



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA PIROGLUTAMIL
PEPTIDASA II SOBRE LA SECRECIÓN DE PROLACTINA Y
TIROTROPINA EN LA ADENOHIPÓFISIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

IVÁN LAZCANO SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL ÁNGEL VARGAS SUAREZ

2007





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

LA PRESENTE TESIS FUE REALIZADA EN:

EL LABORATORIO DEL DR. JEAN LOUIS CHARLÍ CASALONGA, EN EL
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL DESARROLLO Y FISIOLÓGÍA
MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, DE LA UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CUERNAVACA, MORELOS.

BAJO LA DIRECCIÓN DEL

DR. MIGUEL ÁNGEL VARGAS SUÁREZ

ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO PARCIALMENTE POR EL
DONATIVO DEL CONACYT 4896-Q Y APOYADO POR DEL
DONATIVO DGAPA IN-227506

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente el apoyo técnico y asesoría de: el Dr. Miguel Ángel Vargas Suárez, el Dr. Jean Louis Charli Casalonga, el Q.F.B. Miguel Ángel Cisneros Ramírez brindados durante el manejo de equipo y materiales utilizados a lo largo de este trabajo.

Agradezco los apoyos técnicos y administrativos brindados por: la Sra. Cruz Elena Martell Lugo, Miguel Angel Olvera Rodriguez, José Manuel Villa herrera, y Sergio González Trujillo.

A mis sinodales: el M. en Ing. Eduardo Rodríguez Bustamante, el Dr. Jean Louis Charli Casalonga, la M. en C. Adriana Muñoz Martínez, la M. en C. Claudia Karina Torres Villavicencio y el Dr. Miguel Ángel Vargas Suárez, por sus valiosos comentarios y el tiempo que dedicaron para la revisión de este escrito.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Lazcano
Sánchez
Iván
85 02 05 43
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
300218978

2. Datos del asesor

Dr.
Miguel Ángel
Vargas
Suarez

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Jean Louis
Charli
Casalonga

4. Datos del sinodal 2

M. en C.
Adriana
Muñoz
Hernandez

5. Datos del sinodal 3

M. en Ing.
Eduardo
Rodríguez
Bustamante

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Claudia Karina
Torres
Villaseñor

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de la inhibición de la Piroglutamil peptidasa II sobre la secreción de prolactina y tirotropina en la adenohipófisis
80 p.
2007

Índice	páginas
Abreviaciones	V
Lista de Tablas y Figuras	VI
Resumen.....	1
1. Introducción	3
1.1 Comunicación celular en el sistema neuroendócrino	3
1.1.1 El hipotálamo y su función neuroendócrina	4
1.1.2 Estructura y función de la pituitaria	6
1.1.2.1 Subpoblaciones celulares de la adenohipófisis	7
1.2 El eje hipotalámico-adenohipofisiario-tiroideo	8
1.3 La hormona liberadora de tirotropina (TRH)	10
1.3.1 Distribución	11
1.3.2 Receptor del TRH	11
1.4 Inactivación del TRH	14
1.4.1 Degradación por enzimas citosólicas	15
1.4.2 Degradación por una enzima presente en suero	15
1.4.3 Degradación por la Piroglutamil peptidasa II (PPII)	16
1.4.3.1 Características bioquímicas de la PPII	16
2. Antecedentes	19
2.1 La PPII en la adenohipófisis	19
2.1.1 Regulación de la PPII en la adenohipófisis	19
2.2 Inhibición de la PPII	20
2.2.1 Inhibición por CPHNA	21
2.2.2 Inhibidores sintéticos de la PPII en donde se ha sustituido la histidina por asparagina en la molécula del TRH	22

