10 mM glutamate, 50 mM potassium phosphate pH 7.0, 1.13 mM DTT, 0.05% Triton X-100, and 0.1 mM pyridoxal phosphate in a final volume of 71 μ l. After 20 min of incubation at 37°C, 25 μ l of 2 M H₂SO₄ was injected, and ¹⁴CO₂ released was captured in a connected tube containing 0.25 ml of hyamine hydroxide. Tubes were incubated further for 90 min to allow complete absorption of ¹⁴CO₂.

DNA content

Cells were rinsed twice with ice-cold PBS, and detached with a rubber policeman in isotonic sucrose-Tris pH 7.4. The cellular suspension was homogenized and centrifuged at 1,000 g for 15 min at 4°C. Pellets containing intact nuclei were stored at -70°C until assayed. DNA content was estimated using the fluorescence method according to Erwin et al. (1981). Calf thymus DNA (Sigma) was used as standard.

Protein

Protein was quantified following Lowry et al. (1951).

Statistics

Statistical analyses were performed using Student's *t* test.

RESULTS

Cell cultures obtained from hypothalamic or cortical fetal tissue developed in a mixed cell population in a way similar to that reported by Dichter (1978) and Tixier-Vidal and de Vitry (1979). At 4 DIV there was a thin layer of epithelioid nonrefringent flat cells attached to the plastic dish surface, although confluence had not been achieved (Fig. 1b). Over this layer, small refringent cells with an ovoid perikaryon were observed. The morphology of these small cells was either bipolar or multipolar, with thin processes arising from cell bodies; they were NSE positive (Fig. 1a). After a week

in culture the basal layer showed polygonal, flat morphology, as described for cultured astrocytes (Booher and Sensenbrenner, 1972; McCarthy and de Vellis, 1980), and stained positively with an anti-GFAP antibody (Fig. 1e). At this stage, presumptive neurons sent out an extensive network of processes, and by 10 DIV they developed large, phase-bright cell bodies. The neuronal identity of these cells was confirmed by using an antibody against NSE (Figs. 1e and 3a). The main difference observed between hypothalamic and cortical cultures was the higher density of neuronal cells in the latter cultures and the extent of neuritic processes forming in some cases thick bundles. The anti-NSE

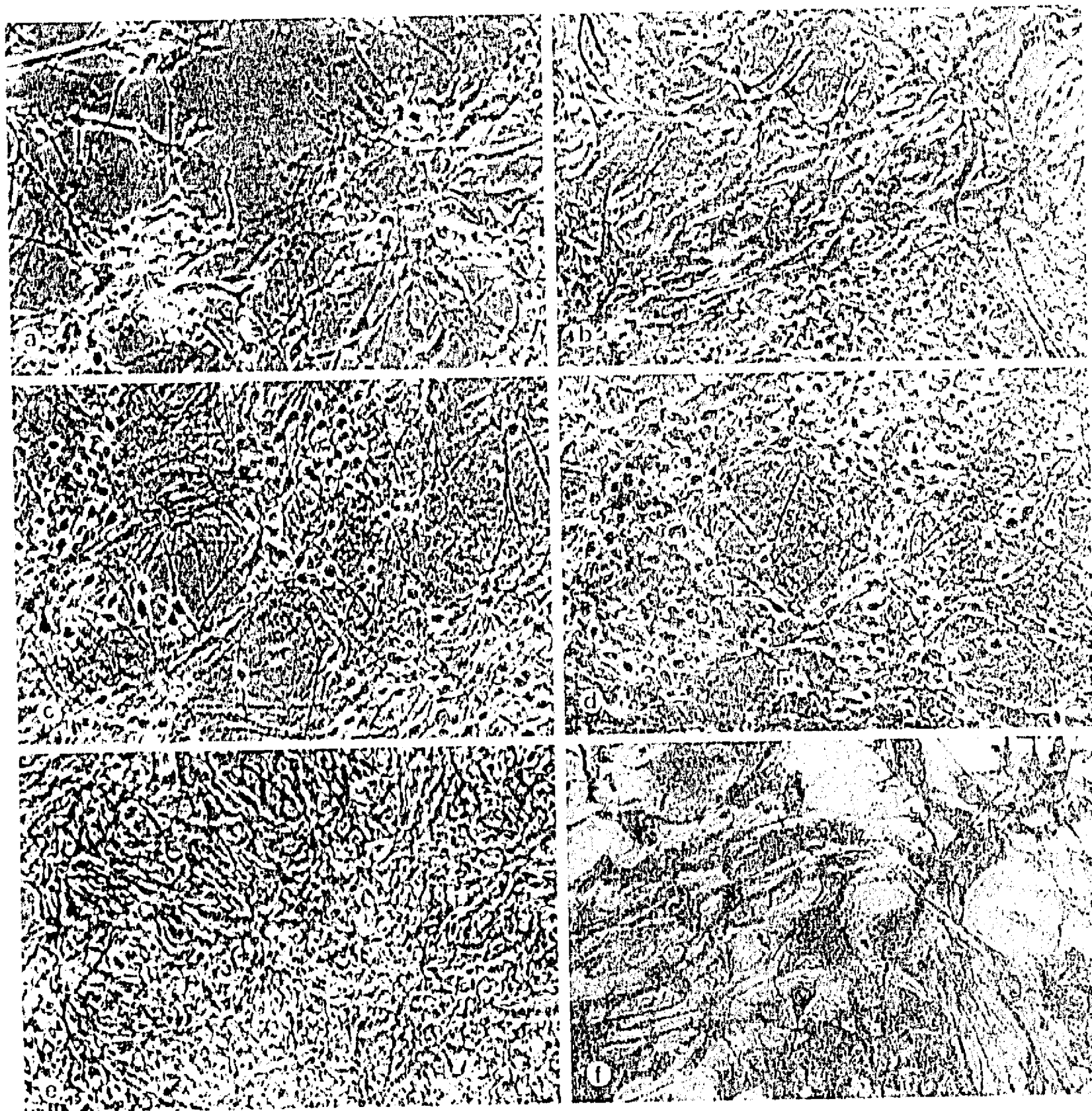


FIG. 1. Development of primary cultures of dispersed hypothalamic and glial cells in serum-supplemented medium. a: Hypothalamus, 4 DIV, stained with anti-NSE. b: Hypothalamus, 4 DIV, stained with anti-GFAP. c: Hypothalamus, 10 DIV, Ara-C⁺, stained with anti-NSE. d: Hypothalamus, 10 DIV, Ara-C⁺, stained with anti-GFAP. e: Hypothalamus, 10 DIV, Ara-C⁻, stained with anti-GFAP. f: Glial culture, stained with anti-GFAP.

TABLE 1. Specific activity of PGA II in primary cultures at different days in vitro

DIV	PGA II specific activity	
	Hypothalamus	Frontal cortex
4	0.5 ± 0.1	0.5
8	0.5 ± 0.15	0.7 ± 0.2
12	0.55 ± 0.15	0.75 ± 0.2
14	ND	0.65 ± 0.2

Cells were treated with Ara-C at 5 DIV. PGA II activity was measured in membrane fractions obtained from individual dishes, except at 4 DIV where two pooled dishes were used. Data are expressed in picomoles of His-ProNH₂ per minute per milligram of membrane protein and are the means ± SEM of three to six independent determinations (except for 4 DIV frontal cortex: two determinations). ND, not determined.

stained cells amounted to 80% of the cells growing over the basal layer. The remaining cells were mainly undifferentiated astrocytes (Fig. 1e).

PGA II activity was detected as early as the 4th day in vitro, in cultures derived of hypothalamic or cortical cells (Table 1), when neurons (NSE-positive cells) were already visualized (Fig. 1a). The specific activity in cortical cell cultures was slightly higher but not significantly different as compared with the hypothalamic cells and remained constant for up to 14 DIV (Table 1).

Addition of the antimitotic Ara-C (Ara-C⁺ cultures) at 5 DIV halted the extensive proliferation of nonneuronal cells: DNA levels of Ara-C⁺, at 10 DIV, were 43% of Ara-C⁻ values (Table 2). Morphological differences were observed in the development of cultures at 10 DIV between treated Ara-C⁺ or untreated Ara-C⁻ groups. Ara-C⁺ hypothalamic cultures had more NSE-positive cells and showed an extensive development of the neuritic network (Fig. 1c and d). Staining with GFAP revealed an extensive network of fibers. It was difficult to see a clear difference with Ara-C treatment except for certain fields (results not shown). Specific activity of PGA II in Ara-C⁺ cultures was 1.6-fold higher than in Ara-C⁻ cultures (Fig. 2); PGA II per microgram of DNA increased three times as compared

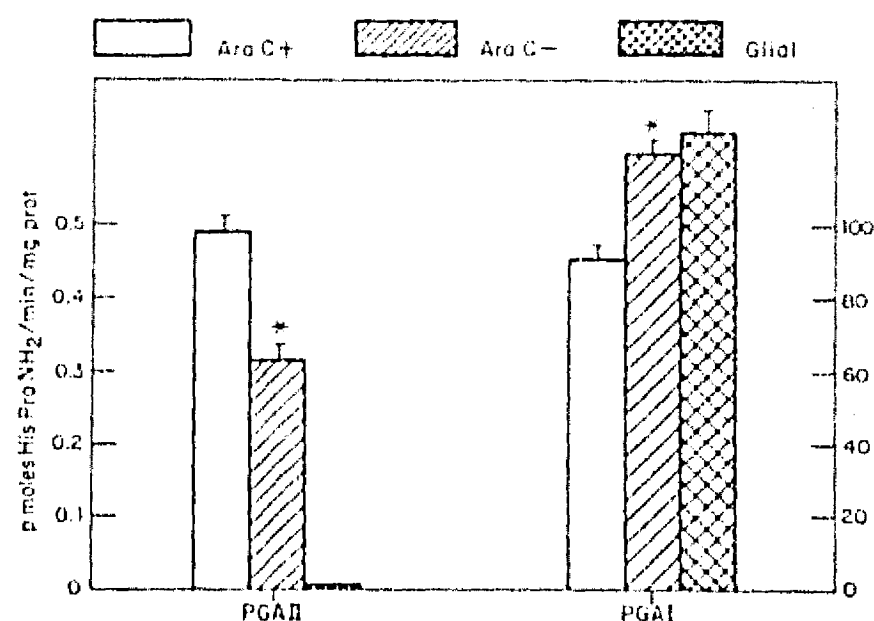


FIG. 2. PGA I and PGA II specific activities in Ara-C⁺ and Ara-C⁻ hypothalamic primary cultures and glial cells. Hypothalamic cultures at 10 DIV treated (Ara-C⁺) or not (Ara-C⁻) with Ara-C as described in the footnote to Table 2 and pure glial cultures after 20 DIV were used. PGA I and PGA II activities were assayed in the membrane and soluble fractions respectively as described in Materials and Methods. Data bars represent the means ± SEM of eight individual dishes. **p* < 0.01 compared to Ara-C⁺ by Student's *t* test.

to untreated cultures (Table 2). In contrast, PGA I specific activity was significantly enhanced when the antimitotic was omitted (Fig. 2). The effect of the neurotoxic agent glutamate was tested on cortical cultures to verify the extent of PGA II distribution in neurons. After 10 min of exposure to glutamate, there was an immediate swelling of neuronal cell bodies (Fig. 3b versus 3a) and hours after its removal, a specific neuronal degeneration was observed (Fig. 3c). The neurotoxic effect was preferentially observed in neuronal cells organized in clusters, whereas the underlying basal layer appeared normal. Glutamate treatment considerably diminished PGA II activity whether measured in membrane fractions (Fig. 4) or intact cells (Fig. 5). Membrane fractions were also measured to eliminate possible indirect effects on PGA II caused by the treatment on intact cells. Longer treatment (20 min) with the neurotoxic agent decreased further PGA II activity (Fig. 5) and this was correlated with a more extensive neuronal loss (qualitative observations). GAD activity was also decreased but to a lesser extent than PGA II

TABLE 2. Activity of PGA II in Ara-C⁺ and Ara-C⁻ hypothalamic primary cultures

	PGA II/dish ^a	PGA II/DNA ^b	μg of DNA/dish	μg of membrane protein/dish
Ara-C ⁺	46.8 ± 4.3	2.2 ± 0.3	22.8 ± 2.3	94.9 ± 6.7
Ara-C ⁻	33.4 ± 3.5 ^c	0.6 ± 0.1 ^d	52.6 ± 4.3 ^d	114.8 ± 9.0

Hypothalamic cell cultures at 10 DIV treated (Ara-C⁺) or not (Ara-C⁻) with the antimitotic agent Ara-C were used. Ara-C was added at 5 DIV (final concentration 10 μM). PGA II was measured in the membrane fraction obtained as described in Materials and Methods. Data represent the means ± SEM of eight individual dishes.

^a Femtomoles of His-ProNH₂ per minute.

^b Femtomoles of His-ProNH₂ per minute per microgram of DNA.

^c *p* < 0.01; ^d *p* < 0.001 compared to Ara-C⁺ by Student's *t* test.

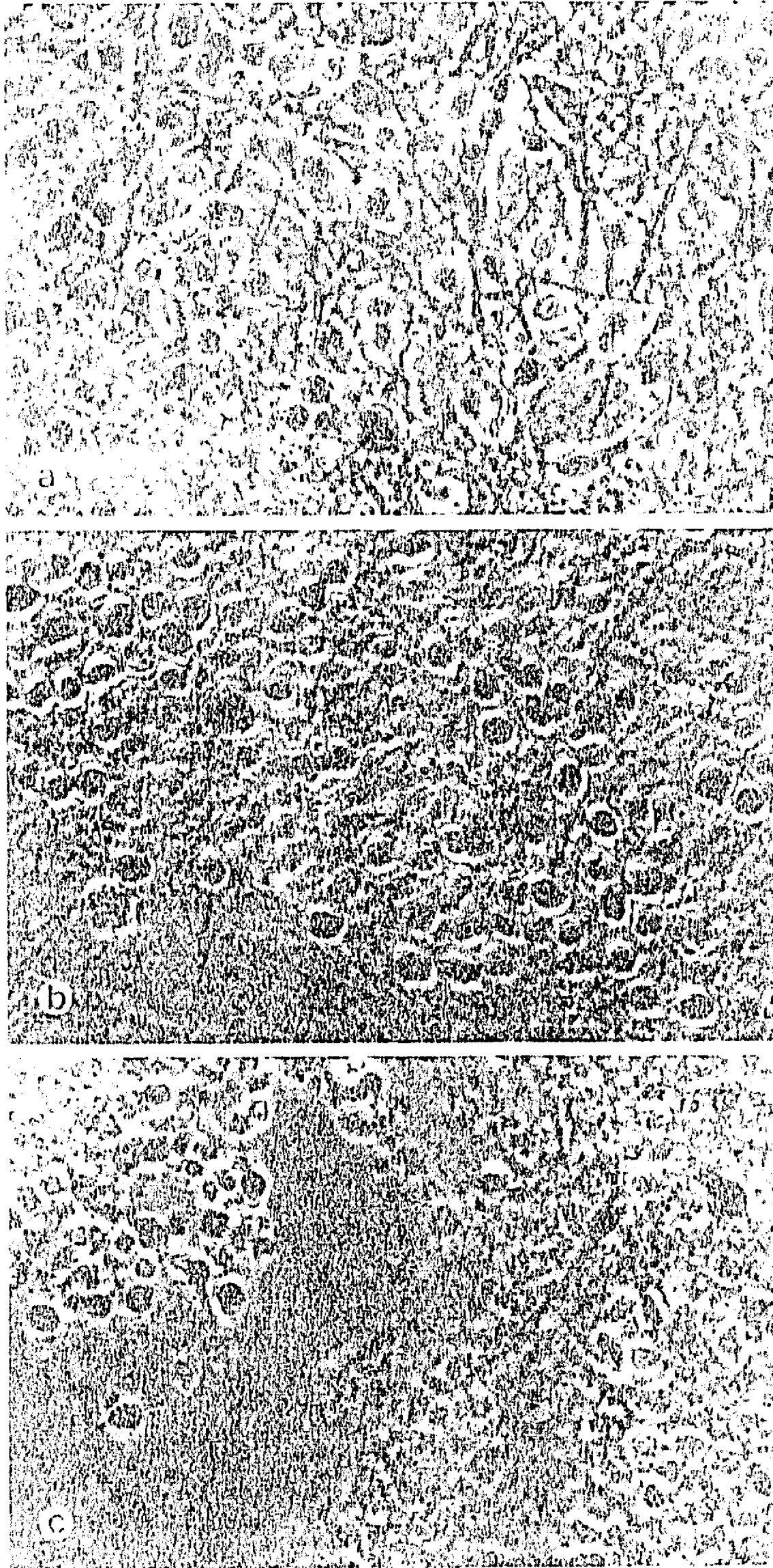


FIG. 3. Effect of glutamate treatment on the morphology of cortical primary cell culture grown in serum-supplemented medium. Cells were stained with anti-NSE. a: Cells at 11 DIV just before treatment. b: Cells 10 min after beginning of 0.5 mM glutamate treatment. c: Thirty-six hours after glutamate treatment.

(Fig. 4). Cells obtained from newborn animals developed into a glial culture (McCarthy and de Vellis, 1980). Most cells were stained with GFAP antibody

and neuron-like cells were not observed (Fig. 1f). In these cultures, PGA II activity was not detected, in contrast to PGA I activity which was high (Fig. 2).

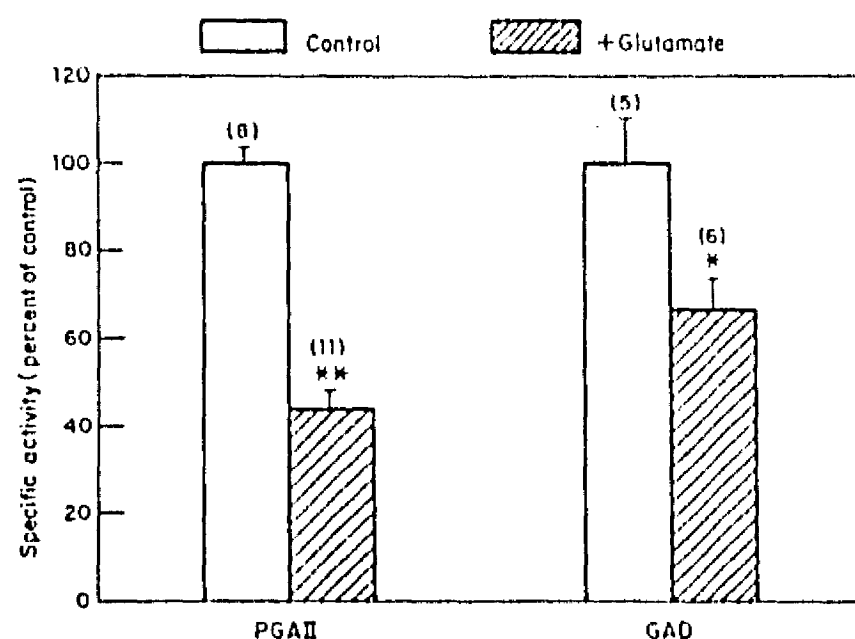


FIG. 4. Effect of glutamate on PGA II and GAD activities in cortical primary cultures. Cell cultures at 11 DIV were incubated with glutamate (final concentration 0.5 mM) for 10 min. After thorough washes, cells were incubated for an additional 36-h period until assayed. PGA II and GAD activities were measured in the membrane and soluble fractions respectively, obtained as described in Materials and Methods. Data bars represent the means \pm SEM of number of individual dishes between parentheses. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$ compared to control by paired Student's *t* test.

Cortical cultures obtained from 14-day-old fetus kept for over 3 weeks in vitro showed a spontaneous and progressive neuronal degeneration; after 20 DIV, PGA II activity was not detected in the remaining glial cells whereas it was still possible to detect PGA I activity (not shown).

DISCUSSION

We have used primary cell cultures obtained from hypothalamic or cortical tissue to study the cellular localization of PGA II. Although structural integrity of cell interactions in the brain is not preserved in primary cultures, they represent a useful model for studying the inactivation mechanisms of neuropeptides. Cultured neuronal and glial cells have been used to study several aspects related to the localization of peptidases involved in intra- and extracellular metabolism of neuropeptides (Horthemske et al., 1983; Koshiya et al., 1985; Faivre-Bauman et al., 1986).

We have previously reported that TRH is degraded by PGA II to His-ProNH₂ by intact cortical cells in primary culture maintained in serum-supplemented medium (Charli et al., 1988). In contrast to our data, Faivre-Bauman et al. (1986) were unable to detect TRH degradation when the peptide was added exogenously to murine hypothalamic cultures grown in defined medium. This discrepancy is not due to a regional difference because PGA II activity was also detected in hypothalamic cultures. The presence of serum in our culture medium cannot account for TRH degradation because thyroliberinase activity is very low in serum-supplemented medium (Charli et al., 1988). Factors present in serum may be necessary to induce enzyme

activity. PGA II was detected as early as 4 DIV both in hypothalamic and in cortical cultures. In murine hypothalamic neurons this stage represents a primitive phase where spontaneous electrical activity and excitability are present, but mature synaptic contacts have not developed (Legendre et al., 1988). The data suggest that expression of the enzyme in vitro is partially independent of functional synapse formation. Studies on the ontogenetic pattern of PGA II showed that the highest activity of PGA II in brain in vivo is observed at early postnatal stages when synaptogenesis occurs (Vargas et al., in preparation).

The lack of PGA II degrading activity in our glial cultures or in the polygonal cell population observed after spontaneous neuronal degeneration is coincident with other reports. No TRH degradation is detected in astroblasts or in cyclic AMP-treated astroblasts in primary culture (Bauer, 1987), and a negligible activity of PGA II is present in the glial line C6 (Wilk et al., 1988), which by contrast has an important PGA I activity. A preliminary report showed that PGA II is present in cultures of pure neurons (Bauer, 1987). The expression in a cell type could still be determined by cell interactions between neurons and glia. It is known that there is a functional linkage between neurons and glial cells. Astroglial cells in primary culture regulate synaptic density (Meshel et al., 1987) and are able to release factors into the media that promote attachment, growth, and survival of neurons (Banker, 1980; Faivre-Bauman et al., 1984). The presence of glutamine synthetase activity in glial cells has been postulated to serve in the process of ammonia detoxification (Hertz, 1982). Likewise, it has been shown that development and expression of metabolic activities in almost pure cell

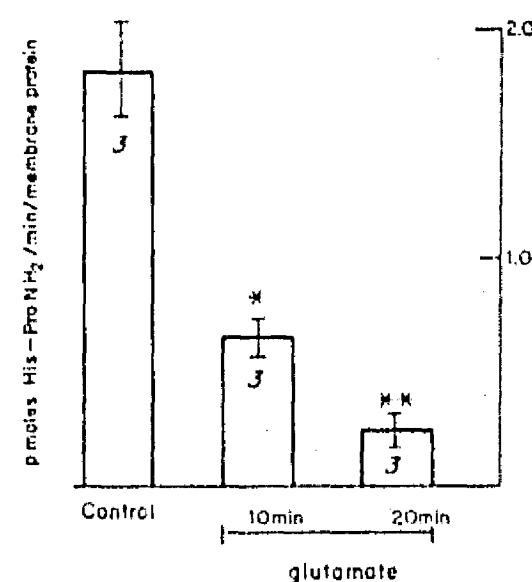


FIG. 5. Time dependence of glutamate on TRH degradation by PGA II in intact cells. Cortical cell cultures (11 DIV) were incubated or not with glutamate (0.5 mM) for the indicated times. After thorough washing, cells were incubated for an additional 36-h period. Cultures were washed twice with PBS and incubated with [³H]TRH (10⁻⁶ M) in the presence of ZPP (10⁻⁵ M) and PDMK (10⁻⁵ M), specific inhibitors of PE and PGA I, respectively. His-[³H]ProNH₂ production was measured as indicated in Materials and Methods. Data bars represent the means \pm SEM, number of individual dishes between parentheses. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to control by Student's *t* test.

cultures is different from that in mixed cell cultures. For example, cortisol-mediated induction of glutamine synthetase in Müller glial cells requires histotypic cell association between these glial cells and retinal neurons (Moscona et al., 1980) and the presence of glial cells affects the release of somatostatin from cortical cells in culture (Pares-Herbuté et al., 1988). In some instances, no correlation is found between *in vitro* or *in vivo* studies; endopeptidase 24.11 detected in cultured glial cells (Horthemske et al., 1983) was not confirmed with histochemical techniques (Black and Gorenstein, 1989). Therefore, we decided to use culture conditions that preserve the neuronal-glial interactions. Evidence that PGA II is present in neuronal cells is demonstrated by the significant increase of its specific activity observed in hypothalamic cultures with a higher neuronal/glial ratio. We cannot however exclude the possibility of other effects of Ara-C, as reported in other culture systems (Sisken et al., 1985; Patel et al., 1988).

Neurotoxins have been used as an experimental tool *in vivo* to define the cellular localization of some peptidases (Koshiya et al., 1984). The selective neuronal degeneration observed *in vitro* after glutamate treatment, concomitantly with the significant reduction of PGA II activity, strongly supports the neuronal localization of this enzyme. The activity of GAD, a neuronal enzyme, was also significantly diminished by effect of neurotoxin but to a lesser extent than PGA II ($34 \pm 4\%$ versus $56 \pm 6\%$ of control values, respectively). This could be attributed to the selective resistance that some cell populations show to the effect of neurotoxins (Monaghan et al., 1982; Greenamyre et al., 1985). In particular, γ -aminobutyric acid immunoreactive neurons in cortical cultures appear modestly resistant following exposure to certain concentrations of the glutamate analog *N*-methyl *D*-aspartate (NMDA) (Tecoma and Choi, 1989). Other subpopulation of forebrain neurons containing somatostatin and NADPH-diaphorase show resistance to quinolinate, an NMDA analog, while being highly vulnerable to glutamate (Koh et al., 1986). The residual activity of PGA II and GAD observed could therefore be due to incomplete elimination of the different neuronal populations, reflecting a particular receptor distribution. Furthermore, the neurotoxic potency of glutamate on cortical cells in culture is highly dependent on ions, temperature, pH, time of exposure, and age of the culture (Choi et al., 1987; Favaron et al., 1988).

The work presented here provides evidence that the TRH-specific degrading enzyme PGA II is a neuronal enzyme. This is consistent with previous data showing that the enzyme is enriched on the synaptosomal plasma membrane (O'Connor and O'Cuinn, 1984; Torres et al., 1986). In contrast, PGA I activity is present in glial cells as has been shown also for PE, another enzyme degrading TRH *in vitro* (EC 3.4.21.26) (Koshiya et al., 1985). Our laboratory has recently shown that specific inhibition of PGA II increases TRH recovery released from brain slices *in vitro* (Charli et al.,

1989). Current data concerning its narrow substrate specificity, membrane localization, and heterogeneous distribution in brain strengthen the hypothesis that it is the neuropeptidase responsible for extracellular TRH inactivation. The predominant localization of PGA II in neurons, on the nerve terminal plasma membrane, suggests a role in TRH-ergic synaptic transmission.

Acknowledgment: We would like to thank Dr. R. Tapia and Dr. R. Franco-Bourland for helpful discussions, and Dr. S. Wilk for the gift of *N*-benzyloxycarbonyl prolylproline and pyroglutanyl diazomethyl ketone. The skillful technical assistance of E. Mata and S. Gonzalez in animal care is gratefully acknowledged. This work was supported in part by CONACYT, Fundación Miguel Alemán, and the Third World Academy of Sciences.

REFERENCES

- Albers R. W. and Brady R. D. (1959) The distribution of glutamate decarboxylase in the nervous system of the Rhesus monkey. *J. Biol. Chem.* **234**, 926-928.
- Banker G. A. (1980) Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science* **209**, 809-810.
- Bauer K. (1987) Degradation and biological inactivation of thyrotropin-releasing hormone and other neuropeptides, in *Integrative Neuroendocrinology: Molecular, Cellular and Clinical Aspects* (McCann S. M. and Weiner R. L., eds), pp. 102-114. Karger, Basel.
- 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.
- Black S. A. and Gorenstein C. (1989) Histochemical visualization of neutral endopeptidase 24.11 "enkephalinase" activity in rat brain: cellular localization and codistribution with enkephalins in the globus pallidus. *J. Neurosci.* **9**, 4439-4455.
- Booher J. and Sensenbrenner M. (1972) Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* **2**, 97-105.
- Charli J. L., Mendez M., Joseph-Bravo P., and Wilk S. (1987) Specific inhibitors of pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase do not change the *in vitro* release of TRH or its content in rodent brain. *Neuropeptides* **9**, 373-378.
- 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., Mendez M., Vargas M. A., Cisneros M., Assai M., Joseph-Bravo P., and Wilk S. (1989) Pyroglutamyl peptidase II inhibition specifically increases recovery of TRH released from rat brain slices. *Neuropeptides* **14**, 191-196.
- Choi D. W., Maulucci-Gedde M., and Kriegstein A. R. (1987) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* **7**, 357-368.
- Dichter M. A. (1978) Rat cortical neurons in cell culture, methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Res.* **149**, 279-293.
- Elmore M. A., Griffiths E. C., O'Connor B., and O'Cuinn G. (1990) Further characterization of the substrate specificity of a TRH hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Neuropeptides* **15**, 31-36.
- Erwin B. G., Stoscheck C. M., and Florini J. R. (1981) A rapid fluorometric method for the estimation of DNA in cultured cells. *Anal. Biochem.* **110**, 291-294.
- Faivre-Bauman A., Puymirat J., Loudes C., Barret A., and Tixier-Vidal A. (1984) Laminin promotes attachment and neurite elongation of fetal hypothalamic neurons grown in serum-free medium. *Neurosci. Lett.* **44**, 83-89.

- 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.
- Favaron M., Manev H., Alho H., Bertolino M., Ferret B., Guidotti A., and Costa E. (1988) Gangliosides prevent glutamate and kainate neurotoxicity in primary neuronal cultures of neonatal rat cerebellum and cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7351-7355.
- 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 prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase. *J. Neurochem.* 46, 1231-1239.
- 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.
- Greenamyre J. T., Olson J. M. M., Penney J. B., and Young A. B. (1985) Autoradiographic characterization of *N*-methyl-D-aspartate-, quisqualate-, and kainate-sensitive glutamate binding sites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 233, 254-263.
- Hertz L. (1982) Astrocytes, in *Handbook of Neurochemistry, Vol. 1* (Lajtha A., ed), pp. 319-355. Plenum Press, New York.
- Horsthemke B., Hamprecht B., and Bauer K. (1983) Heterogeneous distribution of enkephalin degrading peptidases between neuronal and glial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115, 423-429.
- Koh J.-Y., Peters S., and Choi D. W. (1986) Neurons containing NADPH-diaphorase are selectively resistant to quinolinate toxicity. *Science* 234, 73-76.
- Koshiya K., Kato T., Tanaka R., and Kato T. (1984) Brain peptidases: their possible neuronal and glial localization. *Brain Res.* 324, 161-170.
- Koshiya K., Okada M., Imai K., Kato T., Tanaka R., Hatanaka H., and Kato T. (1985) Localization of angiotensin-converting enzyme, prolyl endopeptidase and other peptidases in cultured neuronal or glial cells. *Neurochem. Int.* 7, 125-130.
- Legendre P., Tixier-Vidal A., Brigant J. L., and Vincent J. D. (1988) Electrophysiology and ultrastructure of mouse hypothalamic neurons in culture: a correlative analysis during development. *Dev. Brain Res.* 43, 273-285.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- McCarthy K. D. and de Vellis J. (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* 85, 890-902.
- Mendez M., Cruz C., Joseph-Bravo P., Wilk S., and Charli J. L. (1990) Evaluation of the role of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I in the metabolism of LHRH and TRH in brain. *Neuropeptides* 17, 52-62.
- Meshel C. K., Seif F. J., and Herndon M. (1987) Astrocytes play a role in regulation of synaptic density. *Brain Res.* 402, 139-145.
- Metcalf G. and Jackson I. M. D., eds. (1989) *Ann. NY Acad. Sci. Vol 553: Thyrotropin-Releasing Hormone: Biomedical Significance*. The New York Academy of Sciences, New York.
- Monaghan D. T., Holets V. R., Toy D. W., and Cotman C. W. (1982) Anatomical distributions of four pharmacologically distinct ³H-L-glutamate binding sites. *Nature* 306, 176-179.
- Moscona A. A., Mayerson P., Linsler P., and Moscona M. (1980) Induction of glutamine synthetase in the neural retina of the chick embryo: localization of the enzyme in Müller fibers and effects of BrdU and cell separation, in *Tissue Culture in Neurobiology* (Giacobini E., Vernadakis A., and Sahar A., eds), pp. 111-127. Raven Press, New York.
- O'Connor B. and O'Cuinn G. (1984) Localization of a narrow-specificity pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain. *Eur. J. Biochem.* 144, 271-278.
- O'Connor B. and O'Cuinn G. (1985) Purification of and kinetic studies on a narrow specificity synaptosomal membrane pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Eur. J. Biochem.* 150, 47-52.
- O'Cuinn G., O'Connor B., and Elmore M. (1990) Degradation of thyrotropin releasing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone by enzymes of brain tissue. *J. Neurochem.* 54, 1-13.
- Pares-Herbuté N., Bonet A., Peraldi S., Pin J.-P., Gabrion J., Astier H., and Tapia-Arancibia L. (1988) The presence of non-neuronal cells influences somatostatin release from cultured cerebral cortical cells. *Dev. Brain Res.* 40, 89-97.
- Patel A. J., Seaton P., and Hunt A. (1988) A novel way of removing quiescent astrocytes in culture of subcortical neurons grown in a chemically defined medium. *Dev. Brain Res.* 42, 283-288.
- Ponce G., Charli J. L., Pasten J. A., Aceves C., and Joseph-Bravo P. (1988) Tissue-specific regulation of pyroglutamate peptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 48, 211-213.
- Sisken B. F., Roberts E., and Goetz I. (1985) Triethanolamine, Tris, Hepes and cytosine arabinoside show neuritogenic activity in cultured chick embryo ganglia. *Exp. Neurol.* 88, 27-43.
- Tapia R. and Meza-Ruiz G. (1976) Differences in some properties of newborn and adult brain glutamate decarboxylase. *Neurochem. Res.* 1, 133-140.
- Tecoma E. S. and Choi D. W. (1989) GABAergic neocortical neurons are resistant to NMDA receptor-mediated injury. *Neurology* 39, 676-682.
- Tixier-Vidal A. and de Vitry F. (1979) Hypothalamic neurons in cell culture. *Int. Rev. Cytol.* 58, 291-331.
- 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.
- Vargas M., 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. *Neurosci. Lett.* 79, 311-314.
- Wilk S. and Wilk E. (1989) Pyroglutamyl peptidase II, a thyrotropin releasing hormone degrading enzyme: purification and specificity studies of the rabbit brain enzyme. *Neurochem. Int.* 15, 81-90.
- Wilk S., Suen C. S., and Wilk E. (1988) Occurrence of pyroglutamyl peptidase II, a specific TRH degrading enzyme in rabbit retinal membranes and in human retinoblastoma cells. *Neuropeptides* 12, 43-47.

APENDICE

Participación de la enzimas solubles PGA I y PE en la regulación del contenido intracelular del TRH en el cerebro de roedores y en cultivos hipotalámicos.

Como se describió en la introducción existen en el cerebro dos actividades enzimáticas solubles las cuales son capaces de degradar *in vitro* al TRH: piroglutamato aminopeptidasa I, (PGAI) y prolil endopeptidasa (PE), (Prasad y Peterkovski, 1976; Rupnow y cols., 1979b). Debido a su presencia en el compartimento citosólico de las células nerviosas (Griffiths y cols., 1982; Browne y O'Cuinn, 1983a; Torres y cols., 1986), se ha sugerido su posible participación en los mecanismos de control de los niveles intracelulares del TRH.

Basados en estudios sobre su caracterización enzimática se han sintetizado inhibidores específicos de su actividad: la piroglutamil diazometilcetona (PDMK) que inhibe irreversiblemente a la PGA I (Wilk y cols., 1985), y el N-benziloxycarbonil prolilprolinal (ZPP) que inhibe reversiblemente a la PE (Wilk y Orłowski, 1983). Estos inhibidores son compuestos no tóxicos, estables, reactivos y altamente selectivos, además de que poseen características lipofílicas que los hacen permeables a las membranas biológicas y a la barrera hematoencefálica. La disponibilidad de estos inhibidores permitió probar su efecto sobre los niveles de TRH tanto *in vivo* como *in vitro*. La hipótesis de trabajo supone que si estas enzimas poseen un papel relevante en la inactivación intracelular del tripéptido, entonces la inhibición de su actividad debería estar asociada a un incremento en los niveles intracelulares de TRH y probablemente a la disponibilidad del péptido a ser liberado. Los resultados iniciales mostraron sin embargo que en el ratón la administración simultánea *in vivo* de los dos inhibidores no alteraba el contenido cerebral de TRH en diversas áreas cerebrales (hipotálamo, hipófisis, tallo cerebral y núcleo accumbens-septum lateral), a excepción del bulbo olfatorio en donde se redujeron los niveles del péptido (Charli y cols., 1987). Se observó además que a pesar de la fuerte inhibición enzimática, no se presentaron diferencias en la recuperación del TRH liberado *in vitro* por parte de rebanadas obtenidas del cerebro, hipófisis o páncreas de la rata (Charli y cols., 1987).

En contraste a estas observaciones se reportó que el tratamiento de cultivos primarios hipotalámicos con el compuesto Z-Gly-ProCHN₂, un inhibidor de ambas enzimas, incrementaba el contenido celular de TRH, así como la cantidad de TRH liberado bajo condiciones basal y estimulada por alto K⁺ (Faivre-Bauman y cols., 1986).

En base a estas diferencias y debido a los posibles problemas referentes a la penetración de los inhibidores *in vivo*, y a la posibilidad de que los resultados negativos estuvieran relacionados con el rápido recambio (turnover) de la enzima, decidimos extender nuestras investigaciones. La estrategia experimental en este trabajo estuvo dirigida a:

- 1- Determinar el efecto *in vivo* de ambos inhibidores sobre los niveles de TRH en el hipotálamo y bulbo olfatorio de ratones, en condiciones en las que se asegurara una inhibición efectiva de ambas enzimas, aún por tiempos prolongados. El bulbo olfatorio se escogió como una región sobre la cual comparar los resultados obtenidos en el hipotálamo en base a la presencia de neuronas TRHérgicas en esta región (Tsuoro y cols., 1988), las altas concentraciones del péptido existentes (Kreider y cols., 1981a), su independencia del eje hipotálamo hipofisiario (Kreider y cols., 1982) y a la observación previa de la reducción específica en esta región de la cantidad de TRH presente como resultado de la administración de estos inhibidores (Charli y cols., 1987).

2- Analizar el efecto de los inhibidores en diferentes preparaciones in vitro. Inicialmente probamos el efecto de la incubación por tiempos cortos de PDMK y ZPP sobre el contenido y liberación basal y estimulada por alto K^+ de TRH-IR de rebanadas de tejido hipotalámico y de bulbo olfatorio obtenidos de ratas machos adultas. Dada la posibilidad de mantener a los inhibidores por tiempos más prolongados extendimos posteriormente estas observaciones a dos sistemas de cultivo celular: los cultivos primarios derivados de tejido hipotalámico fetal del ratón, los cuales poseen neuronas TRHérgicas que expresan y liberan al péptido bajo distintos estímulos depolarizantes (Loudes y cols., 1983; Lewis y cols., 1987b) y el cultivo organotípico de eminencias medias, región en donde se localizan las terminales nerviosas TRHérgicas provenientes del hipotálamo y que por lo tanto contiene las pozas de TRH liberables relacionadas con su efecto hipofisiotrófico.

De manera paralela a estas investigaciones M. Méndez analizó el efecto que ejercían los inhibidores específicos sobre el contenido in vivo de LHRH en diferentes regiones cerebrales y sobre la liberación in vitro de LHRH de rebanadas o fragmentos de tejido hipotalámico.

La actividades de PGAI y PE fueron determinadas en las fracciones solubles correspondientes (células dispersas de cultivos hipotalámicas o de corteza cerebral, eminencias medias, hipotálamo y bulbo olfatorio), utilizando ensayos espectrofluorométricos específicos para cada una de las enzimas. En todos los casos se determinó el grado de inhibición de las enzimas solubles causada por efecto de los inhibidores específicos. Los resultados obtenidos de estas investigaciones en conjunto se encuentran descritos en la **Publicación 3**.

RESULTADOS

Efecto de PDMK y ZPP en cultivo primarios de células hipotalámicas y organotípico de eminencias medias.

La incubación con los inhibidores específicos ZPP y PDMK (10^{-5} M, c.final) hasta por 24 horas, no produjo cambios morfológicos evidentes sobre las células en cultivo.

La actividad de las enzimas en los cultivos hipotalámicos disminuyó drásticamente después de 1 hr en presencia de los inhibidores: PGA I 97.6 ± 0.3 %, y PE 65.8 ± 13.8 % (n=7) de los valores controles. La inhibición se mantuvo aún después de 24 horas: 66.3 % y 71.9 % (n=6) de los valores control de PGAI y PE respectivamente.

La inhibición de las enzimas solubles no afectó la liberación de TRH basal y estimulada por K^+ , ni el contenido intracelular del péptido en los cultivos primarios a ninguno de los tiempos probados (1, 6 y 24 hr) (**Publicación 3, tabla 1**). De manera similar, la presencia de los inhibidores no modificó en ningún momento la cantidad de TRH presente en la eminencias medias en cultivo organotípico. (**Publicación 3, fig. 1**).

Efecto de PDMK y ZPP sobre los niveles *in vivo* de TRH y sobre el contenido y liberación *in vitro* en el bulbo olfatorio.

La inyección intraperitoneal simultánea de PDMK y ZPP *in vivo* por distintos periodos, produjo una disminución significativa en la actividad de PGAI a nivel del hipotálamo y el bulbo olfatorio, a todos los tiempos ensayados, principalmente a tiempos cortos (Publicación 3, fig. 5). En contraste la actividad de la PE que en el hipotálamo se redujo en promedio un 70%, no se modificó en el bulbo olfatorio a ninguno de los tiempos probados (Publicación 3, fig. 5).

El tratamiento *in vivo* de los inhibidores produjo una reducción del contenido de TRH en el bulbo olfatorio (aproximadamente del 40% con respecto al control), únicamente después de 13 hr de tratamiento (Publicación 3, fig. 5), en tanto no modificó los niveles intracelulares del tripéptido en el hipotálamo.

La presencia continua (70 min) de los inhibidores en el medio de incubación de las rebanadas de bulbo olfatorio no modificó ni el contenido, ni el patrón de liberación de TRH *in vitro*, (Publicación 3, fig. 6).

Con el objeto de descartar la posibilidad existente de que estos resultados negativos se debieran a una pobre penetración de los compuestos en los tejidos se llevó a cabo el experimento mostrado en la Figura 9. Los resultados obtenidos indican claramente que la inhibición enzimática de la PGAI y PE detectada en las fracciones solubles tanto *in vivo* como *in vitro*, ocurre efectivamente por efecto de la internalización de los inhibidores y no como resultado artefactual de la exposición de la enzima a la acción de los mismos al momento en que se producía la ruptura del tejido al ser homogenizado.

Discusión

Estos resultados confirman un trabajo previo del laboratorio (Charli y cols., 1987), el cual muestra que *in vivo* la inhibición específica de las enzimas solubles PGAI y PE no modifica los niveles de TRH en el hipotálamo y otras regiones del cerebro de la rata, excepción hecha del bulbo olfatorio, en donde se observa una disminución inesperada en la cantidad de TRH. Este mismo comportamiento se observó en el caso de LHRH tanto *in vivo* como *in vitro*, el cual posee una Km aún menor que el TRH para ambas enzimas (Busby y cols., 1982; Brown y O'Cuinn, 1983a, O'Cuinn y cols., 1990). La ausencia de efecto *in vitro* de los inhibidores sobre el contenido y/o liberación de TRH en las preparaciones de cultivo de eminencia media y de células hipotálamicas confirman estos resultados. Existe sin embargo un reporte que indica que la incubación de cultivos primarios hipotálamicos por una hora con el compuesto Z-Gly-ProCHN₂ provoca un aumento en el contenido y liberación de TRH medido 24 horas más tarde (Faivre-Bauman y cols., 1986). Esta discrepancia con nuestros resultados no parece ser debida a una mayor penetración de este compuesto en las células en cultivo comparado con nuestros inhibidores, como lo demuestra el grado de inhibición enzimática observado en nuestros experimentos en condiciones similares (Publicación 1). El hecho de que el Z-Gly-ProCHN₂, un inhibidor de la PE (Knisatschek y Bauer, 1986) inhiba de manera potente la actividad de la PGAI indica un efecto inespecífico sobre cisteín proteasas, lo cual abre la posibilidad de que los resultados positivos antes reportados sean debidos a otros factores. En apoyo a lo anterior se ha reportado que la administración *in vivo* del Z-Gly-ProCHN₂ no modifica los niveles de TRH en el cerebro (Bauer, 1988).

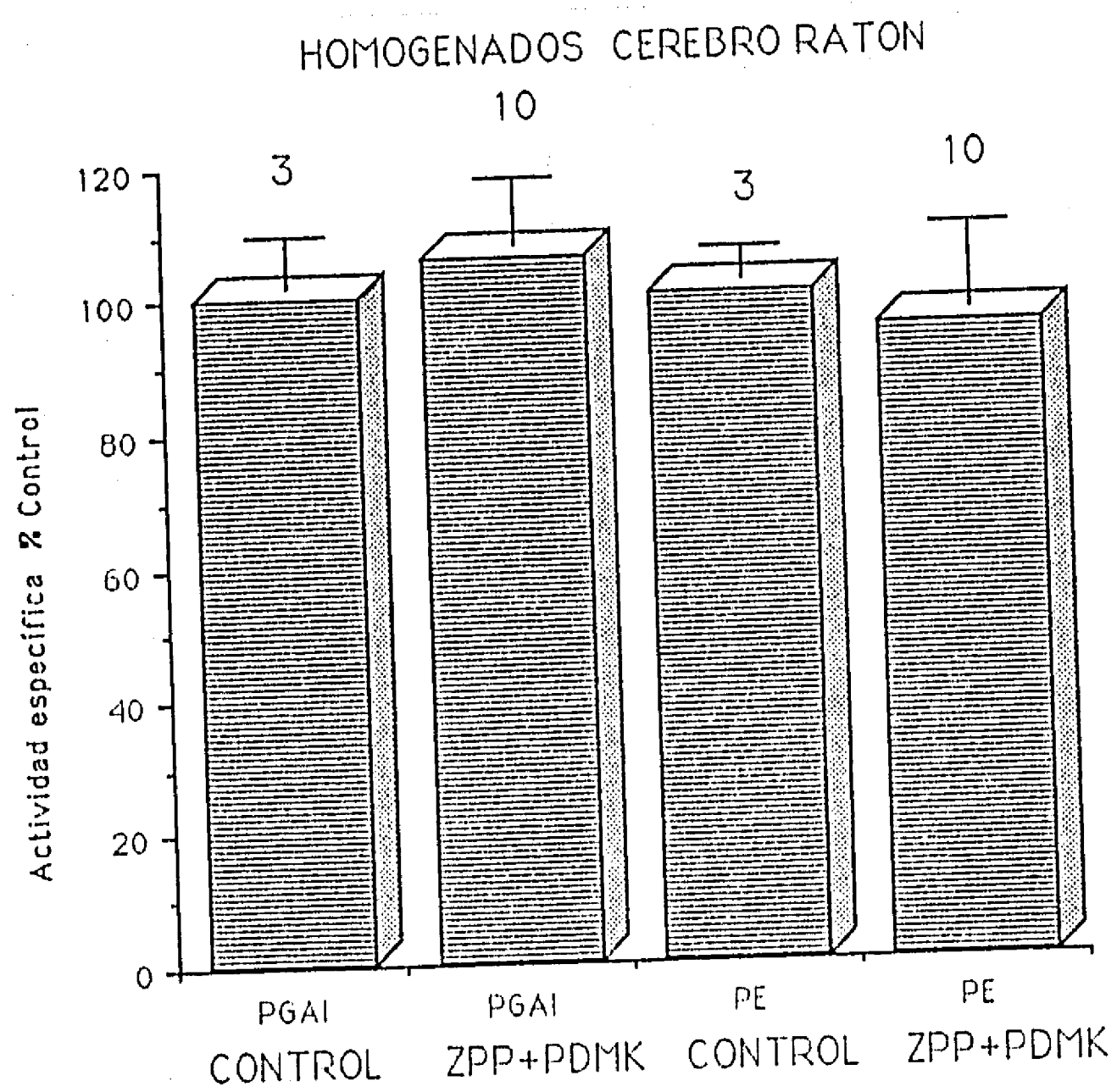
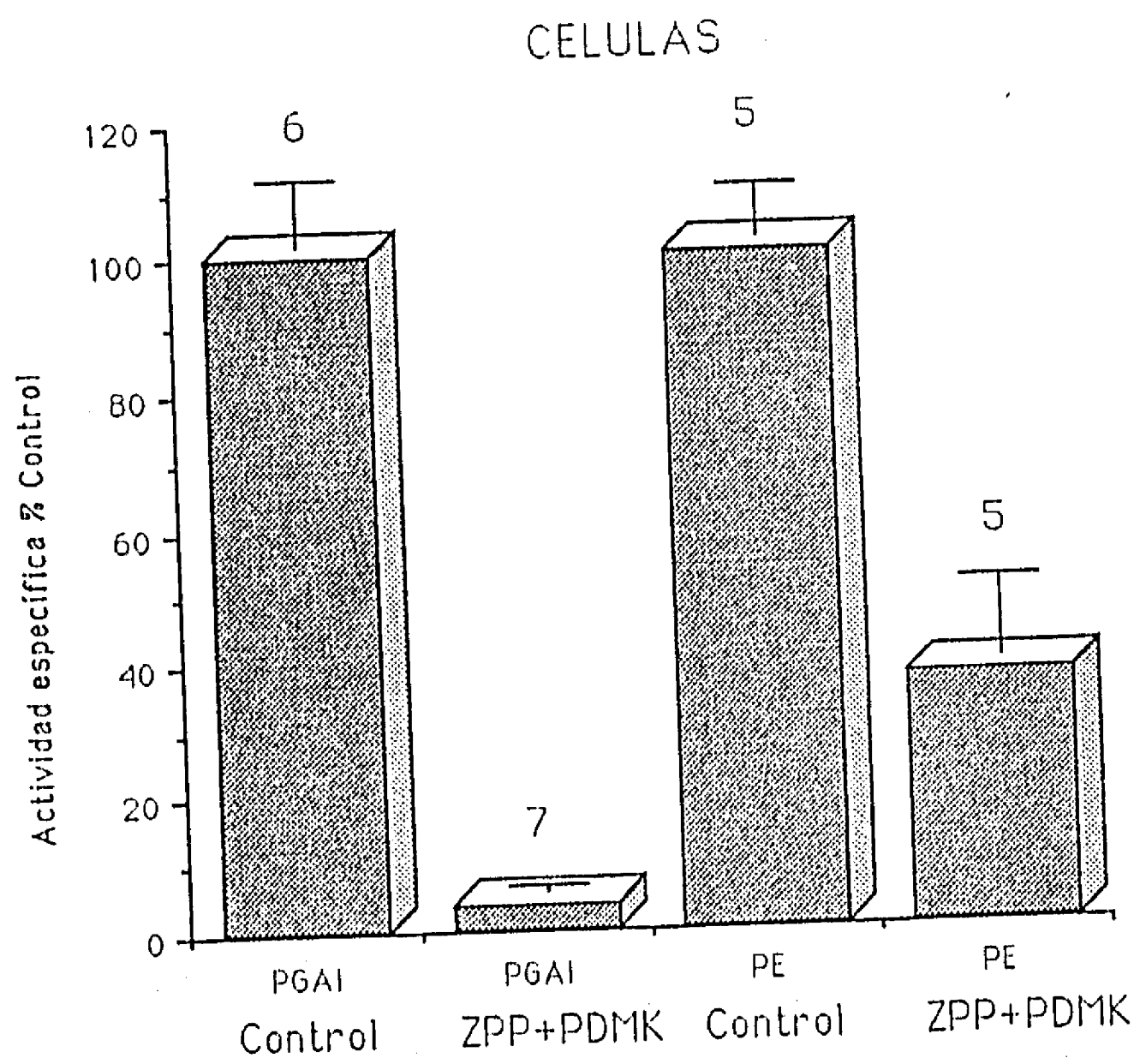
FIGURA 9

Figura 9

Efecto de PDMK y ZPP sobre la actividad de PGAI y PE en cultivos de células de corteza cerebral.