2.2.3 Inhibición por HcPI	23
2.2.4 Inhibición por TRH-fosfínico	23
2.3 Datos preliminares sobre el efecto de la inhibición de la PPII de adenohipófisis.....	25
2.3.1 La inhibición de la expresión del ARNm de la PPII potencia la liberación de PRL pero no de TSH en cultivos primarios de adenohipófisis.	25
2.3.2 Datos preliminares sobre el empleo de inhibidores de la PPII	27
3. Hipótesis, justificación y objetivos	28
3.1 Hipótesis	28
3.2 Objetivos	28
3.2.1 General	28
3.2.2 Particulares	28
3.3 Justificación	28
4. Material y métodos	30
4.1 Material biológico.....	31
4.2 Obtención de membranas de cerebro y de adenohipófisis de rata	31
4.3 Cuantificación de la concentración de proteínas	31
4.4 Determinación de la actividad enzimática y de la actividad inhibitoria de la PPII	32
4.5 Purificación del inhibidor HcPI	34
4.5.1 Pasos iniciales de purificación	34
4.5.2 Cromatografía de intercambio aniónico	34
4.5.3 Cromatografía de exclusión molecular	35
4.5.4 Cromatografía líquida de alta presión en fase reversa	35
4.6 Cultivos primarios de adenohipófisis	36
4.6.1 Tratamiento de los cultivos primarios	37
4.7 Método de iodación de las hormonas PRL y TSH por el método de	

cloramina T	37
4.8 Determinación de la concentración de PRL y TSH mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA)	39
4.9 Tratamiento <i>in vivo</i> de ratas macho de la cepa wistar con el inhibidor pGlu-Asn-Pro-Tyr-Trp-Trp-7-amido-4-MCA (P.I.)	39
4.10 Análisis estadístico	39
5. Resultados	42
5.1 Purificación del HcPI a partir de un extracto crudo de <i>Hermodice carunculata</i>	42
5.1.1 Tratamiento con TCA	42
5.1.2 Cromatografía de intercambio aniónico	43
5.1.3 Cromatografía de exclusión molecular	44
5.1.4 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)	46
5.2 Efecto del HcPI sobre la liberación de PRL y TSH en cultivos primarios de adenohipófisis	48
5.3 Efecto del CPHNA sobre la actividad enzimática de la PPII de membranas de cerebro y sobre la liberación de PRL y TSH en cultivos primarios de adenohipófisis	52
5.4 Efecto del TRH-fosfínico sobre la liberación de PRL en cultivos primarios de adenohipófisis	56
5.5 Efectos <i>in vitro</i> del inhibidor pGlu-Asn-Pro-Tyr-Trp-Trp-amido-MCA (P.I.)	58
5.6 Efectos <i>in vivo</i> del P.I.	60
6. Discusión	62
7. Conclusiones y perspectivas	71

7.1 Conclusiones.....	71
7.2 Perspectivas.....	72
Bibliografía	73

Abreviaciones

aa: aminoácidos

ADN: Ácido desoxribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

CPHNA: N-(β -carboxi-2-feniletil)-N-imidazol benzil-histidil-beta-naftilamida

ISH: Hibridación *in situ*

TRH- β NA: pGlu-His-Pro β -Naftilamida

TRH-MCA: pGlu-His-Pro metilcoumarina

P.I: pGlu-Asn-Pro-Tyr-Trp-Trp-amido-MCA

PPII: Piroglutamil peptidasa II

PRL: Prolactina

RIA: Radioinmunoensayo

SNC: Sistema nervioso central

TRH: Hormona liberadora de tirotrópina

TRH-R1: Receptor tipo 1 para TRH

TRH-R2: Receptor tipo 2 para TRH

TSH: Tirotrópina

Lista de Tablas y Figuras

Tabla 1.- Hormonas sintetizadas en la adenohipófisis y las células responsables de sintetizarlas.

Tabla 2.- Protocolo del RIA para PRL.

Tabla 3.- Protocolo del RIA para TSH.

Figura 1.- Ubicación anatómica del hipotálamo en el cerebro del humano y el control que ejerce hacia la glándula pituitaria.

Figura 2.- Estructura general de los ejes hipotalámico-adenohipofisiario-órgano blanco.