Células de corteza cerebral en cultivo (Ara C+, 12 DIV) se incubaron en presencia de PDMK y ZPP ($10 \text{ min } 10^{-5} \text{M}$), inhibidores de las enzimas solubles PGAI y PE respectivamente. Al término de la incubación los cultivos se lavaron exhaustivamente con PBS, manteniéndose posteriormente durante 10 min en presencia de la fracción soluble obtenida de un homogenado al 10 % de la corteza cerebral del ratón adulto, preparada en una solución isotónica. Al término de la incubación la fracción soluble se recuperó y las células se lavaron exhaustivamente. Se determinó la actividad de las enzimas PGAI y PE presente en las fracciones solubles celulares correspondientes (células en cultivo y fracción soluble del homogenado del cerebro de ratón adulto) mediante ensayos fluorométricos específicos.

Las barras representan el promedio \pm el error estándar del % de actividad específica remanente de cada una de las enzimas con respecto al control.



La disminución en el contenido de TRH y LHRH en el bulbo olfatorio observada en los experimentos in vivo, podría ser explicada a través de un aumento en la liberación de los péptidos, como resultado de una estimulación en la actividad degradativa de los mismos, o bien a través de la inhibición de los mecanismos de procesamiento de los precursores. Sin embargo al menos para el caso de TRH la incubación por tiempos cortos de los dos inhibidores de las enzimas solubles no modificó el patrón de liberación del tripéptido en rebanadas de bulbo olfatorio (Publicación 3, fig.6). En células GH₃ se ha observado que la actividad de la PGAI se ve incrementada cuando las células son incubadas en presencia del 5 oxo-prolinal (Friedman y cols., 1986), un inhibidor específico y reversible de la enzima (Friedman y cols., 1985); en nuestras condiciones el PDMK, compuesto aún más potente, produjo una inhibición considerable en la actividad de la enzima soluble. La falta de efecto inhibitorio mostrada por el ZPP sobre la PE in vivo (Publicación 3, fig. 5), pero no in vitro en el bulbo olfatorio (Tabla 10) es un resultado que no apoya la posibilidad de que existan isoenzimas de la PE en estas áreas cerebrales con sensibilidades distintas al inhibidor. La accesibilidad limitada de este compuesto específicamente a la zona del bulbo olfatorio es poco probable dada las características lipofílicas del mismo y el efecto mostrado por el otro inhibidor. El bulbo olfatorio es una región que posee características distintas con respecto al TRH comparandolo con el hipotálamo: por ejemplo se ha propuesto que el proTRH es procesado de manera diferente en estas dos regiones (Wu, 1989), además el bulbo olfatorio posee la actividad más baja de la enzima amidante PAM de todas las regiones cerebrales (40 veces menor que en el hipotálamo) (Meng y Tsuo, 1988). Ya que la inhibición de la PGAI y de la PE podrían alterar el metabolismo de otros péptidos (que contengan un grupo piroglutamil o prolina respectivamente) surge la posibilidad de que ocurran efectos indirectos o no específicos de los inhibidores sobre alguno de los eventos relacionados con el procesamiento in vivo de TRH o LHRH.

Conclusión

El papel que el TRH y los otros péptidos activos desempeña en la comunicación nerviosa requiere que estos se encuentren en disponibilidad de ser liberados bajo un estímulo específico. La formación y mantenimiento de estas pozas liberables de péptidos es un proceso dinámico que depende no solo de la velocidad con la que se llevan a cabo los eventos relacionados con su síntesis, transporte, almacenamiento y liberación, sino también es función de la tasa a la cual estos son eliminados del compartimento terminal. Debido a que los compartimentos de síntesis y liberación de los neuropéptidos se encuentran en sitios físicamente distantes es poco probable que el mantenimiento de los niveles en la terminal nerviosa esten sujetos únicamente al control del soma neuronal. Por ejemplo, se ha observado en experimentos sobre la biosíntesis de novo de TRH en cultivo, la liberación preferencial del péptido almacenado en pozas preformadas con respecto al TRH recién sintetizado en respuesta a un estímulo depolarizante (Loudes y cols., 1989), evento que pudiera estar asociado a un aumento en el procesamiento de proTRH.

Es probable entonces que existan otros mecanismos intraterminales accesorios que permitan regular la concentración de los péptidos en respuesta a las demandas funcionales a las que esten sujetas en un momento determinado las neuronas peptidérgicas. Sin embargo se desconocen cuales son los mecanismos de control, ni la manera en que se encuentran regulados.

Tabla 10

Efecto in vitro de PDMK y ZPP sobre la actividad de PE y PGAI presentes en rebanadas de bulbo olfatorio, hipotálamo y corteza.

		PGAI	PE
BO	C	0.17 ± 0.05	2.47 ± 0.24
	I	ND	0.07 ± 0.04
HI	C	0.14 ± 0.04	1.22 ± 0.08
	I	ND	ND
CF	C	0.14 (2)	3.46 ± 0.47
	I	ND	ND

Rebanadas de bulbo olfatorio (BO), hipotálamo (HI) o corteza frontal (CF) del cerebro de la rata fueron incubadas en Ringer Krebs-Bicarbonato en presencia (I) o ausencia (C) de PDMK y ZPP ($10^{-5}M$) durante 2 períodos continuos de 30 min. Al término de la incubación las rebanadas se lavaron exhaustivamente y se preparó un homogenado de las mismas. La actividad de las enzimas se determinó en la fracción soluble obtenida después de centrifugar los homogenados por 30 min a 10,000 g.

La actividad específica esta expresada como nmolas de β -naftilamida liberada/ min/ mg proteína soluble.

Los datos representan el promedio \pm el error estándar de 4 determinaciones por separado.

ND = actividad no detectada

Entre los mecanismos propuestos que podrían intervenir en la movilización de las distintas pozas de péptidos presentes se encuentran: variaciones en la tasa de liberación, transporte retrógado de las vesículas o gránulos de secreción o bien a través de cambios en la tasa de degradación o eliminación de los mismos. Este recambio (turnover) de los péptidos en la terminal nerviosa es un aspecto poco estudiado del metabolismo de las neuronas peptidérgicas, particularmente por las dificultades metodológicas que implica la determinación de esta tasa. En el caso de las encefalinas en el estriado y probablemente del TRH en el hipotálamo se han mostrado evidencias experimentales que indican la existencia de valores rápidos de recambio (Llorens-Cortes y cols., 1986; Fink y cols. 1982; Greef y cols., 1985).

La observación de que los péptidos activos en el Sistema Nervioso son degradados rápidamente *in vitro* por actividades enzimáticas presentes en homogenados o fracciones subcelulares del cerebro, sugiere un posible papel de la degradación enzimática en el mantenimiento de las pozas liberables (Griffiths y McDermott, 1983; Schwartz, 1983).

En el caso particular del TRH la existencia de dos enzimas solubles presentes en el cerebro PGAI y PE capaces de degradar *in vitro* al TRH había sugerido la posible participación de las mismas en el mantenimiento de los niveles intraterminales del péptido en el Sistema Nervioso. La disponibilidad de inhibidores específicos para ambas enzimas nos permitió probar esta posibilidad en distintos modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*. La ausencia de efectos de estos compuestos sobre los niveles de intracelulares y sobre la liberación de TRH y LHRH (otro neuropéptido sujeto a la degradación por parte de estas enzimas) descartan la posible intervención de estas peptidasas solubles en la regulación de los niveles intracelulares de TRH.

¿Cuál es entonces el papel de estas enzimas?

Debido a su localización intracelular ni la PE, ni la PGAI pudieran tener participación en los mecanismos de degradación extracelular del TRH u otros péptidos. No se ha observado liberación de estas enzimas por parte de células en cultivo (Faivre-Bauman y cols., 1986), ni por rebanadas de hipotálamo (J. Miranda, resultados no publicados).

La actividad de estas enzimas es muy alta en la fracción soluble citosólica obtenida del cerebro de la rata (Garat y cols., 1985). Sin embargo en la fracción sinaptosomal soluble solo existe entre un 5-10% de la actividad total detectada (Torres y cols., 1986), lo cual podría ser sugerente de una localización exclusiva de la enzimas en una población pequeña de todas las terminales nerviosas o bien que gran parte de las pozas de estas enzimas no son transportadas hasta las terminales nerviosas. Asimismo no existe una correspondencia entre su distribución subcelular y la del TRH el cual se encuentra presente principalmente a nivel de las terminales nerviosas (Barnea y cols., 1976; Winokur y cols., 1977), localizado en el interior de gránulos neurosecretores y en vesículas de cuerpo denso (70-100 nm) (Johansson y cols., 1983). Queda la posibilidad de que estas enzimas representen un mecanismo que permita al péptido liberado de vesículas dañadas o envejecidas ser degradado para formar parte de las pozas de aminoácidos libres. Esta posibilidad depende de una localización celular neuronal de las mismas, lo cual no se ha demostrado de manera fehaciente. Utilizando la técnica de lesión del ácido kaínico, Koshiya y cols. (1984) sugirieron que parte de la PE se encuentra localizada en neuronas. No obstante otras evidencias tanto *in vivo*, como *in vitro* indican que esta también se localiza en la población glial (Koshiya y cols., 1985; Metlein y cols., 1990). En el caso de la PGA I no existen estudios al respecto. Un análisis de distintas líneas celulares mostró que la actividad más alta

de entre de todas ellas se localiza en la línea celular glial C6 (Wilk y cols., 1988). La actividad de la enzima mostró ser significativamente mayor en cultivos gliales puros derivados de tejido cortical neonatal o en cultivos hipotalámicos mayores a 20DIV compuestos esencialmente por células gliales comparada con cultivos mixtos corticales e hipotalámicos Ara C+ respectivamente (Figura 10; **Publicación 2, fig.2**), sugere que gran parte de la misma se localiza en células gliales. La PE y la PGAI también se encuentran presentes en línea celular de origen hipofisiario GH₃, en donde se ha observado que la PGAI es regulada por diferentes efectores como el 5-oxoprolinal (Friedman y cols., 1986), el butirato de sodio (Suen y Wilk, 1989a) y por altas concentraciones de T₃ (Suen y Wilk, 1987). Por lo tanto su presencia en otros tipos celulares diferentes de las células neuronales sugiere que estas peptidasas solubles podrían tener otros papeles funcionales secundarios, por ejemplo en los mecanismos de eliminación (clearance) de los péptidos por parte de las células gliales o adenohipofisarias, función que dependería estrictamente de la captura o internalización inicial de los mismos. Como se describió en la introducción no existen evidencias de la existencia de mecanismos eficientes de captura para los péptidos por parte de las células nerviosas, sin embargo para el caso de TRH y LHRH se ha descrito su presencia en el interior de células adenohipofisarias (Gourdji y cols., 1973; Brunet y cols., 1974; Laverrière y cols., 1981; May y cols., 1987).

Es importante puntualizar que en cualquier caso el papel que la degradación enzimática pudiera tener en el control de los niveles intracelulares de los péptidos debería estar ligado al proceso de translocación del péptido desde su sitio de almacenamiento al sitio en donde se lleva a cabo la degradación. En algunos tipos celulares esto ocurre como resultado de la fusión de los gránulos de secreción con lisosomas, proceso conocido como crinofagia, lo cual permite a las enzimas lisosomales tener acceso con los péptidos activos, como se ha propuesto en el caso de la prolactina en la adenohipófisis (referencia) y de la insulina en las células beta del páncreas (Farquhar, 1977). Sin embargo en el caso de los neuropéptidos estos mecanismo de translocación se desconocen.

Actividad de PGA I en cultivos neuronales y gliales

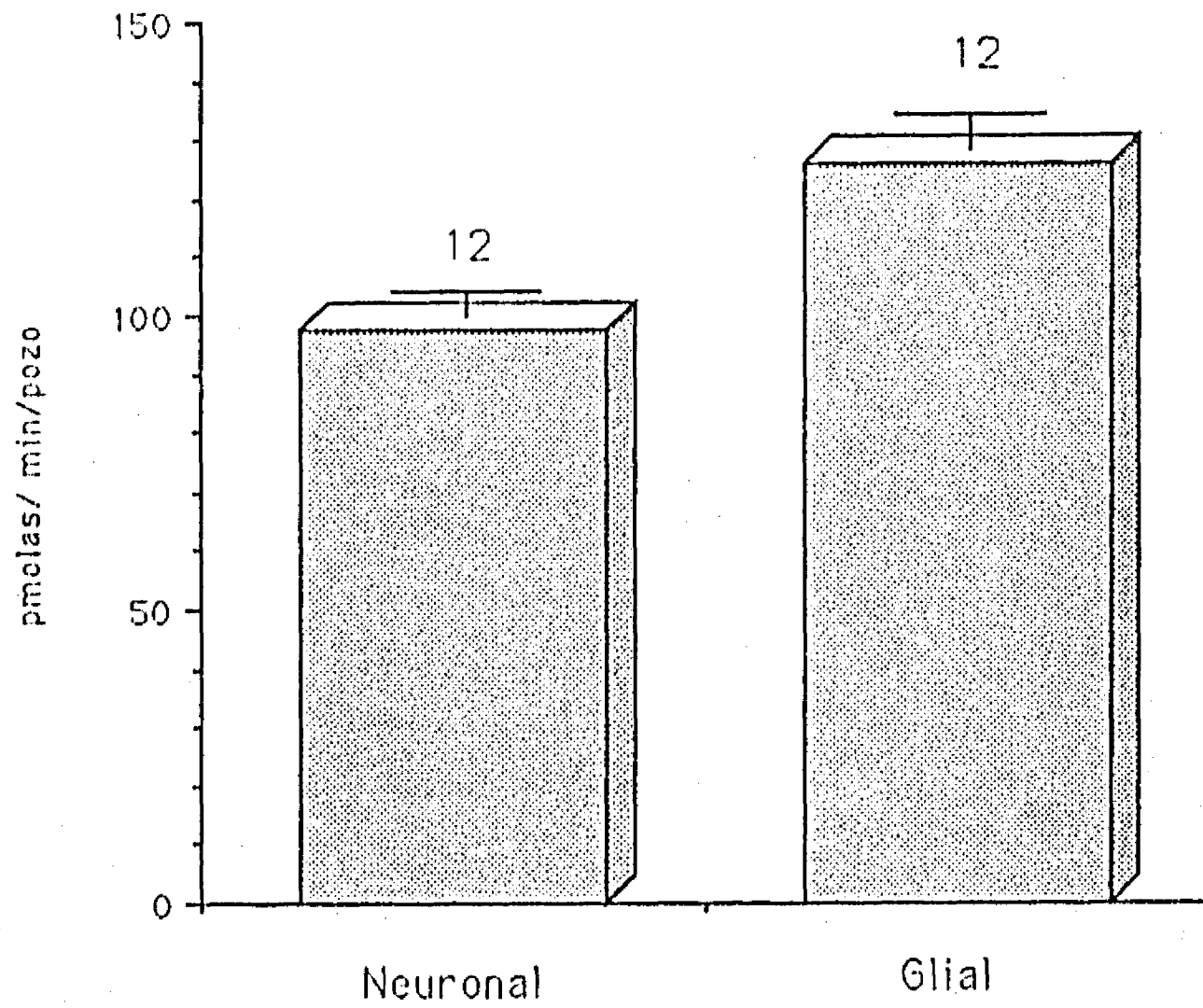


Fig. 10

Actividad de PGAI en cultivos neuronales y gliales

Se determinó la actividad de PGA I presente en cultivos de corteza cerebral de ratón (Ara C+, 12 DIV) y en cultivos gliales derivados de la corteza neonatal del ratón (<20 DIV), utilizando TRH ³H como sustrato.

Las barras representan las pmolas His-ProNH₂ / mg proteína soluble / pozo promedio ± el error estándar del número de pozos indicados, correspondientes a 4 cultivos distintos.

ANEXO 2

Publicación 3

Evaluation of the Role of Prolyl Endopeptidase and Pyroglutamyl Peptidase I in the Metabolism of LHRH and TRH in Brain

M. MENDEZ, C. CRUZ, P. JOSEPH-BRAVO, S. WILK† and J. L. CHARLI

Departamento de Bioquímica de Proteínas, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3, Cuernavaca Mor. 62271, México.
†*Department of Pharmacology, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY 10029, USA. (Reprint requests to JLC)*

Abstract—Intraneuronal peptide regulatory mechanisms are still poorly understood. The cytosolic enzymes prolyl endopeptidase (EC 3.4.21.26) and pyroglutamyl peptidase I (E.C.3.4.19.3) degrade both TRH and LHRH. Previous studies from this laboratory have not supported a role for these enzymes in the control of TRH levels. These studies have now been extended to cell and organ cultures and examine the effects of enzyme inhibition on LHRH. Exposure of dispersed hypothalamic cells or median eminences in culture to Z-Pro-Prolinal and pyroglutamyl diazomethyl ketone, specific inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I respectively, did not change TRH content or recovery of released TRH. *In vivo* and *in vitro* treatment with these inhibitors did not modify the content of LHRH or recovery of this peptide upon release from several brain regions except in the olfactory bulb where an unexpected decrease in levels was observed. Olfactory bulb levels of TRH also decreased but only after prolonged *in vivo* inhibitor treatment. The decrease in olfactory bulb LHRH and TRH could not be accounted for by enzyme induction and is likely due to a non-specific or indirect effect of the inhibitors on the processing of these peptides. These studies demonstrate that levels of LHRH and TRH in brain are not controlled by cytosolic peptidases.

Abbreviations

ZPP, N-benzyloxycarbonyl prolyl prolinal;
PDMK, pyroglutamyl diazomethyl ketone; Z-Gly-Pro-CHN₂, N-benzyloxycarbonyl glycyl pro-

lyl diazomethyl ketone; RIA, radioimmunoassay;
PGAI, pyroglutamyl peptidase I; prolyl endopeptidase; TRH, thyrotropin releasing hormone; LHRH, luteinizing hormone releasing hormone.

Introduction

Events that control intra- and extracellular levels of physiologically active peptides have been exten-

Date received 20 March 1990
Date accepted 21 March 1990

sively 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). The narrow specificity membrane-bound enzyme pyroglutamyl peptidase II (EC 3.4.19. __) likely fulfills this role in the extracellular degradation of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) (2-5). However, the intracellular turnover of neuropeptides 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 proven. Two cytosolic enzymes, pyroglutamyl peptidase I (PGA1) (EC 3.4.19.3) and prolyl endopeptidase (PE) (EC 3.4.21.26) degrade TRH and other peptides in brain homogenates (6-8). Subcellular distribution studies have shown, however, that less than 10% of their total activity is present at the nerve terminal (9). Since neuropeptides are compartmentalized in granules they would be expected to be protected from the action of cytosolic peptidases. Specific inhibitors to these enzymes have been used to elucidate their role in controlling TRH levels. Pyroglutamyl diazomethyl ketone (PDMK) irreversibly inhibits PGA1 while N-benzyloxycarbonyl prolyl proline (ZPP) reversibly inhibits PE (10,11). We have reported that *in vivo* or *in vitro* treatment with these two inhibitors does not alter tissue content or recovery of TRH released *in vitro* in brain, hypothalamus or pancreas in spite of strong enzyme inhibition (12). In contrast to our observations, Faivre Bauman et al. (13), found that treatment of hypothalamic primary cell cultures with Z-Gly-Pro-CHN₂, an inhibitor of both enzymes, does increase cellular TRH content and the amount of TRH released under basal and K⁺-stimulated conditions.

In order to resolve these discrepant findings, we extended our studies on PGA1 and PE inhibitors to organ and cell cultures. In addition, another peptide substrate of these enzymes, Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH), which has a lower Km than TRH for both enzymes (14, 15) was also investigated. Finally, in olfactory bulb we performed further studies in an attempt to explain the lower TRH levels found after *in vivo* treatment with these inhibitors (12).

Materials and Methods

Materials

TRH and LHRH were obtained from Peninsula Laboratories, Belmont, CA.; pGlu-β-naphthylamide and pGlu-His-Pro-β-naphthylamide were products of Bachem Inc., Torrance, CA.; ¹²⁵I (17 Ci/mg) was obtained from ICN Radiochemicals, Costa Mesa, CA.; Z-Pro-Prolinal and PDMK were synthesized as previously described (10, 11). Media, sera, glutamine, antibiotic mixture and vitamin mix were from Gibco Laboratories, Grand Island, NY. All other chemicals were reagent grade from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, or from J. T. Baker, Phillipsburg, N. J. LHRH antiserum was a generous gift from Dr. A. Barnea.

Primary cultures. Hypothalamic or cortical tissue was obtained from embryonic day 14 mice. Initiation and maintenance of cultures was essentially as described by Charli et al. (4), except that cells were plated in poly D-lysine-coated 35 mm dishes at 10⁵ cells/cm² in a total volume of 2 ml. To study the effects of PDMK and ZPP on TRH content, hypothalamic cells (11DIV) were rinsed twice with phosphate buffered saline (PBS) and incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-10% fetal calf serum with or without PDMK and ZPP (10⁻⁵M final concentration of each) for up to 24 h at 37°C. For release experiments, treated or control cells were rinsed twice with PBS and incubated for 30 min in 300 μl of Krebs-Ringer-Bicarbonate (KRB: 125 mM NaCl, 4.4 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.3 mM MgSO₄, 26 mM NaHCO₃, 10 mM glucose, 2.5 mM CaCl₂) pH 7.4 at 37°C. Medium (basal TRH release) was withdrawn and 300 μl KRB containing 56 KCl was added. Cells were incubated for an additional 30 min (stimulated TRH release). At the end of the incubation, media were removed, cells washed twice with PBS and separately processed for TRH content by RIA.

Organ culture of median eminences. Male Wistar rats (200-300g) were killed by decapitation and median eminences were immediately dissected and placed in DMEM 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 16mm wells in 500 μ l DMEM plus glucose (0.25%) and 1mM glutamine. Tissue fragments were incubated with or without PDMK and ZPP (10^{-5} final concentration of each) for 0, 4, 8, 12 and 24h. Tissue and media were processed for TRH determination as described for primary cell cultures.

Release experiments from brain slices. TRH release from rat olfactory bulb slices and LHRH release from intact medial basal hypothalamus (MBH) or hypothalamic slices was studied between 11 and 14h as previously described (12, 16). PDMK and ZPP were present from the beginning of the incubation at a concentration of 10^{-5} M each. Media and tissues were collected at the end of the incubation and extracted for TRH and LHRH quantitation.

In vivo experiments. CD-1 male mice (20-30g) were intraperitoneally injected with inhibitors (100 μ l/25g bw) dissolved in water (PDMK) or in 10% methanol (ZPP) as described (12). Mice were killed by cervical dislocation and tissues were dissected 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 also studied.

Enzymatic assays. Tissues were homogenized in 0.05M phosphate buffer pH 7.5 (20% w/v) and homogenates centrifuged for 15 min, 1000g at 4°C. Supernatants were centrifuged for 15 min, 8000g 4°C and the final supernatant used as the enzyme source. PGAI and PE activities were measured spectrophotometrically by determining the release of aromatic amine from the appropriate chromogenic substrate (PGAI: pglu- β -naphthylamide, PE: pGlu-His-Pro- β -naphthylamide), (3), according to the diazotization procedure of Bratton and Marshall (17) as modified by Goldberg and Rutenburg (18). At the end of the incubation, samples were kept at 4°C for 1h, centrifuged and a 250 μ l supernatant aliquot removed and subjected to the diazotization procedure. Chromogenic substrate released was calculated from a standard

curve constructed with known amounts of chromogen. Activities were calculated subtracting zero time values. Under assay conditions, enzymatic activity was proportional to incubation time and amount of protein.

TRH and LHRH extraction and radioimmunoassays. Peptide extraction from media and tissue samples and TRH RIA was performed as described (16) using the R₂ specific anti-TRH antibody previously characterized (19). LHRH RIA (20) was performed using an antibody kindly donated by Dr. A. Barnea.

Protein determination. Proteins were measured by the method of Lowry et al (21).

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

Results

Effect of PDMK and ZPP on dispersed hypothalamic cells and median eminence organ cultures

Hypothalamic and cortical cells in culture maintained for up to 24h in the presence of 10^{-5} M each of 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: 97.6% and PE: 63.8% inhibition, n=7). Moreover, after long term incubation (24h) with these compounds, PGAI and PE activities were still inhibited (PGAI: 66.3% and PE: 71.9% inhibition, n=6). Neither TRH release from hypothalamic cells nor peptide content remaining in cells were modified at any time tested (Table).

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

LHRH responses to PDMK and ZPP treatment

Mediobasal hypothalamic (MBH) fragments of hypothalamic slices were incubated in the presence of 10^{-5} M each of PDMK and ZPP, under conditions that completely inhibited PGAI and PE activities (12). Depolarizing concentrations of K⁺ caused an increased release of LHRH, as previously reported (22). The presence of inhibitors in

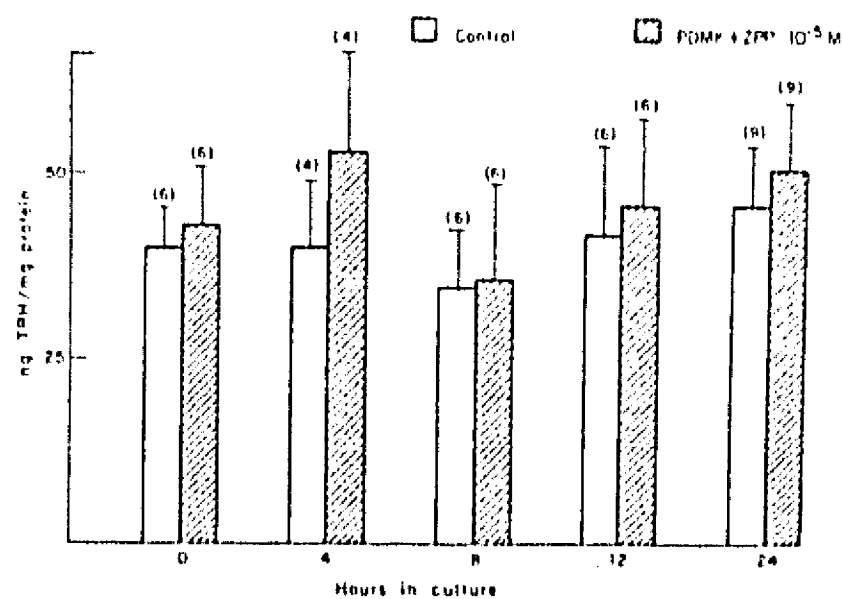


Fig. 1 Effect of PDMK and ZPP on TRH content of median eminences in organ culture. Rat median eminences were incubated in presence or absence of 10^{-5} M each of PDMK and ZPP for the times indicated. Data are the mean \pm standard error of the mean of the number of independent determinations shown in parentheses.

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 nucleus accumbens-lateral septum after 13h of treatment (Fig. 4). A significant reduction (40%) was observed however, in olfactory bulb LHRH (Fig. 4), as previously described for TRH (12).

Effect of PDMK and ZPP on enzyme activities and TRH levels in olfactory bulb

The fact that LHRH was decreased in olfactory bulb led us to further analyze the effect of these inhibitors on PGAI and PE activities and on TRH levels in this particular region. As previously reported, 13h treatment induced a pronounced inhibition in brain PGAI and PE (98 and 70% respectively) (Fig. 5). 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 also shown in Figure 5: there was no effect on PE in olfactory bulb at any time, while the time course of inhibition of PGAI was similar to olfactory bulb compared to the rest of the brain.

Failure to detect a 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 differences in the sensitivity of PE to ZPP in the two regions (data not shown). An effect of inhibitors on TRH levels in olfactory bulb was only observed after prolonged exposure (Fig. 5). Short time *in vivo* (Fig. 5) 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 (23) and processing enzymes recognized (24). Processing enzymes and peptide degrading

Table Effect of PDMK and ZPP on TRH Content and Release from Hypothalamic Cells in Culture

Cell content after release	TRH released in 30min/dish			Total TRH
	a (basal)	b (stimulated)	bla	
A (1h)				
Control:	52 \pm 8 (8)	64	1.9	149
Inhibitor:	43 \pm 9 (8)	78	2.7	150
B (6h)				
Control:	38 \pm 7 (6)	47	2.1	107
Inhibitor:	33 \pm 8 (6)	62	1.8	130
C (24h)				
Control:	44 \pm 16 (7)	53	1.3	139
Inhibitor:	36 \pm 11 (6)	54	1.5	126

Hypothalamic cell cultures (11 days *in vitro*) were rinsed twice with PBS, and incubated in the presence or absence of PDMK and ZPP (10^{-5} M each) in DMEM-1% PBS, 0.25% glucose for 1h (A), 6h (B), or 24h (B), or 24h (C) at 37°C. At the end of the incubation, the medium was discarded, the cells rinsed extensively with PBS and groups A and B maintained in DMEM-10% PBS 0.25% glucose for an additional period of time (23 and 18h respectively). C group cells were used immediately. After this period, cells were rinsed again in PBS and incubated in KRB as described for the release experiments (see Materials and Methods). Cell content after release is expressed as the mean pg TRH \pm standard error of the mean of the number of individual dishes indicated in parentheses. TRH released in 30min/dish: Each value is the mean of 2 determinations. Total TRH = pg TRH released plus cell content after release.

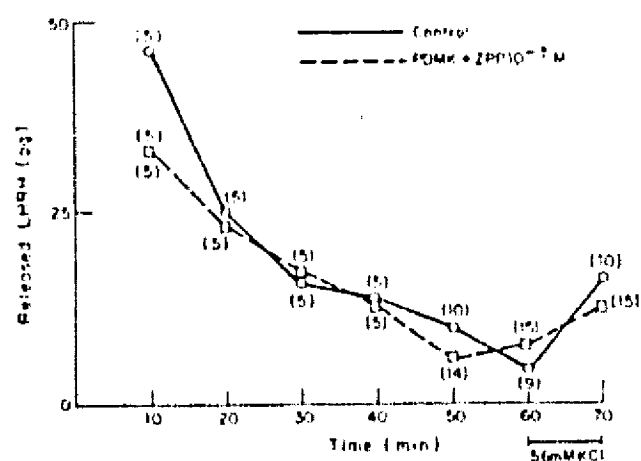


Fig. 2 Time course of LHRH release from hypothalamic slices. Effect of PDMK and ZPP. Rat hypothalamic slices were incubated in the presence or absence of 10^{-5} M PDMK and ZPP, which were present at the start of the incubation. Data are the mean of the number of independent determinations indicated in parentheses. The standard error of the mean was less than 10% in each case.

enzymes may participate in modulating peptide concentrations.

In a previous study (12) we reported that PGAI and PE inhibition had no effect on TRH levels in any brain region examined, except for olfactory bulb, where an unexpected decrease was observed. These findings have been confirmed and extended to hypothalamic cells and median eminences in culture. Faivre-Bauman et al. (13) using the compound Z-Gly-ProCHN₂, an inhibitor of both enzymes, found an increase in TRH content and release from hypothalamic primary cell cultures. The discrepancy between ZPP-PDMK and Z-Gly-ProCHN₂ effects cannot be explained by preferential availability of the inhibitors to cultured cells. The inhibition of PGAI by Z-Gly-ProCHN₂ indicates that this inhibitor interacts nonspecifically with cysteine proteinases and that a non-specific effect accounts for its action cells in culture. Moreover, Bauer (25) reported that *in vivo* treatment with Z-Gly-Pro-CHN₂ did not change TRH levels in brain. These observations taken together demonstrate that the cytosolic 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 LHRH levels. It is likely that LHRH levels are controlled by endopeptidase 24.15 which cleaves

this peptide at the Tyr⁵-Gly⁶ bond (26). It can be concluded that PGAI and PE are not involved in the control of cellular LHRH levels.

LHRH content showed the same behaviour as TRH in the olfactory bulb (12), i.e. an unexpected decrease following the *in vivo* administration of PDMK and ZPP. In GH3 cells the activity of PGAI increases when cells are grown in the presence of the specific and reversible PGAI inhibitor 5-oxoprolinal (27). PDMK on the other hand is an irreversible inhibitor and treatment with this compound led only to enzyme inhibition in the olfactory bulb. Of particular interest was the finding that ZPP treatment did not inhibit olfactory bulb PE at any time *in vivo* although olfactory bulb PE was effectively inhibited by ZPP *in vitro*. Although these findings suggest that ZPP *in vivo*

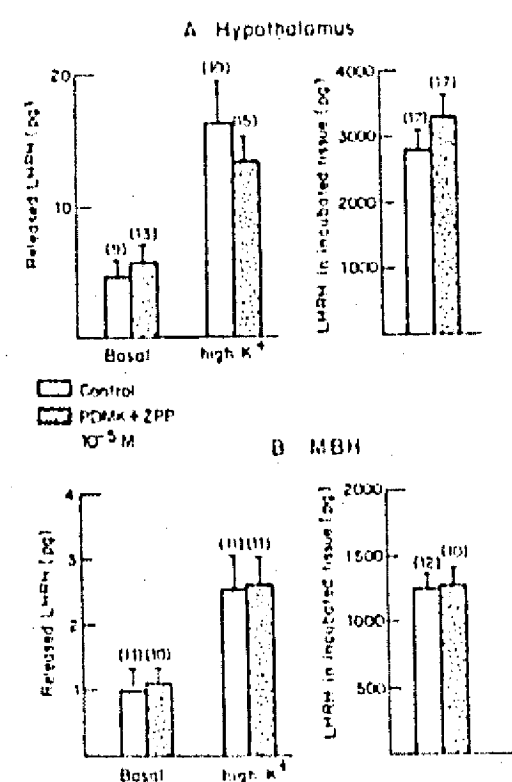


Fig. 3 Effect of PDMK and ZPP on LHRH release and content from hypothalamus and medial basal hypothalamus (MBH). LHRH release was performed as indicated in Figure 2. Released LHRH and content from hypothalamus and MBH were measured by RIA. Basal release corresponds to the amount of LHRH released during the 50-60min period, while stimulated release is that measured during the 60-70min period. Data are the mean \pm standard error of the mean of the number of determinations indicated in parentheses. Stimulated release was evaluated as the ratio of LHRH released in the presence of 56mM KCl over that released under basal conditions. These ratios were: hypothalamus, control: 2.9 ± 0.6 (n=9), inhibitors: 1.9 ± 0.4 (n=13); MBH, control: 2.7 ± 0.5 (n=11), inhibitors: 2.3 ± 0.2 (n=12).

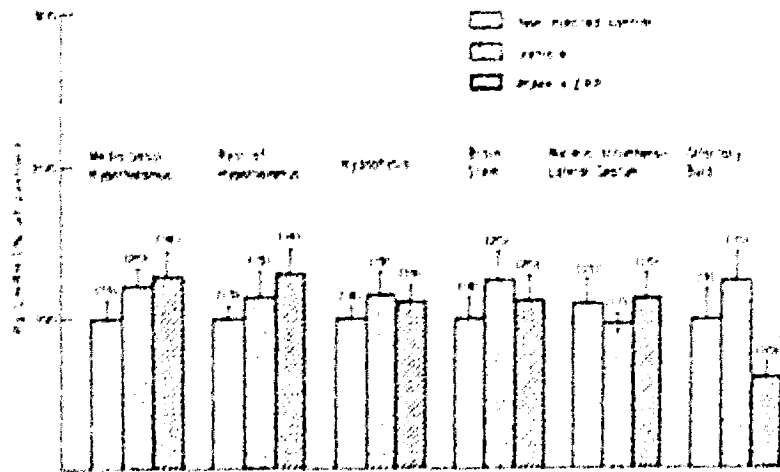


Fig. 4 *In vivo* effect of PDMK and ZPP on LHRH content in mouse brain. An initial dose of 5mg/kg of ZPP was intraperitoneally injected at 8a.m., followed by 1.25mg/kg at 12p.m., 2p.m., 4p.m., 6p.m., and 8p.m., 0.1mg/kg of PDMK was injected at 8a.m., and 12p.m. Mice were sacrificed at 9p.m. PGAI and PE activities were measured in the brain (without hypothalamus), and were 21 and 16% of control values respectively. Because of the seasonal variation of LHRH content observed in some brain regions, data are expressed as the percent LHRH present in the non-injected 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 and $p < 0.025$ compared with the non injected group. In olfactory bulb, LHRH concentration in the non injected group was 12.4 ± 2.1 (pg/mg prot) ($n=9$).

has limited accessibility to the olfactory bulb the lipophilic nature of this compound makes this possibility unlikely. The induction of olfactory bulb PE may explain the lack of inhibition following ZPP but an unchanged activity of PE would still not explain the decrease in neuropeptide levels. The olfactory bulb behaves differently compared to the hypothalamus with respect to TRH. For instance, the olfactory bulb has been proposed to process the TRH precursor differently from other brain regions (28) and to contain the lowest peptidyl glycine α -amidating activity in the brain (40 times less than the hypothalamus) (29). It must be remembered that inhibition of PGAI may alter the metabolism of other pyroglutamyl peptides and that inhibition of PE may alter the metabolism of other proline-containing peptides. A non-specific or indirect effect of these inhibitors at one of the processing events may therefore be responsible for the lower levels of TRH and LHRH observed in *in vivo* experiments.

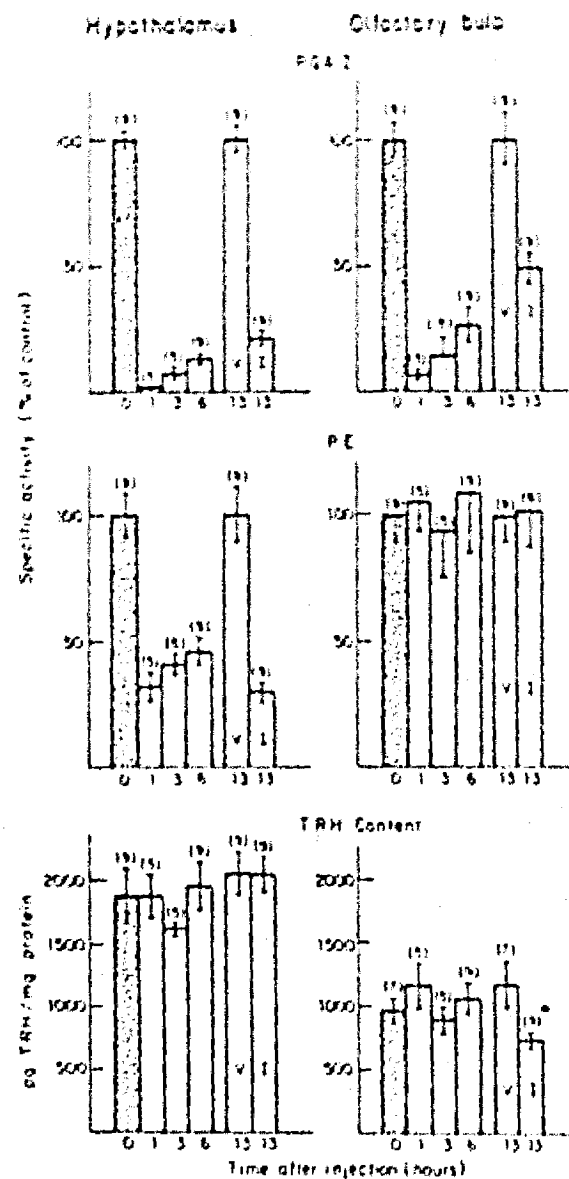


Fig. 5 *In vivo* effect of PDMK and ZPP on PGAI and PE activities and TRH content in mouse brain. The 13h group was treated with inhibitors as indicated in Figure 4. The 6h group was injected with 0.1mg/kg of PDMK and 5mg/kg of ZPP at 3p.m., followed by the same dose of PDMK and 1.25mg/kg of ZPP at 7p.m. The 3 and 1h groups received a single injection of 0.1mg/kg of PDMK and 5mg/kg of ZPP at 6p.m. and 8p.m. respectively. Animals from the 13 and 6h groups were killed 1 and 2h after the last injection respectively. All animals were sacrificed at 9p.m. in order to avoid fluctuations in TRH content due to circadian changes. To verify that injection did not lead to stress induced changes, we included a 13h group which received vehicle only. Difference between vehicle and the non injected group (dotted bar) N.S. 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 (nmoles/min/mg protein) in the non injected group were: brain, PGAI: 0.20 ± 0.01 ; PE: 1.96 ± 0.28 ; olfactory bulb, PGAI: 0.21 ± 0.03 ; PE: 1.71 ± 0.34 ($n=4$). Data represent the mean \pm standard error of the mean of the number of independent determinations indicated in parentheses. V=vehicle group; I=inhibitor group at 13h injection. * $p < 0.025$ compared to vehicle group.

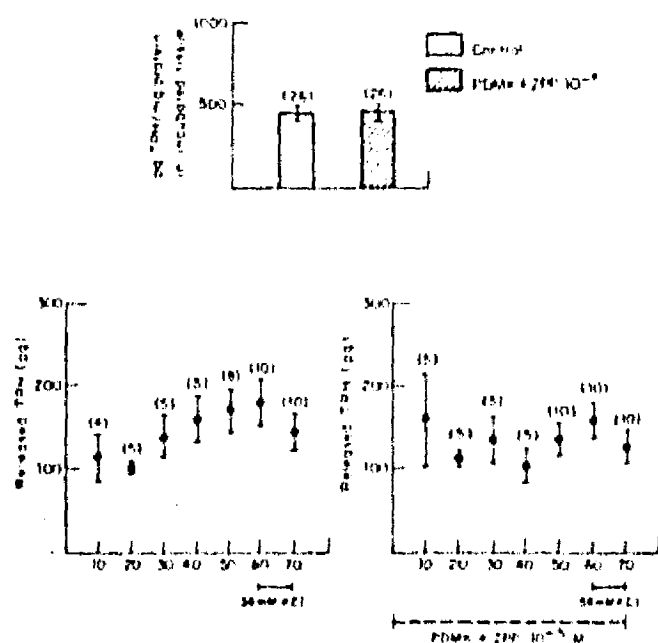


Fig. 6 *In vitro* effect of PDMK and ZPP on TRH content and release from rat olfactory bulb. Rat olfactory bulb slices were incubated as described in Figure 2. Data are the mean \pm standard error of the mean of the number of independent determinations indicated in parentheses.

Although the activity of PGAI is regulated in GH₃ cells by *s*-oxoprolinal (27), 3, 5, 3'-triiodothyronine (T3) (30) and sodium butyrate (31) and increased *in vivo* in several brain regions following chronic T3 treatment (32), the results reported here do not support a role for this enzyme in the normal control of brain TRH or LHRH levels. Similarly PE does not appear to be involved in the normal control of these neuropeptides. Other enzymes known to degrade TRH and LHRH (26, 33, 34) or other mechanisms may control peptide turnover at the nerve terminal.

Acknowledgements

The authors acknowledge the excellent technical assistance of Dr. E. Mata, S. Gonzalez and R. M. Uribe. This work was supported in part by grants from CONACyT (IBXNA-021044) and Fundacion Miguel Aleman A. C. S. Wilk was supported by NIH grants NS-17392 and a Research Scientist Award MH-00350.

References

1. Turner, A. J. (1988). Metabolism of Neuropeptides. ISI Atlas of Science: Pharmacology, 362-366.
2. O'Connor, B. and O'Cuinn, G. (1984). Localization of a narrow specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea pig brain. *Eur. J. Biochem.* 144: 271-278.

3. Friedman, T. C. and Wilk, S. (1986). Delineation of a particulate thyrotropin releasing hormone degrading enzyme in rat by the use of specific inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamate peptide hydrolase. *J. Neurochem.* 46: 1231-1238.
4. 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.
5. Charli, J. L., Mendez, M., Vargas, M. A., Cisneros, M., Asai M., Joseph-Bravo, P. and Wilk, S. (1989). Pyroglutamate Peptidase II inhibition specifically increases recovery of TRH released from rat brain slices. *Neuropeptides* 14: 191-196.
6. 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.
7. Knisatschek, H. and Bauer, K. (1979). Characterization of 'thyroliberin-deamidating enzyme' as a post-proline cleaving enzyme. *J. Biol. Chem.* 254: 10936-10943.
8. Orłowski, M., Wilk, E., Pearce, S. and Wilk, S. (1979). Purification and properties of a prolyl endopeptidase from rabbit brain. *J. Neurochem.* 33: 461-469.
9. 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.
10. Wilk, S., Friedman, T. C. and Kline, T. B. (1985). Pyroglutamate diazomethyl ketone: potent inhibitor of mammalian pyroglutamate peptide hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130: 662-668.
11. Wilk, S. and Orłowski, M. (1983). Inhibition of rabbit brain prolyl endopeptidase by N-benzyloxycarbonyl-prolyl-proline, a transition state aldehyde inhibitor. *J. Neurochem.* 41: 69-75.
12. Charli, J. L., Mendez, M., Joseph-Bravo, P. and Wilk, S. (1987). Specific inhibitors of pyroglutamate peptidase I and prolyl endopeptidase do not change the *in vitro* release of TRH or its content in rodent brain. *Neuropeptides* 9: 373-378.
13. 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.
14. Busby, W. H., Youngblood, W. W. and Kizer, (1982). Studies of substrate requirements, kinetic properties and competitive inhibitors of the enzymes catabolizing TRH in rat brain. *Brain Res.* 242: 267-270.
15. Brown, P. and O'Cuinn, G. (1983). An evaluation of the role of a pyroglutamate 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.
16. 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.
17. Bratton, A. C., and Marshall, E. K. (1939). A new coupling component for sulfanilamide determination. *J. Biol. Chem.* 128: 537-550.
 18. Goldberg, J. A. and Rutenberg, 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. Rotszlej, W. H., Charli, J. L., Pattou, E., Epelbaum, J. and Kordon, C. (1976). *In vitro* release of LHRH from rat mediobasal hypothalamus: effects of potassium, calcium and dopamine. *Endocrinology* 99: 1663-1666.
 23. 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.
 24. 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, PP. 7-13.
 25. 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. *Biochemie* 70: 69-74.
 26. Molineaux, C. J., Lasdun, A., Michaud, C. and Orłowski, 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.
 27. Friedman, T. C., Davies, T. F. and Wilk, S. (1986). Evidence for regulation of a Thyrotropin-Releasing Hormone degradation pathway in GH3 cells. *Endocrinology* 118: 562-566.
 28. Lechan, R. M., Wu, P. and Jackson, I. M. D. (1987). Immunocytochemical distribution in rat brain of putative peptides derived from thyrotropin-releasing hormone pro-hormone. *Endocrinology* 121: 1879-1891.
 29. Meng, F. and Tsou, K. (1988). Biochemical Mapping of Peptidyl-Glycine-Amidation Activity in the rat CNS. *J. Neurochem.* 50: 1352-1355.
 30. Suen, C-S. and Wilk, S. (1987). Regulation of a thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in GH₃ cells: Induction of pyroglutamyl peptidase I by 3, 5, 3' triiodo-thyronine. *Endocrinology* 121: 770-775.
 31. Suen, C-S. and Wilk, S. (1989). Sodium butyrate induces pyroglutamyl peptidase I and decreases thyrotropin-releasing hormone receptors in GH₃ cells. *Endocrinology* 124: 1654-1660.
 32. Suen, C-S. and Wilk, S. (1989). Regulation of thyrotropin releasing hormone degrading enzymes in rat brain and pituitary by L-3, 5, 3'-triiodothyronine. *J. Neurochem.* 52: 884-888.
 33. Wilk, S. (1986). Neuropeptide - specific peptidases: Does brain contain a specific TRH-degrading enzyme? *Life Sci.* 39: 1487-1492.
 34. O'Cuinn, G., O'Connor, B. and Elmore, M. (1990). Degradation of thyrotropin releasing hormone and luteinizing hormone releasing hormone by enzymes of brain tissue. *J. Neurochem.* 54: 1-13.