Figura 3.- El eje hipotalámico-adenohipofisiario-tiroideo.

Figura 4.- La hormona liberadora de tirotrópina.

Figura 5.- Representación esquemática del receptor TRH-R1 de rata.

Figura 6. Transducción de señales iniciada mediante la unión del TRH a su receptor específico TRH-R1.

Figura 7.- Topografía de la PPII deducida a partir del ADNc del gen de la PPII.

Figura 8.- Estructura del CPHNA, el primer inhibidor sintético de la PPII.

Figura 9.- Estructura del TRH (izquierda) y del TRH-fosfínico (derecha), un inhibidor sintético de la PPII.

Figura 10.- Hipótesis sobre el efecto de la inhibición de la PPII en la respuesta fisiológica de los lactótrofos y de los tirótrofos.

Figura 11.- Efecto del HcPI y el TRH sobre la liberación de prolactina en cultivos primarios de adenohipófisis.

Figura 12.- Diagrama de flujo que representa la estrategia experimental empleada en este trabajo.

Figura 13.- Esquema que representa el ensayo acoplado de actividad enzimática de la PPII utilizado en los experimentos.

Figura 14.- Efecto del extracto inicial del gusano de fuego sobre la actividad enzimática de PPII de membranas de cerebro de rata.

Figura 15.- Cromatografía de intercambio aniónico del extracto del gusano de fuego.

Figura 16.- Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de PPII en las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico.

Figura 17.- Cromatografía de exclusión molecular de las fracciones que contenían actividad inhibitoria en la cromatografía de intercambio aniónico.

Figura 18.- Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de PPII en las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular.

- Figura 19.-** Cromatografía de fase reversa de las fracciones obtenidas por cromatografía en gel.
- Figura 20.-** Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de PPII de las fracciones obtenidas por cromatografía de fase reversa.
- Figura 21.-** Efecto del HcPI purificado mediante cromatografía en fase reversa sobre la actividad enzimática de PPII.
- Figura 22.-** Efecto del HcPI en presencia de TRH, sobre la liberación de PRL en cultivos primarios de adenohipófisis.
- Figura 23.-** Efecto del HcPI en presencia de TRH, sobre la liberación de TSH en cultivos primarios de adenohipófisis.
- Figura 24.-** Efecto del CPHNA sobre la actividad enzimática de la PPII de membranas de cerebro de rata.
- Figura 25.** Cinética del efecto de la inoculación de CPHNA 10^{-4} M en el medio de cultivo sobre la liberación de TSH en cultivos primarios de adenohipófisis, en presencia de TRH.
- Figura 26.-** Efecto de la inoculación de CPHNA en el medio de cultivo sobre la liberación de PRL en cultivos primarios de adenohipófisis, en presencia de TRH.
- Figura 27.-** Efecto de la inoculación de CPHNA en el medio de cultivo sobre la liberación de TSH en cultivos primarios de adenohipófisis, en presencia de TRH.
- Figura 28.-** Efecto de la inoculación de TRH- fosfínico en el medio de cultivo sobre la liberación de PRL en cultivos primarios de adenohipófisis, en presencia de TRH.
- Figura 29.-** Efecto de la inoculación de P.I. en el medio de cultivo sobre la liberación de PRL en cultivos primarios de adenohipófisis, en presencia de TRH.
- Figura 30.-** Efecto de la inyección intraperitoneal del TRH y el P.I. sobre la actividad específica de PPII de adenohipófisis en ratas.
- Figura 31.-** Efecto de la inyección intraperitoneal del TRH y el P.I sobre la actividad enzimática de la tiro liberinasa de suero de rata.
- Figura 32.-** Efecto de la inyección intraperitoneal del TRH y el P.I. sobre la liberación de TSH en ratas.