REFERENCIAS

- Abraham D., Pisano J.J. y Uderfriend S.J. (1964) Uptake of carnosine and homocarnosine by rat brain slices. *Arch. Biochem. Biophys.* 104: 160-165.
- Acker G.R., Molineaux C. y Orlowski M. (1987) Synaptosomal membrane bound form of endopeptidase 24.15 generates Leu-enkephalin from dynorphin₁₋₅, α and β neoendorphin and Met-enkephalin from Met-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸. *J. Neurochem.* 48: 284-292.
- Aizawa T. y Greer M.A. (1981) Delineation of the hypothalamic area controlling thyrotropin secretion in the rat. *Endocrinology* 109: 1731-1738.
- Albers R.W. y Brady R.D. (1959) The distribution of glutamate decarboxylase in the nervous system of the rhesus monkey. *J. Biol. Chem.* 234: 926-928.
- Alho H., Ferrarese C., Vicini S. y Vaccarino F. (1988) Subsets of GABAergic neurons in dissociated cell cultures of neonatal rat cerebral cortex show co-localization with specific modulator peptides. *Dev. Brain Res.* 39: 193-204.
- Almenoff J., Wilk S. y Orlowski M. (1981) Membrane-bound pituitary metalloendopeptidase: apparent identity to enkephalinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 206-214.
- Almenoff J. y Orlowski M. (1984) Biochemical and immunological properties of a membrane-bound brain metalloendopeptidase: Comparison with thermolysin-like kidney neutral metalloendopeptidase. *J. Neurochem.* 42: 151-157.
- Amara S.G., Jonas V., Rosenfeld M.G., Ong E.S. y Evans R.M. (1982) Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298: 240-.
- Andrews J.S. y Sahgal A. (1983) The effects of thyrotropin releasing hormone, metabolites and analogues on locomotor activity in rats. *Reg. Peptides* 7: 97-109.
- Appel N.M., Wessendorf M.W. y Elde R.P. (1987) Thyrotropin releasing hormone in spinal cord: coexistence with serotonin and with substance P in fibers and terminals apposing identified preganglionic sympathetic neurons. *Brain Res.* 415: 137-143.
- Arancibia S., Tapia-Arancibia L., Assenmacher I. y Astier H. (1983) Direct evidence of short term cold induced TRH release in the median eminence of anaesthetized rats. *Neuroendocrinology* 37: 225-228.
- Arimura A. y Schally A.V. (1976) Increase in basal and thyrotropin-releasing hormone-stimulated secretion of thyrotropin by passive immunization with antiserum to somatostatin. *Endocrinology* 98: 1069-1072.
- Back S.A. y Gorenstein C. (1989) Histochemical visualization of neutral endopeptidase-24.11 (enkephalinase) activity in rat brain: cellular localization and codistribution with enkephalins in the globus pallidus. *J. Neurosci.* 9: 4439-4455.

- Baker S.P., Summers C., Pitha J. y Raizada M. (1986) Characteristics of the β adrenoreceptors from neuronal and glial cells in primary cultures of rat brain. *J. Neurochem.* 47: 1318-1326.
- Banda R., Means E. y Samaha F.J. (1985) Trophic effects of thyrotropin-releasing hormone on murine ventral horn neurons in culture. *Neurology* 35 (Suppl. 1): 93.
- Banda R., Means E.D., Fitzgerald M. y Scherch H. (1987) Trophic effects of thyrotropin-releasing hormone on neuronal processes in culture. *Neurology* 37: 285-.
- Banker G.A. (1980) Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science* 209: 809-810.
- Barbin G., Manthorpe M. y Varon S. (1984) Purification of the chick eye ciliary neurotrophic factor. *J. Neurochem.* 43: 1468-1478.
- Barden Y.A., Edgard D. y Thoenen H. (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 5: 549-553.
- Barnea A., Ben Jonathan N. y Porter J.C. (1976) Characterization of hypothalamic subcellular particles containing luteinizing hormone releasing hormone and thyrotropin releasing hormone. *J. Neurochem.* 27: 477-484.
- Barnes K., Turner A.J. y Kenny A.J. (1988) Electronmicroscopic immunocytochemistry of pig brain shows that endopeptidase-24.11 is localized in neuronal membranes. *Neurosci. Lett.* 16: 61-65.
- Basiri R.M. y Utiger R.D. (1974) Thyrotropin releasing hormone in the hypothalamus of the rat. *Endocrinology* 94: 188-.
- Bauer K. (1976) Regulation of degradation of thyrotropin releasing hormone by thyroid hormones. *Nature* 591-593.
- Bauer K. (1983) Biochemical properties of TRH-inactivating enzymes. En: *Thyrotropin-Releasing Hormone* (E.C. Griffiths y G.W. Bennett, eds.) Raven Press, New York, pp. 103-107.
- Bauer K. (1987) Adenohypophyseal degradation of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormones. *Nature* 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. y Novak P. (1979) Characterisation of a thyroliberin degrading serum enzyme catalazyng the hidrolisis of thyroliberin at the pyroglutamyl-histidine bond. *Eur. J. Biochem.* 99: 239-246.
- Bauer K. y Kleinkauf H. (1980) Catabolism of thyroliberin by rat adenohypophyseal tissue extract. *Eur. J. Biochem.* 106: 107-117.

- Bauer K., Carmeliet P., Schulz M., Baes M y Denef C. (1990) Regulation and celular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohipophyseal cells. *Endocrinology* 127: 1224-1233.
- Benda P., De Vitry F., Picart R. y Tixier-Vidal (1975) Dissociated cell cultures from fetal mouse hypothalamus patterns of organization and ultraestructural features. *Exp. Brain Res.* 23: 29-47.
- Bennett G.W., Edwardson J.A., Holland D., Jeffcoate S.L. y White N. (1975) Release of immunoreactive LHRH and TRH from hypothalamic synaptosomes. *Nature* 257: 323-325.
- Bennett G.W. y Keeling M. (1981) H₂ mediated histamine induced release of thyrotropin releasing hormone from hypothalamic synaptosomes: a neuroendocrine role for histamine. *Br. J. Pharmacol.* 72: 151-152.
- Bier M.J., Goldfarb J., Orlowski M. y 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. y Smith A.I. (1983) Studies on the release, degradation and presynaptic actions of thyrotropin releasing hormone. En: *Thyrotropin Releasing Hormone* (E.C. Griffiths y G.W. Bennett, eds.), Raven Press, New York, pp. 241-250.
- Bissette G., Nemeroff C.B., Loosen P.T., Prange A.J. y Lipton M.A. (1976) Comparison of the analeptic potency of TRH, ACTH₄₋₁₀, LHRH and related peptides. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 5 (Suppl. 1): 135-138.
- Blalock J.E., Bost K.L. y Smith E.M. (1985a) Neuroendocrine peptides hormones and their receptors in the immune system. Production, processing and action. *J. Neuroimmunol.* 10:31-40.
- Blalock J.E., Harbour-McMenamin D. y Smith E.M. (1985b) Peptide hormones shared by the neuroendocrine and immunologic systems. *J. Immunol. Suppl.* 135: 858s-861s.
- Booher J. and Sensenbrenner M. (1972) Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* 2: 97-105.
- Boschi G., Launay N. y Rips R. (1980) Induction of wet-dog shakes by intracerebral "acid" TRH in rats. *Neurosci Lett.* 16: 209-212.
- Bowker R.M., Westlund K.N., Sullivan M.C., Wilber J.F. y Coulter J.D. (1983) Descending serotonergic, peptidergic and cholinergic pathways from the raphe nuclei: a multiple transmitter complex. *Brain Res.* 288: 33-48.
- Brabant G., Wickings E.J. y Nieschlag E. (1981) The TRH-metabolite histidyl-proline-diketopiperazine (DKP) inhibits prolactin secretion in male rhesus monkeys. *Acta Endocrinol. Copenh.* 98: 189-194.

- Bradbury A.F., Finnie M.D.A. y Smyth D.G. (1982) Mechanism of C-terminal amide formation by pituitary enzymes. *Nature* 298:686-688.
- Breese G.R., Cott J.M., Cooper B.R., Prange A.J., Lipton M.A. y Plotnikoff N.P. (1975) Effects of thyrotropin releasing hormone (TRH) on the actions of pentobarbital and other centrally acting drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 193: 11-22.
- Brooks B.R. (1989) A summary of the current position of TRH in ALS therapy. *Ann. NY Acad. Sci.* 553: 431-461.
- Browne P., Phelan J. y O'Cuinn G. (1981) TRH pyroglutamate aminopeptidase activity in two different subcellular fractions of guinea-pig brain. *Ir. J. Med. Sci.* 150: 348-349.
- Browne P. y O'Cuinn G. (1983a) An evaluation of the role of a pyroglutamyl peptidase, a post-proline cleaving enzyme and a post-proline dipeptidyl amino-peptidase, each purified from the soluble fraction of guinea-pig brain, in the degradation of thyroliberin in vitro. *Eur. J. Biochem.* 137: 73-87.
- Browne P. y O'Cuinn G. (1983b) The purification and characterisation of a proline dipeptidase from guinea-pig brain. *J. Biol. Chem.* 258: 6147-6154.
- Brownstein M.J., Palkovits M., Saavedra J.M., Bassiri R.M. y Utiger R.D. (1974) Thyrotropin releasing hormone in specific nuclei of rat brain. *Science* 185: 267-269.
- Brownstein M.J., Russell J.T. y Gainer H. (1980) Synthesis, transport and release of posterior pituitary hormones. *Science* 207: 373-378.
- Brownstein M.J., Eskay R.L. y Palkovits M. (1982) Thyrotropin-releasing hormone in the median eminence is in processes of paraventricular nucleus neurons. *Neuropeptides* 2: 197-201.
- Brunello N. y Cheney D.L. (1981) The septal-hippocampal cholinergic pathway: role in antagonism of pentobarbital anesthesia and regulation by various afferents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219: 489-495.
- Brunet N., Gourdji D., Tixier-Vidal, Pradelles P., Morgat J.L. y Fromageot P. (1974) Chemical evidence for associated TRF with subcellular fractions after incubation of intact rat prolactin cells (GH₃) with ³H-labelled TRF. *FEBS Lett.* 38: 129-133.
- Bulant M., Delfour A., Vaudry H. y Nicolas P. (1988) Processing of thyrotropin-releasing hormone prohormone (pro-TRH) generates pro-TRH-connecting peptides. *J. Biol. Chem.* 263: 17189-17196.
- Bulant M., Rousell J-P., Astier H., Nicolas P. y Vaudry H. (1990) Processing of thyrotropin releasing hormone prohormone (pro-TRH) generates a biologically active peptide, pre-proTRH-(160-169), which regulates TRH-induced thyrotropin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4439-4443.

Burgus R., Dunn T.F., Desiderio D. y Guillemin R. (1969) Structure moleculaire du facteur hypothalamique hypophysiotrope TRF ovine: mise en evidence par spectrometrie de masse de la sequence PGA-His-Pro-NH₂. C.R. Acad. Sci. [D] (Paris) 269: 1870-1873.

Burgus R. y Guillemin R. (1970) Chemistry of thyrotropin releasing factor. En: Hypophysiotropic hormones of the hypothalamus. (M. Meites, ed.) Williams y wilkins, Baltimore, pp. 227-241.

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

Busby W.H. Jr., Youngblood W.W. y Kizer S. (1982) Studies of substrate requirements, kinetic properties and competitive inhibitors of the enzyme catabolizing TRH in rat brain. Brain Res. 242: 261-270.

Busby W.H. Jr., Quackenbush G.E., Hunn J., Youngblood W.W. y Kizer J.S. (1987) An enzyme(s) that converts glutamyl-peptides into pyroglutamyl peptides. J. Biol. Chem. 262: 8532-8536.

Chan-Palay V., Johnson G. y Palay S.L. (1978) Serotonin and substance P coexist in neurons of the rat central nervous system. Proc. Nat. Acad. Sci. USA : 1582-1586.

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

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

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

Charli J.-L., Méndez M., Joseph-Bravo P. y Wilk S. (1987) Specific inhibitors of pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase do not change the in vitro release of TRH or its content in rodent brain. Neuropeptides 9: 373-378.

Charli J.-L., Méndez M., Vargas M.A., Cisneros M., Assai M., Joseph-Bravo P. y Wilk S. (1989) Pyroglutamyl peptidase II inhibition specifically increases recovery of TRH released from rat brain slices. Neuropeptides 14: 191-196.

Chen Y.F. y Ramirez V.D. (1981) Serotonin stimulates thyrotropin-releasing hormone release from superfused rat hipotalamii. Endocrinology 108: 2359-2366.

Chi M.C. y Lin M.T. (1984) Involvement of adrenergic receptor mechanisms within hypothalamus in the fever induced by amphetamine and thyrotropin-releasing hormone in the rat. J. Neurol. Transm. 58: 213-222.

- Childs G.V., Yang H.Y., Tobin R. B., Wilber J.F. y Kubek M. (1981) Effects of thyroectomy, propylthiouracil and thyroxine on pituitary content and immunocytochemical staining of thyrotropin (TSH) and thyrotropin releasing hormone (TRH). *J. Histochem. Cytochem.* 29:357-363.
- Choi D.W (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 7: 369-379.
- Choi D. W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623-634.
- Choi D.W., Maulucci-Gedde M. y Kriegstein A.R. (1987) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 7: 357-368.
- Cockle S.M. y 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. *Regul. Peptides* 14: 217-227.
- Cockle S.M. y 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. y Smyth D.G. (1988) Processing of thyrotropin-releasing hormone -related peptides in rabbit hypothalamus and prostate. *Biochem. Soc. Trans.* 1988-1989.
- Cockle S.M., Morrell J.M. y Smyth D.G. (1989) Thyrotropin-releasing hormone-related polypeptides in rabbit prostate and semen are different from those in rabbit hypothalamus. *J. Endocr.* 120: 31-36.
- Coogins P.J., Sahgal A., McDermott J.R., Snell C.R., Keith J. y Edwardson J.A. (1986) Histidylproline, a rapidly derived metabolite of thyrotropin releasing hormone, has behavioural activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24: 1229-1233.
- Coggins P.J., McDermott J.R., Snell C.R. y Gibson A.M. (1987a) Thyrotropin releasing hormone degradation by rat synaptosomal peptidases: production of the metabolite His-Pro. *Neuropeptides* 10: 147-156.
- Coggins P.J., McDermott J.R. y Snell C.R. (1987b) High affinity specific binding of the thyrotropin releasing hormone metabolite histidylproline to the rat brain membranes. *Neuropeptides* 9: 83-91.
- Collins F. (1978) Induction of neurite outgrowth by conditioned medium factor bound to the culture substratum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 5210-5213.
- Collu R. y Tachè Y. (1979) Anorctic and adipsic properties of TRH and TRH analogs in rats. *Neuroendocrinol. Lett.* 1: 7-10.
- Comb M., Seeburg P.H., Adelman J., Eiden L. y Herbert E. (1982) Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursors and its mRNA. *Nature*, 295: 663-666.

- Coyle J.T., Bird S.J., Evans R.H., Gulley R.L., Nadler J.V., Nicklas W.J. y Olney J.W. (1981) Excitatory amino acid neurotoxins: selectivity, specificity and mechanism of action. *Neurosci. Res. Prog. Bull.* 19: 331-427.
- Cummins C.J., Glover R.A. y Sellinger O.Z. (1982) Beta-alanine uptake is not a marker for brain astroglia in culture. *Brain Res.* 239: 299-302.
- Currie D.N. y Dutton G.R. (1980) [³H]GABA uptake as a marker for cell type in primary cultures of cerebellum and olfactory bulb. *Brain Res.* 199: 473-481.
- Curtis D.R. y Johnston G.A.R. (1974) Amino acids transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergeb. Physiologie* 69: 98-188.
- de Greff W.J., Klootwijk W., Karels B. y Visser T.J. (1985) Levels of dopamine and thyrotropin-releasing hormone in hypophysial stalk blood during an oestrogen-stimulated surge of prolactin in the ovariectomized rat. *J.Endocrinol.* 105:107-112.
- De Pierre J.W. y Karnovsky M.L. (1974) Ectoenzymes of the guinea-pig polymorphonuclear leukocyte II. Properties and suitability as markers for the plasma membrane. *J.Biol. Chem.* 249: 7121-7129.
- Delfs J., Robbins R., Conolly J.L., Dichter M. y Reichlin S. (1980) Somatostatin production by rat cerebral neurons in dissociated cell culture. *Nature* 283: 676-677.
- Delfs J.R., Zhu C-H y Dichter M.A. (1984a) Coexistence of acetylcholinesterase and somatostatin-immunoreactivity in neurons cultured from rat cerebrum. *Science* 223: 61-63.
- Devault A., Lazure C., Nault C. (1987) Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase-24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA. *EMBO J.* 6: 1327-1322.
- de Wied D. y Jolles (1982) Neuropeptides from proopiomelanocortin: behavioural, physiological and neurochemical effects. *Physiol. Rev.* 62: 977-1025.
- Denizau F., Dube D., Antakly T., Lemay A., Parent A., Pelletier G. y Labrie F. (1981) Attempts to demonstrate peptide localization and secretion in primary cultures of fetal hypothalamus. *Neuroendocrinology* 32: 96-102.
- Dichter M.A. (1978) Rat cortical neurons in cell culture, methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Res.* 149, 279-293.
- Diz D.I. y Jacobowitz D.M. (1984) Cardiovascular effects produced by injection of thyrotropin-releasing hormone in specific preoptic and hypothalamic nuclei in the rat. *Peptides* 5: 801-808.
- Doolittle R.F. y Armentrout R.W. (1968) Pyrrolidonyl peptidase: an enzyme for selective removal of pyrrolidonecarboxyl residues from polypeptides. *Biochemistry* 7: 516-521.
- Dresdner K., Baker L.A., Orlowski M. y Wilk S. (1982) Cellular distribution of prolyl endopeptidase and cation soluble neutral endopeptidase in rabbit brain. *J. Neurochem.* 38: 1150-1154.

- Dribin L.B. y Barret J.N. (1982) Two components of conditioned medium increase neuritic outgrowth from rat spinal cord explants. *J. Neurosci. Res.* 8: 271-280.
- Drummond R.J. y Phillips A.T. (1977) Intracellular amino acid content of neuronal, glial and non-neuronal cell cultures: the relationship to glutamic acid compartmentation. *J. Neurochem.* 29: 101-108.
- Drust E.G. y Connor J.D. (1983) Pharmacological analysis of shaking behavior induced by enkephalins, thyrotropin releasing hormone or serotonin in rats: evidence for different mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224: 148-154.
- Dumont J.E. y Lamy F. (1980) The regulation of thyroid cell metabolism function, growth and differentiation. En: *The thyroid Gland.* (M. de Visscher, ed.), Raven Press, New York, pp. 53-167.
- Dyess E. M, Segerson T.P., Liposits Z., Paull W.K., Kaplan M.M., Wu P., Jackson I.M.D. y 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.
- Eipper B.A., Mains R.E. y Glembotski C.C. (1983) Identification in pituitary tissue of a peptide alpha-amidation activity that acts on glycine-extended peptide and requires molecular oxygen and ascorbic acid. *Proc. Nat. Acad Sci. USA*, 80: 5144-5148.
- Eipper B.A., Myers A.C. y Mains R.E. (1985) Peptidyl-glycine α -amidation activity in tissues and serum of the adult rat. *Endocrinology* 116: 2497-2504.
- Eipper B.A. y Mains R.E. (1988) Peptide α -amidation. *Annu. Rev. Physiol.* 50: 333-344.
- Elmore M.A., Griffiths E.C., O'Connor B. y O'Cuinn G. (1990) Further characterization of the substrate specificity of a TRH hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Neuropeptides* 15: 31-36.
- Emerson C.H. y Wu C.F. (1987) Thyroid status influences rat serum but not rat brain TRH pyroglutamyl aminopeptidase activities. *Endocrinology* 120: 1215-1217.
- Engel W.K., Siddique T. y Nicoloff J.T. (1983) Effect on weakness and spasticity in amyotrophic lateral sclerosis of thyrotropin-releasing hormone. *Lancet* 2: 73-75.
- Enyeart J.J., Sheu S.S. y Hinkle P.M. (1987) Dihydropyridine modulators of voltage-sensitive Ca^{2+} channels specifically regulate prolactin production by GH_4C_1 pituitary tumor cells. *J. Biol. Chem.* 262: 3154-3159.
- Erwin B.G., Stoscheck C.M. y Florini J.R. (1981) A rapid fluorometric method for the estimation of DNA in cultured cells. *Anal. Biochem.* 110: 291-294.
- Faden A.I., Jacobs T.P. y Holaday J.W. (1981) Thyrotropin-releasing hormone improves neurological recovery after spinal trauma in cats. *N. Engl. J. Med.* 305: 1063-1067.

- Faden A.I., Jacobs T.P., Smith M. y Holaday J.W. (1983) Comparison of thyrotropin-releasing hormone (TRH), naloxone and dexamethasone treatments in experimental spinal injury. *Neurology* 33: 673-678.
- Faden A.I., Jacobs T.P. y Smith M.T. (1984) Thyrotropin-releasing hormone in experimental spinal injury: dose response and late treatment. *Neurology* 34: 1280-1284.
- Faden A.I., Vink R. y McIntosh T.K. (1989) Thyrotropin releasing hormone and central nervous system trauma. *Ann. NY Acad. Sci.* 553: 380-384.
- Faivre-Bauman A., Nemeskeri A., Tougard C. y Tixier-Vidal A. (1980) Immunological evidence for thyroliberin (TRH) neurons in primary cultures of fetal mouse brain cells. Ontogenetic aspects. *Brain Res.* 185: 289-304.
- Faivre-Bauman A., Rosenbaum E., Puymirat J., Grouselle D. y Tixier-Vidal A. (1981) Differentiation of fetal mouse hypothalamic cells in serum-free medium. *Dev. Neurosci.* 6: 118-129.
- Faivre-Bauman A., Puymirat J., Loudes C. y Tixier-Vidal A. (1984a) Differentiated mouse fetal hypothalamic cells in serum-free cultures. En: *Cell culture Methods for Molecular and Cell Biology*. Vol. 4, Methods for serum-free culture of neuronal and lymphoid Cells. (D.W. Barnes, S.A. Sirbasku y G.H. Sato, eds.) Alan R. Liss, New York, pp. 37-.
- Faivre-Bauman A., Puymirat J., Loudes C., Barret A. y Tixier-Vidal A. (1984b) Laminin promotes attachment and neurite elongation of fetal hypothalamic neurons grown in serum-free medium. *Neurosci. Lett.* 44, 83-89.
- Faivre-Bauman A., Loudes C., Barret A., Tixier-Vidal A. y 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.
- Faivre-Bauman A., Loudes C., Barret A., Patte C. y Tixier-Vidal A. (1988) Ontogenesis of peptidylglycyl α -amidation activity in the mouse hypothalamus in vivo and in serum-free medium cultures. Relation with thyroliberin (TRH) accumulation and release in vitro. *Develop. Brain Res.* 40: 261-267.
- Farquhar M.G. (1977) Secretion and crinophagy in prolactin cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 80: 37-94.
- Favaron M., Manev H., Alho H., Bertolino M., Ferret B., Guidotti A. and Costa E. (1988) Gangliosides prevent glutamate and kainate neurotoxicity in primary neuronal cultures of neonatal rat cerebellum and cortex. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85, 7351-7355.
- Feldstein J.B., Pacitti A.J., Summers C. y Raizada M.K. (1986) α_1 Adrenergic receptors in neuronal cultures from rat brain: increased expression in the spontaneously hypertensive rat. *J. Neurochem.* 47: 1190-1198.
- Fink G., Koch. Y. y Ben Aroya N. (1982) Release of thyrotropin-releasing hormone into hypophysial portal blood is high relative to other neuropeptides and may be related to prolactin secretion. *Brain Res.* 243: 186-189.

- Fink G., Koch. Y. y Ben Aroya N. (1983) TRH in hypophysial portal blood: characteristics of release and relationship to thyrotropin and prolactin secretion. En: Thyrotropin Releasing Hormone (E.C. Griffiths y G.W. Bennett, eds.) Raven Press, New York, pp. 127-143.
- Fischer W.H. y Spiess J. (1987) Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3628-3633.
- Fraser H.M. y 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: 64- .
- Fricker L.D. y Snyder S.H. (1983) Purification and characterization of enkephalin convertase, an enkephalin synthesizing carboxypeptidase E. J.Biol.Chem. 258: 10950-10955.
- Fricker L.D. (1988) Carboxypeptidase E. Annu. Rev. Physiol. 50: 309-321.
- Friedman T.C. y Wilk S. (1986) 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. 46: 1231-1239.
- Friedman T.C., Orłowski M. y Wilk S. (1984) Prolyl endopeptidase: inhibition in vivo by N-benzyloxycarbonyl-prolyl prolinal. J. Neurochem 42: 237-241.
- Friedman T.C., Kline T.B. y Wilk S. (1985) 5-Oxoprolinal: transition state aldehyde inhibitor of pyroglutamyl peptide hydrolase. Biochemistry 24: 3907-3913.
- Friedman T.C., Davies T.F. y Wilk S. (1986) Evidence for regulation of a thyrotropin-releasing hormone degrading pathway in GH₃ cells. Endocrinology 118: 562-566.
- Fukatsu R., Pocchiari M., Aoki T., Sotelo C.J., Gibbs Jr. C.J. y Gajdusek C. (1983) Ultrastructural studies on synaptic formation in dissociated fetal mouse brain cultures. Neurosci. Lett. 43: 127-130.
- Fulcher I.S., Matsas R., Turner A.J. y Kenny A.J. (1982) Kidney neutral endopeptidase and the hydrolysis of enkephalins by synaptic membranes show similar sensitivity to inhibitors. Biochem. J. 203: 519-522.
- Funatsu K., Teshima S. y Inanaga K. (1985) Various types of thyrotropin releasing hormone receptors in discrete brain regions and the pituitary of the rat. J. Neurochem. 45: 390-397.
- Furshpan E.J. y Potter D.D. (1989) Seizure-like activity and cellular damage in rat hippocampal neurons in cell culture. Neuron 3: 199-207.
- Gainer H., Russell J.T. y Loh Y.P (1985) The enzymology and intracellular organization of peptide precursor processing: the secretory vesicle hypothesis. Neuroendocrinology 40: 171-.

- Gamse R., Vaccaro D., Gamse G., Pace M.D., Fox T. y Leeman S. (1980) Release of immunoreactive somatostatin from hypothalamic cells in culture: inhibition by alpha-aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 5552-5556.
- Garat B., Miranda J., Charli J.-L. y Joseph-Bravo P. (1985) Presence of a membrane bound pyroglutamyl amino peptidase degrading thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Neuropeptides* 6: 27-40.
- George S.R. y van Loon G.R. (1981) Met-enkephalin uptake by a synaptosome-enriched fraction of rat striatum. *Neurosci. Lett.* 26: 297-300.
- Gershengorn M.C. (1978) *J. Clin Invest.* 62: 937-939.
- Gershengorn M.C. (1986) Mechanism of thyrotropin releasing hormone stimulation of pituitary hormone secretion. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 515-526.
- Gibbons J.M., Mitnick M. y Chifco V. (1975) *Am. J. Obstet. Gynecol.* 121: 127-131.
- Giros B., Gros C., Schwartz J.-C., Danvy D., Plaquevent J.-C., Duhamel L., Duhamel P., Vlaiculescu A., Costentin J. y Lecomte J.-M. (1987) Enantiomers of thiorphan and acetorphan: correlation between enkephalinase inhibition, protection of endogenous enkephalins and behavioral effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243: 666-673.
- Glembotski C.C., Manaker S., Winokur A. y 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: 739s-863s.
- Gorenstein C. y Snyder S.H. (1979) Two distinct enkephalinases: solubilization, partial purification, and separation from angiotensin converting enzyme. *Life Sci.* 25: 2065-2070.
- Gorenstein C. y Snyder S.H. (1980) Enkephalinases. *Proc. R. Soc. London Ser.B.* 210: 123-132.
- Gourdji D., Tixier-Vidal A., Morin A., Pradelles P., Morgat J.L., Fromageot P. y Krderlhué B. (1973) Binding of a tritiated thyrotropin-releasing factor to a prolactin secreting clonal cell line (GH₃). *Exp. Cell Res.* 82: 39-46.
- Gramsch C., Kleber G., Holtt V., Pasi A., Mehraein P. y Herz A. (1980) Proopiocortin fragments in human and rat brain: β endorfin and α -MSH are the predominant peptides. *Brain Res.* 194: 109-119.
- Grau-Wagemans M., Selak I., Lefevre P.P. y Moonen G. (1984) Cerebellar macroneurons in serum-free cultures: evidence for intrinsic neurotrophic and neurotoxic activities. *Dev. Brain. Res.* 15: 11-19.
- Greenberg R., Whalley C.E., Jourdikidian F., Mendelson I., Walter R., Nikolics K., Coy D.H., Schally A.V. y Kastin A.J. (1976) Peptides readily penetrate the blood-brain barrier: uptake by sinaptosomes is passive. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 5: 151-158.

- Greenamyre J.T., Olson J.M.M., Penney J.B. y Young A.B. (1985) Autoradiographic characterization of N-methyl-D-Aspartate-, quisqualate-, and kainate-sensitive glutamate binding sites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 233: 254-263.
- Griffiths E.C. y McDermott J.R. (1983) Enzymic inactivation of hypothalamic regulatory hormones. *Mol. Cell. Endocrinology.* 33: 1-25.
- Griffiths E.C. y McDermott J.R. (1984) Biotransformation of neuropeptides. *Neuroendocrinology* 39: 573-581.
- Griffiths E.C., McDermott J.R. y Smith A.I. (1982) Inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH) and (³-Me-His) TRH by brain peptidases studied by high-performance liquid chromatography. *Neurosci. Lett.* 28: 61-65.
- Griffiths E.C., McDermott J.R. y Visser T.J. (1983) Mechanisms of TRH inactivation: physiological significance of TRH degrading enzymes. En: *Thyrotropin-Releasing Hormone* (E.C. Griffiths y G.W. Bennett, eds.) Raven Press, New York, pp. 85-94.
- Griffiths E.C., Kelly A., Ashcroft A., Ward D.J. y Robson B. (1989) Comparative metabolism and conformation of TRH and its analogues. *Ann. NY Acad. Sci.* 553: 217-231.
- Grimm-Jorgensen Y. y McKelvy J.F. (1974) Biosynthesis of thyrotropin releasing factor by newt (*Triturus viridescens*) brain in vitro. Isolation and characterization of thyrotropin releasing factor. *J. Neurochem.* 23: 471-478.
- Grosvenor C.E. y 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.
- Grouselle D., Destombes J., Barret A., Pradelles P., Loudes C., Tixier-Vidal A. y Faivre-Bauman A. (1990) Evidence for high molecular weight immunoreactive thyrotropin-releasing hormone (TRH) precursors forms in the developing mouse hypothalamus. Simultaneous immunolocalization with TRH in cultured neurons. *Endocrinology* 126: 2454-2464.
- Guerra C. (1984) Cultivo de células nerviosas de ratón. Tesis Licenciatura, UACPyP del CCH, UNAM.
- Guillemin R. (1971) Biosynthesis of thyrotropin releasing hormone in vitro. Abstracts. Soc. Neurosci. 1st. Ann. Meeting.
- Hansson E. (1988) *Prog. Neurobiol.* 30: 369-
- Harkness D.H. y 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, pp. 349.

Hashimoto T., Fukuda N., Saji Y. y Nagawa (1983) Effects of TRH and an analog DN-1417 on the activities of single neurons in the nucleus accumbens, cerebral cortex and caudate-putamen of rats. *Kurume Med. J.* 30: S19-S27.

Hatten G.I., Perlmutter L.S., Salm A.K. y Lweedle C.D. (1984) Dynamic neuronal-glia interactions in hypothalamus and pituitary: implications for control of hormone synthesis and release. *Peptides* 5 Suppl.: 121-138.

Henderson C.E., Huchet M. y Changeux J.P. (1981) Neurite outgrowth from embryonic chicken spinal neurons is promoted by media conditioned by muscle cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 78: 2625-2629.

Henschen A., Zerbe G., Nadzan A.M., McKelvy J.F., Olson L. y Hoffer B. (1988) Thyrotropin releasing hormone augments growth of spinal cord trasplants in oculo. *Exp. Neurol.* 102: 125-129.

Hermann K., Raizada M.K., Summers C. y Phillips M.I. (1988) Immunocytochemical and biochemical characterization of angiotensin I and II in cultured neuronal and glial cells from rat brain. *Neuroendocrinology* 47: 125-132.

Hersh L.B. (1981) Immunological, physical and chemical evidence for the identity of brain and kidney post-proline cleaving enzyme. *J. Neurochem.* 37:172-178.

Hersh L.B. (1982) Degradation of enkephalinases: The search for an enkephalinase. *Mol. Cell. Biochem.* 47: 35-43.

Hertz L., Wu P.H. y Schousboe A. (1978) Evidence for net uptake of GABA into mouse astrocytes in primary cultures- its sodium dependence and potassium independence. *Neurochem. Res.* 3: 313-323.

Hertz L. (1979) Functional interactions between neurons and astrocytes. I. Turnover and metabolism of putative amino acids transmitters. *Prog. Neurobiol.* 13: 277-283.

Hinkle P.M. y Tashjian A.H. Jr. (1975) Thyrotropin releasing hormone regulates the number of its own receptors in the GH₃ strain of pituitary cells in culture. *Biochemistry* 14: 3845-

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

Hinkle P.M. (1989) Pituitary TRH receptors. *Ann. NY. Acad. Sci.* 553:

Hirooka Y., Hollander C.S., Suzuki S., Ferdinand P. y Luan S.I. (1978) Somatostatin inhibits release of thyrotropin releasing factor from organ cultures of rat hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4509-4514.

Hisano S., Ishizuka H., Nishiyama T., Tsuro Y., Kato S. y Kaikoku S. (1986) Immunoelectron microscopic observations of hypothalamic TRH-containing neurons in rats. *Exp. Brain Res.* 63: 495-504.

- Hokfelt T., Fuxe K., Johansson O., Jeffcoate S. y White N. (1975) Distribution of thyrotropin releasing hormone (TRH) in the central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Eur. J. Pharmacol.* 34: 389-392.
- Hokfelt T., Ljungdahl A., Steinbush H., Verhoftstad A., Nilsson G., Brodin E., Pernow B. y Goldstein M. (1978) Immunohistochemical evidence of substance P-like immunoreactivity in some 5-hydroxytryptamine-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* 3: 517-538.
- Hokfelt T., Johansson O., Ljungdahl A., Lundberg J. y Schultzberg M. (1980a) Peptidergic neurons. *Nature* 284: 515-521.
- Hokfelt T., Lunberg J.M., Schultzberg M., Johansson O., Ljungdahl A. y Rehfeld J. (1980b) Coexistence of peptides and putative transmitters in neurons. En: *Neural Peptides and Neuronal Communication*. (E. Costa y M. Trabucchi, eds.), Raven Press, New York, pp. 1-23.
- Hokfelt T., Tsuoro Y., Ulfhake B., Cullheim S., Arvidsson V., Foster G.A., Schultzberg M., Schalling M., Arborelius L., Freedman J., Post C. y Visser T. (1989) Distribution of TRH-like immunoreactivity with special reference to coexistence with other neuroactive compounds. *Ann. NY Acad. Sci.* 553: .
- Holaday J.W. (1984) Neuropeptides in shock and traumatic injury: sites and mechanisms of action. En: *Neuroendocrine Perspectives Vol. 3* (E.E. Muller y R.M. MacLeod, eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 161-199.
- Horita A., Carino M.A. y Chesnut R.M. (1976a) Influence of thyrotropin-releasing hormone (TRH) on drug-induced narcosis and hyperthermia in rabbits. *Psychopharmacology* 49: 57-62.
- Horita A., Carino M.A. y Smith J.R. (1976b) Effects of TRH on the CNS of the rabbit. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 5 (Suppl. 1): 111-116.
- Horita A., Carino M.A. y Lai H. (1986) Pharmacology of thyrotropin-releasing hormone. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26: 311-332.
- Horst W.D., Spirt N. y Bautz G. (1979) Influence of thyrotropin releasing hormone in the synaptic availability of catecholamines in brain. En: *Central Nervous System Effects of Hypothalamic Hormones and other Peptides*. (R. Collu y cols., eds.) Raven Press, New York, pp. 1431-1434.
- Horsthemke B., Hamprecht B. y Bauer K. (1983) Heterogeneous distribution of enkephalin degrading peptidases between neuronal and glial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115: 423-429.
- Horsthemke B., Schulz M. y Bauer K. (1984) Degradation of substance P by neurones and glial. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 728-733.
- Hooper N.M., Turner A.J. y Kenny A.J. (1985) The metabolism of neuropeptides. Neurokinin A (substance K) is a substrate for endopeptidase 24.11 but not peptidyl dipeptidase. *Biochem. J.* 231: 357-361.

Huettner J.E. y Baughman R.W. (1986) Primary culture of identified neurons from the visual cortex of post-natal rats. *J. Neurosci.* 6: 3044-3060.

Hyndman A.G. y Adler R. (1982) GABA uptake and release in purified neuronal and non-neuronal cultures from chick embryo retina. *Dev. Brain Res.* 3: 167-180.

Iriuchijima T., Rogers D. y Wilber J.F. (1986) TSH secretory regulation: new evidence that triiodothyronine (T_3) and thyroxine (T_4) can inhibit TRH secretion both in vivo and in vitro. En: *Frontiers in Thyroidology*) Plenum Medical, New York, vol. 1, pp. 23-.

Iriuchijima T. y Wilber (1987) Thyrotropin-releasing hormone and histidyl-proline diketopiperazine: stimulation of secretion from hypothalamic fragments in vitro by depolarizing agents. *Endocrinology* 120: 915-918.

Ishikawa K., Taniguchi Y., Inoue K., Kurosumi K. y Suzuki M. (1988) Immunocytochemical delineation of thyrotropic area: origin of thyrotropin-releasing hormone in the median eminence. *Neuroendocrinology* 47: 384-388.

Iversen L.L. y Kelly J.S. (1975) Uptake and metabolism of τ -aminobutyric acid by neurones and glial cells. *Biochem. Pharmacol.* 24: 933-941.

Jackson I.M.D. y Reichlin S. (1974) Thyrotropin-releasing hormone (TRH): distribution in hypothalamic and extrahypothalamic brain tissues of mammalian and submammalian chordates. *Endocrinology* 95: 854-862.

Jackson I.M.D. y Reichlin S. (1977a) Thyrotropin-releasing hormone abundance in the skin of the frog *Rana pipiens*. *Science* 198: 414-415.

Jackson I.M.D. y Reichlin S. (1977b) Brain thyrotropin-releasing hormone is independent of the hypothalamus. *Nature* 267: 853-854.

Jackson I.M.D. (1982) Thyrotropin Releasing Hormone. *N. Engl. J. Med.* 306: 145-.

Jackson I.M.D. (1983) Thyrotropin-releasing hormone (TRH): Distribution in mammalian species and its functional significance. En: *Thyrotropin-Releasing Hormone* (E.C. Griffiths y G.W. Bennett, eds.) Raven Press, New York, pp. 3-18.

Jackson I.M.D. y Lechan R.M. (1983) Thyrotropin releasing hormone En : *Brain Peptides* (D.T. Krieger, M.J. Brownstein y J.B. Martin, eds.) John Wiley and sons, New York, pp. 661-685.

Jackson I.M.D., Wu P. y Lechan R.M. (1985) Immunohistochemical localization in the rat brain of the precursor for thyrotropin-releasing hormone. *Science* 229: 1097-1099.

Jan Y.N., Jan L.Y. y Kuffler S.W. (1979) A peptide as a possible transmitter in sympathetic ganglia of the frog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1501-1505.

Jan L.Y. y Jan Y.N. (1981) Role of an LHRH-like peptide as a neurotransmitter in sympathetic ganglia of the frog. *Fed. Proc.* 40: 2560-2564.

Jeffcoate S.L., White N., Hokfelt T., Fuxe K. y Johansson O. (1976). Localization of thyrotropin-releasing hormone in the spinal cord of the rat by immunohistochemistry and radioimmunoassay. *J. Endocrinol.* 69: 9P-10P.

Jia M. Y Nelson P.G. (1987) Opiate peptide receptor types on cultured mouse spinal neurons. *Peptides* 8: 559-563.

Jirikowski G., Reisert I. y Pilgrim C. (1981) Neuropeptides in dissociated cultures of hypothalamus and septum: quantitation of immunoreactive neurons. *Neuroscience* 6: 1953-1960.

Johansson O., Hokfelt T., Pernow B., Jeffcoate S.L., White N., Steinbusch H.W.M., Verhofstad A.A.J., Emson P.C. y Spindel E. (1981) Immunohistochemical support for three putative transmitters in one 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.

Johansson O., Hokfelt T., Jeffcoate S.L., White N. y Spindel E. (1983) Light and electron microscopic immunohistochemical studies on TRH in the central nervous system of the rat. En: *Thyrotropin Releasing Hormone* (E. C. Griffiths y G.W. Bennett, eds.), Raven Press, New York, pp. 19-32.

Johnson W.A., Nathanson N.M. y Horita A. (1989) Receptor binding and characterization of TRH receptors. *Ann. NY Acad. Sci.* 553:

Jordan F.L. y Thomas W.E. (1987) Identification of somatostatin -containing neurons in primary cultures of rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* 77: 249-254.

Jordan D., Veisseire M., Borson-Chazot F. y Mornex R. (1986) In vitro effects of endogenous opiates peptides on thyrotropin function : inhibition of thyrotropin-releasing hormone release and absence of effect on thyrotropin release. *Neurosci. Lett.* 677: 289-294.

Joseph-Bravo P., Charli J.-L., Palacios J.M. y 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. y Horita A. (1981) Neuroanatomical dissociation of thyrotropin releasing hormone-induced shaking behaviour and thermogenic mechanisms. *Regul. Peptides* 1: 335-345.

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

Kaplan M.M., Taft J.A., Reichlin S. y Munsat T.L. (1986) Sustained rises in serum thyrotropin, thyroxine and triiodothyronine during long term, continuous thyrotropin-releasing hormone treatment in patients, with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63: 808-814.

- Kardon F.C., Winokur A. y Utiger R.D. (1977a) Thyrotropin-releasing hormone (TRH) in rat spinal cord. *Brain Res.* 122: 578-581.
- Kardon F., Marcus R.J., Winokur A. y Utiger (1977b) Thyrotropin releasing hormone content of rat brain and hypothalamus: results of endocrine and pharmacological treatments. *Endocrinology* 100: 1604-1609.
- Kawano H., Daikoku S. y Saito S. (1983) Location of thyrotropin-releasing hormone-like immunoreactivity in rat pancreas. *Endocrinology* 112: 951-955.
- Karnovsky M.L. (1986) Ectoenzymes: their modulation and similarity. En: *Cellular Biology of Ectoenzymes.* (R. Kreutzberg, eds.), Springer, Berlin, pp. 3-13.
- Kelly J.S. y Fabienne D. (1976) Differential labelling of glial cells and GABA-inhibitory interneurons and nerve terminals following the microinjection of [β - 3 H] alanine, [3 H]DABA and [3 H]GABA into single folia of the cerebellum. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 40: 93-106.
- Kerr M.A. y Kenny A.J. (1974) The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem. J.* 137: 477-488.
- Khaspekov L., Kida E., Victorov I. y Mossakowski M.J. (1989) Neurotoxic effect induced by quinolinic acid in dissociated cell culture of mouse hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 22: 150-157.
- Kim S.U (1980) Immunocytochemical demonstration of β lipotropin in mouse pituitary and neurons cultured in vitro. *Neurosci. Lett.* 19: 179-184.
- Kizer J.S., Palkovits M., Tappaz M., Kebebian J. y Brownstein M.J. (1976) Distribution of releasing factors, biogenic amines and related enzymes in the bovine median eminence. *Endocrinology* 98: 685-695.
- Kizer J.S., Busby W.H Jr., Cottle C. y Youngblood W.W. (1984) Glycine-directed peptide amidation: presence in rat brain of two enzymes that convert p-Glu-His-Pro-Gly-OH into pGlu-His-Pro-NH₂ (thyrotropin-releasing hormone). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3228-3232.
- Knigge K.M., Hoffman G., Scott D.E. y Sladek J.R. Jr. (1977) Identification of catecholamine and luteinizing hormone releasing hormone (LHRH)- containing neurons in primary cultures of dispersed cells of the basal hypothalamus. *Brain Res. Bull.* 120: 393-405.
- Knisatschek H. y Bauer K. (1986) Specific inhibition of post-proline cleaving enzyme by benzyloxycarbonyl-Gly-Pro-diazomethylketone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134: 888-894.
- Koh J. y Choi D.W. (1988) Cultured striatal neurons containing NADPH-diaphorase or acetylcholinesterase are selectively resistant to injury by NMDA receptor agonist. *Brain Res.* 446: 374-378.

- Koh J-Y., Peters S. y Choi D.W. (1986) Neurons containing NADPH-diaphorase are selectively resistant to quinolinate toxicity. *Science* 234: 73-76.
- Koida M. y Walter R. (1975) Post-proline cleaving enzyme. *J. Biol. Chem.* 251: 7593-7599.
- Koller K.L., Wolff R.S., Warden M.K. y Zoeller R.T. (1987) Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7329-7333.
- Konishi S., Tsunoo A., Yanahara N. y Otsuka M. (1980) Peptidergic excitatory and inhibitory sinapses in mammalian sympathetic ganglia: roles of substance P and enkephalins. *Biomed. Res.* 1: 528-536.
- Koshiya K., Kato T., Tanaka R. y 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., Hatanaka H. y Kato T. (1985) Localization of angiotensin-converting enzyme, prolyl endopeptidase and other peptidases in cultured neuronal or glial cells. *Neurochem. Int.* 7: 125-130.
- Koskinen L. y Bell A. (1984) Thyrotropin-releasing hormone (TRH) causes sympathetic activation and cerebral vasodilation in the rabbit. *Acta Physiol. Scand.* 122: 127-136.
- Kreider M.S., Winokur A. y Kreiger N.R. (1981a) The olfactory bulb is rich in TRH immunoreactivity. *Brain Res.* 217: 69-77.
- Kreider M.S., Winokur A. y Krieger N.R. (1981b) Pathways of TRH degradation in rat brain. *Neuropeptides* 1: 455-463.
- Kreider M.S., Knight P., Winokur A. y Krieger N.R. (1982) TRH concentration in rat olfactory bulb is undiminished by deafferentation. *Brain Res.* 241: 351-354.
- Kreider M.S., Engber T.M., Nilaver G., Zimmerman E.A. y Winokur A. (1985) Immunohistochemical localization of TRH in rat CNS: comparison with RIA studies. *Peptides* 6: 977-1000.
- Krieger D.T. (1983) Brain peptides: what, where, and why. *Science* 222:366-372.
- Krieger D.T., Brownstein M.J. y Martin J.B. (1983) Introduction. En : *Brain Peptides* (D.T. Krieger, M.J. Brownstein y J.B. Martin, eds.), John Wiley and sons, New York, pp. 1, 12.
- Krogsgaard-Larsen P. (1985) GABA agonists and uptake inhibitors. *Neurotransmissions* 1 (2).
- Kubek M.J., Lorincz M.A. y Wilber J.F. (1977) The identification of thyrotropin releasing hormone (TRH) in hypothalamic and extrahypothalamic loci of the human nervous system. *Brain Res.* 126: 196-200.
- Kuchler K., Richter K., Trnovsky J., Egger R. y Kreil G. (1990) Two precursors of thyrotropin-Releasing hormone from skin of *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 265: 11731-11733.

- Kurjan J. y Herskowitz I. (1982) Structure for a yeast pheromone gene (MF α): a putative α -factor precursor contains four tandem repeats of mature α -factor. *Cell* 30: 933-943.
- La Bella F.S., Geiger J.D. y Glavin G.B. (1985) Administered peptides inhibit the degradation of endogenous peptides. The dilemma of distinguishing direct from indirect effects. *Peptides* 6: 645-660.
- Labrie F., Barden N., Poirier G. y Delean A. (1972) Binding of thyrotropin releasing hormone to plasma membranes of bovine anterior pituitary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 283-287.
- LaHann T.R. y Horita A. (1982) Thyrotropin releasing hormone (TRH): Centrally mediated effects on gastrointestinal motor activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222: 66-70.
- Larsson O.M., Krogsgaard-Larsen P. y Schousboe A. (1980) High affinity uptake of (RS)-nipecotic acid in astrocytes cultured from mouse brain. Comparison with GABA transport. *J. Neurochem.* 34: 970-977.
- Larsson O.M. y Schousboe A. (1981) Comparison between (RS)-nipecotic acid and GABA transport in cultured astrocytes: coupling with two sodium ions. *Neurochem. Res.* 6: 257-266.
- Larsson O.M., Drejer J., Hertz L. y Schousboe A. (1983) Ion dependency of uptake and release of GABA and (RS)-nipecotic acid studied in cultured mouse brain cortex neurons. *J. Neurosci. Res.* 9: 291-302.
- Lasher R.S. (1974) The uptake of [3 H]GABA and differentiation of stellate neurons in culture of dissociated post-natal rat cerebellum. *Brain Res.* 41: 482-488.
- Laverrière J.N., Gourdj D., Picart R. y Tixier-Vidal A. (1981) Thyroliberin is rapidly transferred to the nucleus of GH₃ pituitary cells at both 4°C and 37°C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103: 835-840.
- Laverrière J.N., Morin A., Tixier-Vidal A y (1983) Inverse control of prolactin and growth hormone gene expression: Effect of thyroliberin on transcription and RNA stabilization. *EMBO J.* 2: 1493-1499.
- Laverrière J.N., Tixier-Vidal A., Buisson N. y (1988) Preferential role of calcium in the regulation of prolactin gene transcription by thyrotropin-releasing hormone in GH₃ pituitary cells. *Endocrinology* 122: 333-340.
- Laverrière J.N., Richard J.-L., Buisson N., Martial J.A., Tixier-Vidal A. y Gourdj D. (1989) Thyroliberin and dihydropyridines modulate prolactin gene expression through interacting pathways in GH₃ cells. *Neuroendocrinology.* 50: 693-701.
- Lechan R.M. y I.M.D. Jackson (1982) Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 111: 55-65.
- Lechan R.M. y Segerson T.P. (1989) Pro-TRH gene expression and precursor peptides in rat brain: observations by hybridization analysis and immunocytochemistry. *Ann. NY Acad. Sci.* 553:.