Resumen

Los péptidos son una amplia familia de moléculas activas a todo lo largo de la escala filogenética, participan en el intercambio de información entre las células de los organismos multicelulares. La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) es un tripéptido de secuencia pglu-his-proNH₂ involucrado en la comunicación intercelular en animales. En los mamíferos, el TRH es sintetizado en varios núcleos cerebrales incluyendo neuronas del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo de donde es transportado a la eminencia media para liberarse al sistema portal que irriga a la adenohipófisis. En la adenohipófisis, actúa a través de su receptor membranal TRH-R1 ubicado en los lactótrofos y los tirotrofos, estimulando la síntesis y liberación de la prolactina (PRL) y la tirotrópina (TSH) respectivamente. Las acciones del TRH son de corta duración, en particular, a su rápida hidrólisis en el medio extracelular. La piroglutamil peptidasa II (PPII) es una enzima de especificidad estrecha (a diferencia de muchas otras peptidasas), cuyo blanco preferente es la TRH. La PPII hidroliza el enlace peptídico piroglutamil-histidil del TRH, generando productos inactivos. En nuestro grupo de trabajo, hemos obtenido datos que sugieren que la PPII es una enzima fundamental para la inactivación del TRH en el medio extracelular. Entre las evidencias críticas están: la estrecha especificidad de la enzima, y la topografía de esta enzima transmembranal, con su sitio activo en el medio extracelular. En la adenohipófisis, la PPII se encuentra preferentemente en los lactótrofos. Mediante la inhibición de la traducción del ARNm de la PPII de adenohipófisis con oligodeoxinucleótidos antisentido se potencia la liberación de PRL en respuesta al TRH, pero de manera sorprendente, la liberación de TSH no se ve afectada. Con el propósito de confirmar estos resultados mediante otra metodología y seguir estudiando el papel de la PPII en la regulación del TRH extracelular, se evaluó el efecto de algunos inhibidores de la actividad enzimática de la PPII sobre la liberación de PRL y TSH en cultivos primarios de adenohipófisis en condición basal y estimulada con TRH. Los resultados más contundentes los obtuvimos empleando un inhibidor natural altamente específico de la PPII llamado HcPI, este inhibidor potenció la liberación de PRL en respuesta a TRH, sin afectar la liberación de TSH. Esto confirma los resultados obtenidos mediante la supresión de la traducción del ARNm de la PPII, y confirma el papel de la PPII en la regulación de la señal del TRH extracelular en los sitios cercanos a los lactótrofos. Además, los resultados

obtenidos con el inhibidor HcPI respecto al resto de los inhibidores de la PPII empleados en este trabajo (CPHNA, TRH-fosfínico y P.I.), lo hacen el inhibidor candidato para seguir estudiando el papel de la PPII *in vivo* en el sistema neuroendócrino y en el sistema nervioso central.

Capítulo 1. Introducción

1.1 Comunicación celular en el sistema neuroendócrino

Las células de los organismos multicelulares se comunican a través de la liberación de moléculas (mensajeros químicos) que pueden influenciar la actividad y función de las células que reciben la señal. Tales mecanismos de señalización se llevan a cabo mediante uniones entre células vecinas que comunican su citoplasma directamente vía canales proteicos especializados (uniones gap), mediante señales químicas (hormonas) liberadas hacia el espacio extracelular que afectan células blanco distanciadas del sitio de origen (comunicación endocrina), mediante la liberación de mensajeros químicos que afectan únicamente a células ubicadas cerca del sitio de liberación de las moléculas (comunicación parácrina), y mediante la liberación de señales que afectan a las mismas células que liberan la señal (comunicación autócrina). Similar a la comunicación parácrina, existe un mecanismo de comunicación especializado denominado comunicación nerviosa ó neurotransmisión, que se realiza entre las células del sistema nervioso central (SNC) de los animales. A diferencia de la comunicación parácrina, una multitud de mensajeros químicos llamados neurotransmisores son los responsables de comunicar a las neuronas a nivel de contactos especializados célula-célula; dichos contactos se denominan sinapsis.