- Lechan R.M., Molitch M.E. y Jackson I.M.D. (1983) Distribution of immunoreactive human growth hormone-like material and thyrotropin releasing hormone in the rat central nervous system: evidence for their coexistence in the same neurons. *Endocrinology* 112: 877-884.
- Lechan R.M., Wu P.W., Jackson I.M.D., Wolf H., Cooperman S., Mandel G. y Goodman R. (1986a) Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science* 231: 159-161.
- Lechan R.M., Wu P. y Jackson I.M.D. (1986b) Immunolocalization of the thyrotropin-releasing hormone prohormone in the rat central nervous system. *Endocrinology* 119: 1210-1216.
- Lechan R.M., Wu P. y Jackson I.M.D. (1987) Immunocytochemical distribution in rat brain of putative peptides derived from thyrotropin-releasing prohormone. *Endocrinology* 121: 1879-1891.
- Lee S.L., Stewart K. y Goodman R.H. (1988) Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J. Biol. Chem.* 263: 16604-16609.
- Legendre P., Cooke I.M. y Vincent J.D. (1982) Regenerating responses of long duration recorded intracellularly in dispersed cells cultures of foetal mouse hypothalamus. *J. Neurophysiol.* 48: 1121-1141.
- Legendre P., Tixier-Vidal A., Brigant J.L. y Vincent J.D. (1988) Electrophysiology and ultrastructure of mouse hypothalamic neurons in culture: a correlative analysis during development. *Dev. Brain Res.* 43, 273-285.
- Leppaluoto J., Koivusalo F. y Kraama R. (1978) Thyrotropin-releasing factor. Distribution in neuronal and gastrointestinal tissues. *Acta Physiol. Scand.* 104: 175-179.
- Leppaluoto J., Vuoteenaho O., Koivusalo F. y Kraama R. (1981) Thyrotropin releasing factor: radioimmunoassay and distribution in biological fluids and tissues. *Med. Biol.* 59-85.
- Levi-Montalcini R. y Angeletti P.V. (1968) Nerve Growth factor. *Physiol Rev.* 48: 534-569.
- Levy G., Wilkin G.P., Ciotti M.T. y Johnstone S. (1983) Enrichment of differentiated, stellate astrocytes in cerebellar interneurons cultures as studied by GFAP immunofluorescence and autoradiographic uptake patterns with [³H]D-aspartate and [³H]GABA. *Dev. Brain Res.* 10: 227-241.
- Lewis B.M., Dieguez C., Lewis M.D. y Scanlon M.F. (1987a) Dopamine stimulates release of thyrotropin-releasing hormone from perfused intact rat hypothalamus via hypothalamic D₂-receptors. *J. Endocr.* 115: 419-424.
- Lewis M.D., Foord S.M. y Scanlon M.F. (1987b) The role of calcium and calmodulin in mediate the release of thyrotropin releasing hormone by cultured hypothalamic cells. *J. Endocr.* 115: 255-262.
- Liao N., Bulant M., Nicolas P., Vaudry H. y Pelletier G. (1988) Electron microscope immunocytochemical localization of thyrotropin-releasing hormone (TRH) prohormone in the rat hypothalamus. *Neuropeptides* 11: 107-.

- Lin M.T., Chandra A., Chern Y.F. y Tsay B.L. (1980) Effects of thyrotropin releasing hormone (TRH) on thermoregulation in the rat. *Experientia* 36: 1077-1078.
- Lin M.T., Chan H.K., Chen C.F. y Teh G.W. (1983) Involvement of both opiate and catecholaminergic receptors in the behavioral excitation provoked by thyrotropin-releasing hormone: comparison with amphetamines. *Neuropharmacology* 22: 463-469.
- Liposits Z., Paull W.K., Wu P., Jackson I.M.D. y Lechan R. (1990) Hypophysiotropic thyrotropin releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: ultrastructure, adrenergic innervation and putative transmitter action. In press
- Lipton S.A. (1986) Blockade of electrical activity promotes the death of mammalian retinal ganglion cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83: 9774-9778.
- Littlewood G.M., Iversen L.L. y Turner A.J. (1988) Neuropeptides and their peptidases: functional considerations. *Neurochem. Int.* 12: 383-389.
- Llorens-Cortes C., Gros C. y Schwartz J-C. (1986) Steady-state level and turnover rate of the tripeptide Tyr-Gly-Gly as indexes of striatal enkephalin release in vivo and their reduction during pentobarbital anesthesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6226-6230.
- Loh Y.P., Brownstein M.J. y Gainer H. (1984) Proteolysis in neuropeptide processing and other neuronal functions. *Ann. Rev. Neurosci.* 7: 189-222.
- Lolait S.J., Lim A.T., Dahl D., Khalid B.A., Toh B. H. y Funder J.W. (1983) Neonatal rat hypothalamus cell culture : neuron subpopulations secrete immunoreactive β -endorphin but not immunoreactive ACTH. *Neuroendocrinology* 37: 111-116.
- Loudes C., Faivre-Bauman A., Barret A., Grouselle D., Puymirat J. y Tixier-Vidal A. (1983) Release of immunoreactive TRH in serum-free cultures of mouse hypothalamic cells. *Dev. Brain Res.* 9: 231-234.
- Loudes C., Barret A., Tixier-Vidal A. y Faivre-Baumn A. (1989) Thyroliberin (TRH) biosynthesis by hypothalamic cells in serum-free medium cultures. *Neurochem. Int.* 14: 35-41.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lynch D.R. y Snyder S.H. (1986) Neuropeptides: Multiple molecular forms, metabolic pathways and receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 773-799.
- Maeda K. y Frohman L.A. (1980) Release of somatostatin and thyrotropin-releasing hormone from rat hypothalamic fragments in vitro. *Endocrinology* 106: 1837-1841.
- Mains R.E. y Patterson P.H. (1973) Primary cultures of dissociated sympathetic neurons. *J. Cell. Biol.* 59: 329-345.

- Malfroy B. y Schwartz J-C. (1982) Properties of "enkephalinase" from rat kidney: comparison of dipeptidyl-carboxipeptidase and endopeptidase activities. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 106: 276-285.
- Malfroy B., Swetrs J.P., Guyon A., Roques B.P. y Schwartz J-C. (1978) High affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature* 276: 523-526.
- Malfroy B., Schofield P.R., Kuang K.J., Seeburg P.H., Mason A.J., y Henzel W.J. (1987) Molecular cloning and amino acid sequence of rat enkephalinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144: 59-66.
- Malouin F. y Bedard P.J. (1982) Head turning induced by unilateral intracaudate thyrotropin-releasing hormone (TRH) injection in the cat. *Eur. J. Pharmacol.* 81: 559-567.
- Mangoura D. y Vernardakis A. (1988) GABAergic neurons in cultures derived from three-, six- or eight-day-old chick embryo: a biochemical and immunocytochemical study. *Dev. Brain Res.* 40: 25-35.
- Martin J.B., Boshans R. y Reichlin S. (1970) Feedback regulation of TSH secretion in rats with hypothyroid lesions. *Endocrinology* 87: 1032-1040.
- Martino E., Lernmark A., Seo H., Steiner D.F. y Refetoff S. (1978) High concentration of thyrotropin releasing hormone in pancreatic islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 4265-4267.
- Martino E., Seo H., Lernmark A. y Refetoff S. (1980) Ontogenic patterns of thyrotropin releasing hormone-like material in rat hypothalamus, pancreas and retina: selective effect of light deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4345-4348.
- Masserano J.M. y King C. (1981) TRH increases locomotor activity in rats after injection into hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.* 69: 217-219.
- Masuko S., Nakajima Y., Nakajima S. y Yamaguchi K. (1986) Noradrenergic neurons from the locus ceruleus in dissociated cell culture: culture methods, morphology and electrophysiology. *J. Neurosci.* 6: 3229-3241.
- Matsas R., Fulcher I.S., Kenny A.J. y Turner A.J. (1983) Substance P and [Leu] enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3111-3115.
- Matsas R., Rattray M., Kenny A.J. y Turner A.J. (1985) The metabolism of neuropeptides. Endopeptidase-24.11 in human synaptic membrane preparation hydrolyses substance P. *Biochem. J.* 228: 487-492.
- Matsas R., Kenny A.J. y Turner A.J. (1986) An immunohistochemical study of endopeptidase 24-11 (enkephalinase) in the pig nervous system. *Neuroscience* 18: 991-10012.
- Matsui T., Prasad C. y Peterkovsky A. (1979) Metabolism of thyrotropin releasing hormone in brain extracts. *J. Biol. Chem* 254: 2439-2445.

- May V., Wilber J.F., U'Prichard D.C. y Childs G.V. (1987) Persistence of immunoreactive TRH and GnRH in long term primary pituitary cultures. *Peptides* 8:543-558.
- McCarthy K.D. y de Vellis J. (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* 85: 890-902.
- McDonald J.K y Barret A.J. (1986) Mammalian proteases: a glossary and bibliography. Vol. 2 Exopeptidases, Academic Press.
- McKelvy J.F. (1974) Biochemical Neuroendocrinology I. Biosynthesis of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) by organ cultures of mammalian hypothalamus. *Brain Res.* 65: 489-502.
- McKelvy J.F. y Blumberg S. (1986) Inactivation and metabolism of neuropeptides. *Ann. Rev. Neurosci.* 4: 1104-1114.
- Méndez M., Joseph-Bravo P., Cisneros M., Vargas M.A. y Charli J.-L. (1987) Regional distribution of in vitro release of thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Peptides* 8: 291-298.
- Meng F. y Tsou K. (1988) Biochemical mapping of peptidyl-glycine α -amidation activity in the rat CNS. *J. Neurochem.* 50: 1352-1355.
- Merchenthaler I., Csernus V., Csontos C., Petrusz P. y Mess B. (1988) New data on the immunocytochemical localization of thyrotropin releasing hormone in the rat central nervous system. *Am. J. Anat.* 181: 359-.
- Merchenthaler I., Meeker M., Petrusz P. y Kizer J.S. (1989) Identification and immunocytochemical localization of a new thyrotropin-releasing hormone precursor in rat brain. *Endocrinology* 124: 1888-1897.
- Meshel C.K., Seil F.J. y Herndon M. (1987) Astrocytes play a role in regulation of synaptic density. *Brain Res.* 402: 139-145.
- Messer A. (1977) The maintenance and identification of mouse cerebellar granule cells in monolayer culture. *Brain Res.* 130: 1-12
- Mitnick M. y Reichlin S. (1971) Biosynthesis of TRH by rat hypothalamic tissue in vitro. *Science* 172: 1241-.
- Mitnick M. y Reichlin S. (1972) Enzymatic synthesis of thyrotropin-releasing hormone (TRH) by hypothalamic 'TRH synthetase'. *Endocrinology* 91: 1145-1153.
- Miyamoto M. y Nagawa Y. (1977) Mesolimbic involvement in the locomotor stimulant action of thyrotropin releasing hormone (TRH) in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 44: 143-153.
- Miyamoto M., Nagai Y., Narumi S., Saji Y. y Nagawa Y. (1982) TRH and its novel analog (DN-1417): antipentobarbital action and involvement of cholinergic mechanisms. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 17: 797-806.

- Miyamoto M., Narumi S., Nagai Y., Saji Y. y Nagawa Y. (1984) A TRH analog (DN-1417): motor stimulation with rearing related to catecholaminergic mechanisms in rats. *Neuropharmacology* 23: 61-72.
- Molineaux C.J., Lasdun A., Michaud C. y 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.
- Monaghan D.T., Holets V.R., Toy D.W. y Cotman C.W. (1982) Anatomical distribution of four pharmacologically distinct ³H-L-glutamate binding sites. *Nature* 306, 176-179.
- Mooz E.D. y Meister A. (1967) Tripeptide (glutathione) synthetase: Purification properties and mechanism of action. *Biochemistry* 6:1722-1734.
- Morel G. y Dubois P.M. (1982) Immunocytochemical evidence for gonadoliberin in rat anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology* 34: 197-206.
- Morel G., Gourdjji D., Brunet D., Tixier-Vidal A. y Dubois P.M. (1985a) Immunocytochemical evidence for in vivo internalization of thyroliberin into rat pituitary target cells. *Neuroendocrinology* 41: 312-320.
- Mori M. y 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., Prasad C. y Wilber J.F. (1982) Regional dissociation of histidyl-proline diketopiperazine (cyclo(His-Pro)) and thyrotropin releasing hormone (TRH) in the rat brain. *Brain Res.* 321: 451-453.
- Mori Y., Yamada M., Yamaguchi M., Suzuki M., Ohshima K., Kobayashi I. y Kobayashi S. (1986) Cyclo(His-Pro), a metabolite of thyrotropin-releasing hormone. Specific binding to rat liver membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134: 443-451.
- Mori M., Yamada M. y Kobayashi S. (1988) Role of the hypothalamic TRH in the regulation of its own receptors in rat anterior pituitaries. *Neuroendocrinology* 48: 153-159.
- Morley J.E. (1981) Neuroendocrine control of thyrotropin secretion. *Endocrinol. Rev.* 2: 396-
- Morley J.E., Garvin T.J., Pekary A.E. y Hershman J.M. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79: 314-318.
- Muller H.W., Beckh S. y Seifert W. (1984) Neurotrophic factor for central neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1248-1252.
- Murdoch G.H., Franco R., Evans R.M. y Rosenfeld M.G. (1983) Polypeptide hormone regulation of gene expression. Thyrotropin releasing hormone rapidly stimulates both transcription of the prolactin gene and the phosphorylation of a specific nuclear protein. *J. Biol. Chem.* 258: 15329-15335.
- Nakata Y., Kusaka Y., Yajima H. y Segawa T. (1981) Active uptake of substance P carboxy-terminal heptapeptide (5-11) into rat brain and spinal chord slices. *J. Neurochem.* 37: 1524-1534.

- Narumi S. y Nagawa Y. (1983) Modification of dopaminergic transmission by thyrotropin-releasing hormone. En: *Molecular Pharmacology of Neurotransmitter Receptors* (T.Segawa, H.I. Yamamura y K. Kuriyama, eds.) Raven Press, New York, pp. 185-197.
- Nawa H. y Patterson P. (1990) Separation and partial characterization of neuropeptide-inducing factors in heart cell conditioned medium. *Neuron* 4: 269-277.
- Nawa H. y Sah D.W.Y. (1990) Different biological activities in conditioned media control the expression of a variety of neuropeptides in cultured sympathetic neurons. *Neuron* 4: 279-287.
- Neale E.A., Oertel W.H., Bowers L.M. y Weise V.K. (1983) Glutamate decarboxylase immunoreactivity and ³H aminobutyric acid accumulation within the same neurons in dissociated cell cultures of cerebral cortex. *J. Neurosci.* 3: 376-380.
- Nicoll R.A. (1977) Excitatory action of TRH on spinal motor neurons. *Nature* 265: 242-243.
- Nishiyama T., Kawana H., Tsuoro Y., Maegawa M., Hisano S., Adachi T., Daikoku S. y Susuki M. (1985) Hypothalamic TRH-containing neurons involved in the hypothalamic-hypophysial-thyroid axis. Light microscopic immunohistochemistry. *Brain Res.* 345: 205-218.
- Noda M., Furutani Y., Takahashi H., Toyosato M., Hirose T., Inayama S., Nakanishi S. y Numa S. (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature* 295: 202-206.
- O'Connor B., y O'Cuinn 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. y O'Cuinn G. (1985) Purification of, and kinetic studies on a narrow specificity synaptosomal membrane pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Eur. J. Biochem.* 150: 47-52.
- O'Connor B. y O'Cuinn 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'Donohue T.L., Handelman G.E., Chaconas T., Miller R.L. y Jacobowitz D.M. (1981) Evidence that N-acetylation regulates the behavioural activity of α -MSH in the rat and human central nervous system. *Peptides* 2: 33-334.
- Ogawa N., Yamawaki Y., Kuroda H., Nukina I., Ota Z., Fujino M. y Yanaihara N. (1982) Characteristics of thyrotropin releasing hormone (TRH) receptors in the rat brain. *Peptides* 3: 669-677.
- Olney J.W. (1969) Brain lesion, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164: 719-721.

- Olney J.W. (1971) Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopy study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 30: 75-90.
- Olney J.W., Price M.T., Samson L. y Labruyere J. (1986) The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 65: 65-71.
- Orlowski M. y Wilk S. (1981) Purification and specificity of a membrane-bound metalloendopeptidase from bovine pituitaries. *Biochemistry* 20: 4942-4950.
- Orlowski M., Wilk E., Pearce S. y Wilk S. (1979) Purification and properties of a prolyl endopeptidase from rabbit serum. *J. Neurochem.* 33: 461-469.
- Oron Y., Straub R.E., Traktman P y Gershengorn M.C. (1987) Decreased TRH receptor mRNA activity precedes homologous downregulation: assay in oocytes. *Science* 238: 1406-1408.
- Ouafik L.H., Dutour A., Castanas E., Bouderesque F. y Oliver C. (1985) Evidence for a precursor for TRH in the neonatal rat pancreas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 664-669.
- Pacheco M.F., Woodward D.J., McKelvy J.F. y Griffin W.A. (1981) TRH in the rat cerebellum. II. Uptake by cerebellar slices. *Peptides* 2: 283-288.
- Padmanabhan V., Kesner J.S. y 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 rat central nervous system: Progress in 1981-1983. En : *Neuroendocrine Perspectives Vol. 3* (E.E. Muller and R.M. MacLeod, eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 1-69.
- Palkovits M., Eskay R.L. y Brownstein M.J. (1982) The course of thyrotropin-releasing hormone fibers to the median eminence in rats. *Endocrinology* 110: 1526-.
- Pares-Herbuté N., Bonet A., Peraldi S., Pin J-P, Gabrion J., Astier H. y Tapia-Arancibia L. (1988) The presence of non-neuronal cells influences somatostatin release from cultured cerebral cortical cells. *Dev. Brain Res.* 40: 89-97.
- Parker C.R., Neaves W.B., Barnea A. y Porter J.C. (1977) Studies on the uptake of [3 H]Thyrotropin-releasing hormone and its metabolites by synaptosome preparation of the rat brain. *Endocrinology* 101: 66-75.
- Patel A.J. (1981) Amino acids and the nervous system. En: *Amino Acid Analysis*. (J.M. Rattenberg, ed.) Ellis Horwood, Chirchester, pp. 237-256.
- Patel A.J. y Hunt A. (1985) Concentration of free amino acids in primary cultures of neurons and astrocytes. *J. Neurochem.* 44: 1816-1821.

- Patel A.J., Hunt A., Gordon R.D. y Balazs R. (1982) The activities in different neuronal cell types of certain enzymes associated with the metabolic compartmentation of glutamate. *Dev. Brain Res.* 4: 3-11.
- Patel A.J., Seaton P. y Hunt A. (1988) A novel way of removing quiescent astrocytes in culture of subcortical neurons grown in a chemically defined medium. *Dev. Brain Res.* 42, 283-288.
- Patel Y.C. y Reichlin S. (1978) Somatostatin in hypothalamus, extrahypothalamic brain and peripheral tissues of the rat. *Endocrinology* 102: 523-530.
- Patey G., De la Baume S.A., Schwartz J.C., Gros C., Roques B.P., Fournie-Zaluski M.C. y Soroca-Lucas E. (1981) Selective protection of methionine enkephalin released from brain slices by enkephalinase inhibition. *Science* 212: 1153-1155.
- Patterson P.H. y Chun L.L.Y. (1977) The induction of acetylcholine synthesis in primary cultures of dissociated rat sympathetic neurons. I. Effects of conditioned medium. *Dev. Biol.* 56: 263-280.
- Pearse A.G.E. (1969) *J.Histochem. Cytochem.* 17: 303-313.
- Pearse A.G.E. y Taylor T. (1979) Embriology of the diffuse neuroendocrine system and its relationship to common peptides. *Fed. Proc.* 38: 2288-2294.
- Pekary A.E., Sharp B., Briggs J., Carlson H.E. y Hershman J.M. (1983) High concentrations of pGluhis-Pro-NH₂ (thyrotropin-releasing hormone) occur in prostate. *Peptides* 4: 915-919.
- Pekary A.E., Bashin S., Smith V., Sugarawa M., Swerdloff R.S. y Hershman J.M. (1987) Thyroid hormone modulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and TRH-Gly levels in the male rat reproductive system. *J. Endocrinol.* 114: 271-277.
- Peterkofsky A., Battaini F., Koch Y., Takahara Y. y Dannies P. (1982) Histidyl-proline diketopiperazine: its biological role as a regulatory peptide. *Mol. Cell. Biochem.* 42: 45-62.
- Pierart M.E., Najdovski T., Appelboom T.E. y Deschodt-Lanckman M.M. (1988) Effect of human endopeptidase 24.11 ("enkephalinase") on IL-1- induced thymocyte proliferation assay. *J. Immunol.* 140: 3808-3811.
- Pinnock R.D., Woodruff G.N., Turnbull M.J. (1983) Actions of substance P, MIF, TRH and related peptides in the substantia nigra, caudate nucleus and nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 22: 687-696.
- Ponce G., Charli J.-L., Pasten J.A., Aceves C. y Joseph-Bravo P. (1988) Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 48: 211-213.
- Prasad C. (1985) Thyrotropin Releasing Hormone. En: *Handbook of Neurochemistry*. Vol. 8 (A. Lajtha, ed.), Plenum Press, New York, pp. 176-199.

- Prasad C. y Peterkofski A. (1976) Demonstration of pyroglutamyl-peptidase and amidase activities toward thyrotropin-releasing hormone in hamster hypothalamus extracts. *J. Biol. Chem.* 251: 3229-3234.
- Prasad C., Wilber J.F., Akerstrom V. y Banerji A. (1980) Cyclo (His-Pro): a selective inhibitor of rat prolactin secretion in vitro. *Life Sci.* 27: 1979-1983.
- Prasad C. (1989) Neurobiology of cyclo (His Pro) *Ann. NY Acad. Sci.* 553: 232-251.
- Puymirat J., Loudes C., Faivre-Bauman A. Tixier-Vidal A. y Bourre J.M. (1982) Expression of neuronal functions by mouse fetal hypothalamic cells cultured in hormonally defined medium. En: *Growth of cells in hormonally defined media. Cold Spring Harbor Conferences on cell proliferation Vol.9.*
- Raff M.C., Fields K.C., Hakomori S.L., Mirski R., Pruss R.M. y Winter J. (1979) Cell type specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture. *Brain Res.* 174: 283-308.
- Redondo J.L. (1983) Cultivo de células dispersas de hipotálamo de ratón. Tesis Licenciatura, Fac. de Ciencias, UNAM.
- Reichlin S., Martin J.B. y Jackson I.M.D. (1978) En: *The Endocrine Hypothalamus* (S.L. Jeffcoate y J.S.M. Hutchinson eds.) Academic Press, New York pp 230-.
- Reichlin S. (1983) Somatostatin. *New Engl. J. Med.* 309: 1495-1501.
- Reichlin S. (1986) Neuroendocrine control of TSH secretion. En: *The Thyroid* (S.H. Ingbar y L.E. Braverman, eds.) J.B. Lippincott Co., Philadelphia PA, Vol. 5. pp. 241-266.
- Richter K., Kawashima E., Egger R. y Kreil G. (1984) Biosynthesis of thyrotropin releasing hormone in the skin of *Xenopus laevis*: partial sequence of the precursor deduced from cloned cDNA. *EMBO J.* 3: 617-621.
- Robbins R.J., Sutton R.E. y Reichlin S. (1982) Sodium and calcium dependent somatostatin release from dissociated cerebral cortical cells in culture. *Endocrinology* 110: 496-
- Rondeel J.M.M., de Greef W.J., van der Schoot P., Karels B., Klootwijk y 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.
- Rose C., Camus A. y Schwartz J.C. (1989) Protection by serine peptidase inhibitors of endogenous cholecystinin released from brain slices. *Neuroscience* 29: 583-594.
- Rostjane W.H., Morgat J.L., Dussailant M., Rainbows T.C., Sarrieu A., Vial M. y Rosselin G. (1984) In vitro biochemical characterization and autoradiographic distribution of ³H thyrotropin releasing hormone binding sites in rat brain. *Neuroendocrinology* 39: 81-86.

Roth J. y Le Roth D. (1984) Intercellular communication : the evolution of scientific concepts of messengers molecules. En: *Medicine, Science and Society. Symposia celebrating the Harvard Medical School Bicentennial* (K.J. Isselbacher, ed.), John Wiley and sons, New York, pp. 425-427.

Roti E., Christianson D., Harris A.R.C., Braverman L.E. y Vagenakis A.G. (1978) " Short" loop feedback regulation of hypothalamic and brain thyrotropin-releasing hormone content in the rat and dwarf mouse. *Endocrinology* 103: 1662-.

Rupnow J.H., Hinkle J.E. y Dixon J.E. (1979a) A macromolecule wich gives rise to thyrotropin releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89: 721-.

Rupnow J.H., Taylor W.L. y Dixon J.E. (1979b) Purification and characterization of a thyrotropin-releasing hormone deamidase from rat brain. *Biochemistry* 18: 1206-1217.

Sah D.W. y Matsumoto S.G. (1987) Evidence for serotonin synthesis, uptake and release in dissociated rat sympathetic neurons in culture. *J. Neurosci.* 7: 391-399.

Salzman S.K. y Beckman A.L. (1981) Effects of thyrotropin releasing hormone on hypothalamic thermosensitive neurons of the rat. *Brain Res. Bull.* 7: 325-332.

Scanlon M.F., Robbins R.J., Bolaffi J.L., Jackson I.M.D. y Reichlin S. (1983) Characterization of somatostin and TRH release by rat hypothalamic and cerebral cortical neurons maintained on a capillary membrane perfusion system. *Neuroendocrinology* 37: 269-274.

Schaeffer J.M., Axelrod J. y Browstein M.J. (1977) Regional differences in dopamine mediated release of TRH-like material from synaptosomes. *Brain Res.* 138: 571-575.

Schally A.V., Bowers, C.Y., Redding T.W. y Barrett J.F. (1969) Isolation and properties of porcine thyrotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.* 244: 4077-4088.

Scharfmann R., Morgat J.-L. y Aratan-Spire S. (1989) Presence of a particulate thyrotropin-releasing hormone degrading pyroglutamate aminopeptidase activity in rat liver. *Neuroendocrinology* 49: 442-448.

Scharrer B. (1987) Neurosecretion: Beginnings and new directions in neuropeptide research.. *Ann. Rev. Neurosci.* 10: 1-17.

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

Schneider L.F. y Taghert P.H. (1986) Isolation and characterization of a *Drosophila* gene that encodes multiple neuropeptides related to Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFamide). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1993-1997.

Schousboe A. (1981) Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *Int. Rev. Neurobiol.* 22: 316-318.

Schousboe A. y Hertz L. (1983) Regulation of glutamatergic and GABAergic neuronal activity by astroglial cells. En: Dale's Principle and Communication between Neurons (N.N. Osborne, ed.) Pergamon Press, Oxford, pp. 113-141.

Schulz M. y Bauer K. (1988) Thyroid hormones regulate the extracellular degradation of thyrotropin releasing hormone (TRH) by GH₃ cells. *Neurochem. Int.* 43: 170-.

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

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

Segerson T., Hoefler H., Childers H., Wolfe H.J., Wu P., Jackson I.M.D. y Lechan R.M. (1987a) Localization of thyrotropin releasing hormone prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 121: 98-107.

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

Sensenbrenner M., Jaros G.G., Moonen G. y Meyer B.J. (1980) Effect of conditioned media on nerve cell differentiation. *Experientia* 36, 660-662.

Sevarino K., Wu P., Jackson I.M.D., Roos B.A., Mandel G. y Goodman R.H. (1988) Biosynthesis of thyrotropin-releasing hormone by a rat medullary thyroid carcinoma cell line. *J. Biol. Chem.* 263: 620-623.

Sevarino K., Goodman R.H., Spiess J., Jackson I.M.D. y Wu P. (1989) Thyrotropin-releasing hormone (TRH) precursor processing. *J. Biol. Chem.* 264: 21529-21535.

Shalaby I.A., Won L. y Wainer B. (1987) Biochemical and morphological studies on GABA neurons in reaggregate culture. *Brain Res.* 402: 68-77.

Shambaugh G.E., Kubek M. y Wilber J.F. (1978) *Clin. Res.* 26: 495A.

Sharif N.A. (1985) Diverse roles of thyrotropin-releasing hormone in brain, pituitary and spinal function. *Trends Pharmacol. Sci.* 6: 119-122.

Sharif N.A. (1989) Quantitative autoradiography of TRH receptors in discrete brain regions of different mammalian species. *Ann. NY. Acad. Sci.* 553:

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

- Sharp T., Bennett G.W., Marsden C.A. y Tullock I.F. (1984a) A comparison of the locomotor effects induced by centrally injected TRH and TRH analogues. *Reg. Peptides* 9:305-315.
- Sharp T., Tullock I.F., Bennett G.W., Marsden C.A., Metcalf G. y Detman P.W. (1984b) Analeptic effects of centrally injected TRH and analogues of TRH in the pentobarbitone-anesthetized rat. *Neuropharmacology* 23: 339-348.
- Shimada M. y Nakamura T. (1973) Time of neuron origin in mouse hypothalamic nuclei. *Exp. Neurol.* 41: 163-173.
- Shinoda H., Marini A.M., Cosi C. y Schwartz J.P. (1989) Brain regions and gene specificity of neuropeptide gene expression in cultured astrocytes. *Science* 245: 415-417.
- Shupnik M.A., Chin W.W., Habener J.F. y Ridgeway E.C. (1985) Transcriptional regulation of the thyrotropin beta-subunit genes by thyroid hormone. *J.Biol. Chem.* 260: 2900-2903.
- Simard M., Pekary A.E., Smith V.P. y 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. y Hershman J.M. (1989b) Thyroid hormone modulation of TRH precursor levels in rat hypothalamus, pituitary, thyroid and blood. *Peptides* 10: 145-155.
- Sisken B.F., Roberts E. y Goetz I. (1985) Triethanolamine, Tris, Hepes and cytosine arabinoside show neuritogenic activity in cultured chick embryo ganglia. *Exp. Neurol.* 88, 27-43.
- Skaper S.K., Das S. y Marshall F.D. (1973) Some properties of a homocarnosine-carnosine synthetase isolated from rat brain. *J. Neurochem.* 21: 1429-1445.
- Skidgel R.A. y Erdos E.G. (1985) Novel activity of angiotensin I converting enzyme: release of the NH₂ and COOH-terminal tripeptides from luteinising hormone releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1025-1029.
- Smith A.I., Keith A.B., Edwarson J.A., Biggins J.A. y McDermott J.R. (1982) Characterization of corticotropin-like immunoreactive peptides in rat brain using HPLC. *Neurosci. Lett.* 10: 133-138.
- Smyth D.G., Massey D.E., Zakarian S. y Finnie M.D.A. (1979) Endorphins are stored in biologically active and inactive forms: isolation of N- α -acetylpeptides. *Nature* 279: 252-254.
- Snodgrass S.R., White W.F., Biales B. y Dichter M. (1980) Biochemical correlates of GABA function in rat cortical neurons in culture. *Brain Res.* 190: 123-138.
- Sobue I., Takayanagi T., Nakanishi T., Tsubaki T. y Uono M. (1980) Controlled trial of thyrotropin-releasing hormone tartrate in ataxia of spinocerebellar degenerations. *J. Neurol. Sci.* 61: 325-248.

- Soeda S., Yamakawa N., Ohiyama M., Shimeno H. y Nagamatsu A. (1985) An inhibitor of proline endopeptidase : purification from rat brain and characterization. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 2445-2451.
- Soeda S., Yamakawa N., Shimeno H. y Nagamatsu A. (1986) Effects of polyamines on proline endopeptidase activity in rat brain. *J. Neurochem.* 46: 1304-1307.
- Sossin W.S., Fisher J.M. y Scheller R.H. (1989) Cellular and molecular biology of neuropeptide processing and packaging. *Neuron* 2: 1407-1417.
- Sotelo J., Gibbs Jr. C.J., Gajdusek D.C., Toh B.H. y Wurth M. (1980) Method for preparing cultures of central neurons: cytochemical and immunochemical studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 653-657.
- Spiegel K., Wong V. y Kessler J. (1990) Translational regulation of somatostatin in cultured sympathetic neurons. *Neuron* 4: 303-311.
- Staines W.A., Meister B., Melander T., Nagy J.I. y Hokfelt T. (1988) Three-color immunofluorescence histochemistry allowing triple labelling withing a single section. *J. Histochem. Cytochem.* 36: 145-151.
- Straub R.E., Frech G.C., Joho G.C. y Gershengorn M.C. (1990) Expression cloning of a cDNA encoding the mouse pituitary thyrotropin releasing hormone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9514-9518.
- Suen C-S. y Wilk S. (1987) Regulation of a thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in GH₃ cells: induction of pyroglutamyl peptidase I by 3,5,3'-triiodothyronine. *Endocrinology* 121: 770-775.
- Suen C-S. y Wilk S. (1989a) Sodium butyrate induces pyroglutamyl peptidase I and decreases thyrotropin-releasing hormone receptors in GH₃ cells. *Endocrinology* 124: 1654-1660
- Suen C-S. y Wilk S. (1989b) 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. y Wilk S. (1990) Rapid inactivation and phosphorylation of pyroglutamyl peptidase II in Y-79 retinoblastoma cells following exposure to phorbol ester. *Endocrinology*
- Suen C-S. y Wilk S. (1991) Inhibition of pyroglutamyl peptidase II synthesis by phorbol ester in the Y-79 retinoblastoma cell. *Endocrinology en prensa.*
- Supowit S.C., Potter E., Evans R.M. y Rosenfeld M.G. (1984) Polypeptide hormone regulation of gene transcription: specific 5'-genomic sequences are required for epidermal growth factor and phorbol ester regualtion of prolactin gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2975-2979.
- Susuki T., Kohno H., Sakurada T., Tadano T. y Kisara K. (1982) Intracranial injection of thyrotropin releasing hormone (TRH) supresses starvation-induced feeding and drinking in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 17: 249-253.

- Szabo M., Kovathana N., Gordon K. y Frohman A. (1978) Effect of passive immunization with an antiserum to thyrotropin (TSH-) releasing hormone on plasma TSH levels in thyroidectomized rats. *Endocrinology* 102: 799-.
- Tadashi Y., Foschl M., Orłowski R. y Walter R. (1978) Postproline cleaving enzyme and postproline dipeptidyl aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* 253: 3768-3776.
- Tapia R. y Meza-Ruiz G. (1976) Differences in some properties of newborn and adult brain glutamate decarboxylase. *Neurochem. Res.* 1: 133-140.
- Tapia-Arancibia L. y Astier (1983) Opiate inhibition of K⁺ induced release from superfused mediobasal hypothalami in rats. *Neuroendocrinology* 37: 166-168.
- Tashjian Jr. A.H., Barowsky N.J. y Jensen D.K. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- Tate S.S. (1981) Purification and properties of a bovine brain thyrotropin-releasing factor deamidase - a post proline cleaving enzyme of limited specificity. *Eur. J. Biochem.* 118: 17-23.
- Taussig R. y Scheller R.H. (1986) The *Aplysia* FMRFamide gene encodes sequences related to mammalian brain peptides. *DNA* 5: 453-461.
- Taylor W.L. y Dixon J.E. (1978) Characterization of a pyroglutamate aminopeptidase from rat serum that degrades thyrotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.* 253: 6934-6940.
- Taylor R.L. y Burt D.R. (1981) Properties of ³H-(3-MeHisTRH) binding to apparent TRH receptors in the sheep central nervous system. *Brain Res.* 218: 207-217.
- Taylor R.L. y Burt D.R. (1982) Species differences in the brain regional distribution of receptor binding for thyrotropin-releasing hormone. *J. Neurochem.* 38: 1649-1656.
- Tecoma E.S. y Choi D.W. (1989) GABAergic neocortical neurons are resistant to NMDA receptor-mediated injury. *Neurology* 39, 676-682.
- Tixier-Vidal A., Nemeskeri A. y Faivre-Bauman A. (1978) Primary cultures of dispersed fetal hypothalamic cells. Ultrastructural and functional features of differentiation. En: *Biologie Cellulaire des Processus Neurosécrétoires Hypothalamiques.* (J.D.Vincent and C.Kordon eds.) C.N.R.S. Paris.
- Tixier-Vidal A. y de Vitry F. (1979) Hypothalamic neurons in cell culture. *Int. Rev. Cytol.* 58, 291-331.
- Tonoue T. (1982) Stimulation by thyrotropin-releasing hormone of vagal outflow to the thyroid gland. *Regul. Peptides* 3: 29-39.
- Torres H., Charli J.-L., González-Noriega A., Vargas M.A. y Joseph-Bravo P. (1986) Subcellular distribution of the enzymes degrading thyrotropin releasing hormone and metabolites in rat brain. *Neurochem. Int.* 9 : 103-110.

- Torres-Aleman, Naftolin F. y Robbins R.J. (1990a) Trophic effects of insulin-like growth factor on primary hypothalamic cells in culture. *Neuroscience*.
- Torres-Aleman, Naftolin F. y Robbins R.J. (1990b) Trophic effects of basic fibroblast growth factor on fetal hypothalamic cell : interactions with insulin-like growth factor I. *Dev. Brain Res.* 52: 253-257.
- Tsuoro Y., Hokfelt T. y Visser T. (1987) Thyrotropin-releasing hormone (TRH)-immunoreactive cell groups in the rat central nervous system. *Exp. Brain Res.* 68: 213-217.
- Tsuoro Y., Hokfelt T. y Visser T.J. (1988a) Thyrotropin-releasing hormone (TRH)-immunoreactive neuron populations in the rat olfactory bulb. *Brain Res.* 447: 183-187.
- Tsuoro T., Ceccatelli S., Hokfelt T., Goldstein M. y Terenius (1988b) Coexistence of TRH with other neuroactive substances in the rat central nervous system. *J. Chem. Neuroanat.*
- Tuomisto J. y Mannisto P. (1985) Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones. *Pharmacol. Rev.* 37: 249-332.
- Turner A.J. (1988) Metabolism of neuropeptides. *ISI Atlas Pharmacol.* 1: 362-366.
- Udesmichi G., Cocci D., Panerai A.E., Gil-Ad I., Rossi G.L., Chiodini P.G., Liuzzi A. y Muller E.E. (1976) *Endocrinology* 98: 807-814.
- Ulfhake B., Arvidsson U., Cullheim S., Hokfelt T. y Visser T.J. (1987) Thyrotropin-releasing hormone (TRH)-immunoreactive boutons and nerve cell bodies in the dorsal horn of the cal L₇ spinal cord. *Neurosci. Lett.* 73: 3-8.
- Unsicker K., Reichter-Preibsh H., Schmidt R., Pettman B., Labourdette G. y Sensenbrenner M. (1987) Astroglial and fibroblast growth factors have neurotrophic functions for cultured peripheral and central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 5459-5463.
- Ushijima I., Yamada K., Noda Y. y Furukawa T. (1984) Progressive augmentation of locomotor activity in mice by long-term treatment with thyrotropin releasing hormone. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 270: 29-37.
- Vaccaro D.E., Leeman S.E. y Messer A. (1980) Primary cultures of dispersed hypothalamic cells from fetal rats: morphology electrical activity and peptide content. *J. Neurobiol.* 11: 417-424.
- Van den Bergh P., Wu P., Jackson I.M.D. y Lechan R.M. (1988) Neurons containing a N-terminal sequence of the TRH-prohormone (preproTRH₅₃₋₇₄) are present in a unique location of the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Brain Res.* 461: 53-63.
- Vargas M., Méndez M., Cisneros M., Joseph-Bravo P. y Charli J.L. (1987) Regional distribution of the membrane-bound pyroglutamate aminopeptidase degrading thyrotropin-releasing hormone in rat brain. *Neurosci. Lett.* 79: 311-314.

- Varon S., Skaper S.D., Barbin G., Selak I. y Manthorpe M. (1984) Low molecular weight agents support survival of cultured neurons from the central nervous system. *J. Neurosci.* 4: 654-658.
- Vilijn M H., Vaysse P. J., Zukin S y Kessler J.A. (1988) Expression of preproenkephalin mRNA by cultured astrocytes and neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 6551-6555.
- Vizi E.S. (1984) Conventional and non conventional release of transmitters/modulators. En: *Non-synaptic interactions between neurons: modulation of neurochemical transmission. Pharmacological and Clinical aspects.* John Wiley and sons, New York, pp. 17-42.
- von Euler U.S. y Gaddum J.H. (1931) *J. Physiol (London)* 72: 74-
- Voogt J.L., De Greef W.J., Visser T.J., De Koning J., Vreeburg J.T.M. y Weber R.F.A. (1987) In vivo release of dopamine, luteinizing hormone releasing hormone and thyrotropin releasing hormone in male rats bearing a prolactin-secreting tumour. *Neuroendocrinology* 46: 110-116.
- Walicke P., Cowan W.M., Ueno N., Baird A. y Guillemin R. (1986) Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3012-3016.
- Walicke P.A (1988) Basic and acidic fibroblast growth factors have trophic effects on neurons from multiple CNS regions. *J. Neurosci.* 8: 2618-2627.
- Walker A.G., Chapman J.A. y Rumsby M.G. (1985) Immunocytochemical demonstration of glial-neuronal interaction and myelogenesis in subcultures of rat brain cells. *J. Neuroimmunol.* 9: 159-177.
- Walter R., Shlank J.D., Glass J.D., Schwartz I.L. y Kereny T.D., (1971) Leucylglycinamide released from oxytocin by a human uterine enzyme. *Science* 173: 827-829.
- Warberg J. Eskay R.L., Barnea A., Reynolds R.C. y Porter J.C. (1977) Release of Luteinizing hormone releasing hormone and Thyrotropin releasing hormone from a synaptosome-enriched fraction of hypothalamic homogenates. *Endocrinology* 99: 1663-.
- Warberg J. (1982) Studies on the release mechanism for hypothalamic hormones. *Acta Endocrinol. Suppl.* 250: 7-48.
- Waskman G., Hamel E., Fournié-Zaluski M.C. y Roques B.P. (1986) Autoradiographic comparison of the distribution of the neutral endopeptidase 'enkephalinase' and of δ and μ opioid receptors in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1523-1527.
- Waskman G., Hamel E., Delay-Goyet P. y Roques B.P. (1986b) Neuronal localisation of the neutral endopeptidase 'enkephalinase' in rat brain revealed by lesions and autoradiography. *EMBO J.* 5: 3163-3166.
- Wei E., Sigel S., Loh H. y Way E.L. (1975) Thyrotropin-releasing hormone and shaking behaviour in rat. *Nature* 253: 739-740.

- Weyhenmeyer J., Raizada M.K., Phillips M.I. y Fellows R.E. (1980) Presence of angiotensin II in neuron cultured from fetal rat brain. *Neurosci. Lett.* 16: 41-46.
- White W.F., Hedlund M.T., Weber W.F., Rippel R.H., Johnson E.S. y Wilber J.F. (1974) *Endocrinology* 94: 1422-1426.
- White N., Jeffcoate S.L., Griffiths E.C. y Hooper K.C (1976) Effect of thyroid status on the thyrotropin releasing hormone degrading activity of rat serum. *J. Endocrinol.* 104: 1292-.
- Wilber J.F. y Siebel 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 contain a specific TRH-degrading enzyme? *Life Sci.* 39: 1487-1492.
- Wilk S. (1989) Inhibitors of TRH-degrading enzymes *Ann. NY Acad. Sci.* 553: 252-264.
- Wilk S. y Orlowski M. (1982) Determination of specificity of endopeptidases by combined high-performance liquid chromatography and amino acid analysis. *J. Chromatogr.* 249: 121-129.
- Wilk S. y Orlowski M. (1983) Inhibition of a rabbit brain prolyl endopeptidase by N-benzyloxycarbonyl-prolyl proline, a transition state aldehyde inhibitor. *J. Neurochem.* 41: 69-75.
- Wilk S. y Wilk E.K. (1989a) Rabbit brain pyroglutamate aminopeptidase II, a membrane-bound TRH degrading activity: purification and specificity studies. *Ann. NY Acad. Sci.* 553: 556-558.
- Wilk S. y Wilk E.K. (1989b) Pyroglutamyl peptidase II, a Thyrotropin releasing hormone degrading enzyme: purification and specificity studies of the rabbit brain enzyme. *Neurochem. Int.* 15: 81-89.
- Wilk S., Friedman T.C. y Kline T.B. (1985) Pyroglutamyl diazomethyl ketone: potent inhibitor of a mammalian pyroglutamyl peptide hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130: 662-668.
- Wilk S., Suen C-S y Wilk E. (1988) Occurrence of pyroglutamyl peptidase II a specific TRH degrading enzyme in rabbit retinal membranes and in human retinoblastoma cells. *Neuropeptides* 12: 43-50.
- Wilkinson M., Gibson C.J., Bressler B.H. y Inman D.R. (1974) Hypothalamic neurons in dissociated cell culture. *Brain Res.* 82: 129-138.
- Winokur A. y Utiger R.D. (1974) Thyrotropin-releasing hormone: regional distribution in rat brain. *Science* 185: 265-267.
- Winokur A., Davis R. y Utiger R.D. (1977) Subcellular distribution of thyrotropin releasing hormone (TRH) in rat brain and hypothalamus. *Brain Res.* 120: 423-434.

- Wood J.D. y Sidhu H.S. (1987) A comparative study and partial characterization of multi-uptake systems for τ -aminobutyric acid. *J. Neurochem.* 49: 1202-1208.
- Wood P.M. y Williams A.K. (1984) Oligodendrocyte proliferation and CNS myelination in cultures containing dissociated embryonic neuroglia and dorsal root ganglion neurons. *Dev. Brain Res.* 196:247-252.
- Wu P. (1989) Identification and characterization of TRH-precursor peptides. *Ann. NY Acad. Sci.* 553:
- Wu P. y Jackson I.M.D. (1988) Post-translational processing of thyrotropin-releasing hormone precursor in rat brain: identification of 3 novel peptides derived from proTRH. *Brain Res.* 456: 22-28.
- Wu P., Lechan R.M. y Jackson I.M.D. (1987) Identification and characterization of thyrotropin-releasing hormone precursor peptides in rat brain. *Endocrinology* 121: 108-115.
- Yamada K., Matsuki J., Ushijima I., Inoue T. y Furukawa T. (1983). Behavioral studies of shaking behavior induced by thyrotropin-releasing hormone and morphine withdrawal in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 262: 24-33.
- Yamada M. Rogers D. y Wilber J.F. (1989) Exogenous triiodothyronine lowers thyrotropin-releasing hormone concentrations in the specific hypothalamic nucleus (paraventricular) involved in thyrotropin regulation and also in posterior nucleus. *Neuroendocrinology* 50: 560-563.
- Yarbrough G.G. (1976) TRH potentiates excitatory actions of acetylcholine on cerebral cortical neurons. *Nature* 263: 523-524.
- Yarbrough G.G. y 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.
- Yavin E. y Yavin Z. (1974) Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine coated surface. *J. Cell. Biol.* 62: 540,546.
- Yavin Z. y Yavin E. (1977) Synaptogenesis and myelogenesis in dissociated cerebral cells from rat embryo on poly-lysine coated surfaces. *Exp. Brain Res.* 29:137-147.
- Yoshimoto T., Orłowski R.C. y Walter R. (1977) Postproline cleaving enzyme: identification as serine protease using active site specific inhibitors. *Biochemistry* 16: 2942-2948.
- Yoshimoto T., Fischl M., Orłowski R.G. y Walter R. (1978) Post-proline cleaving enzyme and post-proline dipeptidyl aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* 253: 3708-3716.
- Yu A.C.H. y Hertz L. (1982) Uptake of glutamate, GABA and glutamine into a predominantly GABAergic and a predominantly glutamatergic nerve cell population in culture. *J. Neurosci. Res.* 7: 23-35.

Yu A.C.H., Hertz E. y Hertz L. (1984) Alterations in uptake and release rates for GABA, glutamate and glutamine during biochemical maturation of highly purified cultures of cerebral cortical neurons, a GABAergic preparation. *J. Neurochem.* 42: 951-960.

Zoeller R.T., Wolff R.S. y Koller K. (1988) Thyroid hormone regulation of messenger ribonucleic acid encoding Thyrotropin (TSH) releasing hormone is independent of the pituitary gland and TSH. *Mol. Endocr.* 2: 248-252.

Zuzel K.A., Rose C. y Schwartz J.C. (1985) Assessment of the role of enkephalinase in cholecystokinin inactivation. *Neuroscience* 15: 149-158.