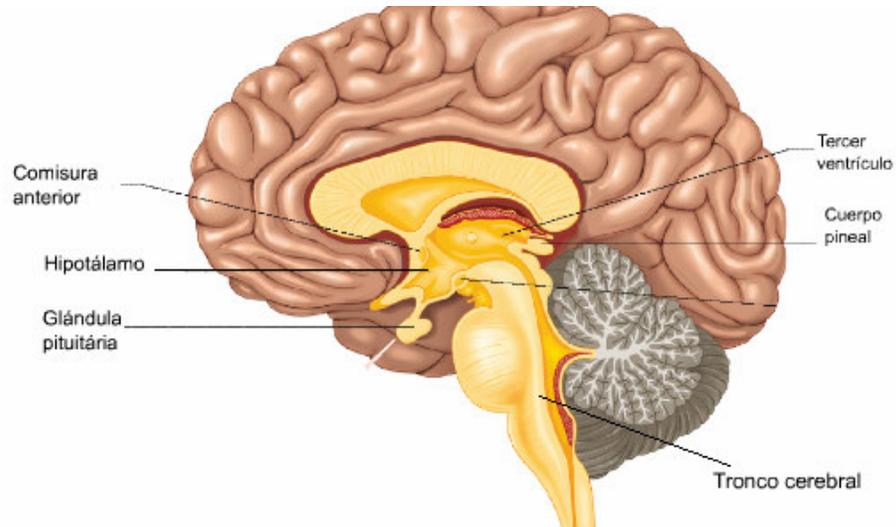
Como lo dice su nombre, el sistema neuroendócrino es el sistema de comunicación celular de los vertebrados que comprende tanto comunicación nerviosa como endócrina; esta última comprende la secreción de hormonas (secretadas a partir de células especializadas localizadas en glándulas) que son transportadas para señalar células blanco localizadas a distancias lejanas del sitio de liberación, siempre y cuando las células expresen los receptores celulares que son los encargados de reconocer a una determinada hormona. Además de las glándulas endócrinas, muchas neuronas del sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico producen hormonas que son liberadas hacia el espacio extracelular, o bien hacia el torrente sanguíneo (Thornyke y Georges, 1988). En muchos casos, las hormonas sintetizadas por las neuronas son las mismas que las producidas por las glándulas endócrinas no neuronales. Por ejemplo, el glucagón, la gastrina, la colecistoquinina y algunas otras moléculas, las podemos encontrar en el sistema nervioso

así como en las células endócrinas del intestino. Las neuronas del sistema nervioso que producen hormonas, las terminales nerviosas que liberan los mensajeros químicos al espacio extracelular y la glándula que recibe las señales provenientes de las neuronas conforman el sistema neuroendócrino. En los vertebrados, el sistema neuroendócrino incluye el hipotálamo, el sistema portal y la pituitaria, así como neuronas periféricas que actúan sobre células endócrinas en la médula adrenal, la pared intestinal y el páncreas. Este sistema es el centro regulador de muchas funciones fisiológicas como el crecimiento, el metabolismo, la respuesta al estrés, la reproducción, la osmoregulación y los ciclos circadianos, funciones críticas para poder conservar la homeostasis de los mamíferos (Squire et al., 2003).

1.1.1 El hipotálamo y su función neuroendócrina

El hipotálamo es una región del cerebro que se localiza sobre la parte superior del tronco cerebral, entre la comisura anterior y debajo del tálamo (figura 1a). Si bien es cierto que el hipotálamo es el centro de control de varias funciones nerviosas, entre las que notablemente encontramos la regulación de la temperatura corporal y el consumo del alimento y del agua, éste también participa en el control del sistema endócrino. El control es ejercido hacia la pituitaria posterior o neurohipófisis vía proyecciones nerviosas directas y hacia la pituitaria anterior o adenohipófisis mediante un sistema especializado de vasos sanguíneos llamado sistema portal (Schmidt-Nielsen, 1986) (figura 1b).

A)



B)

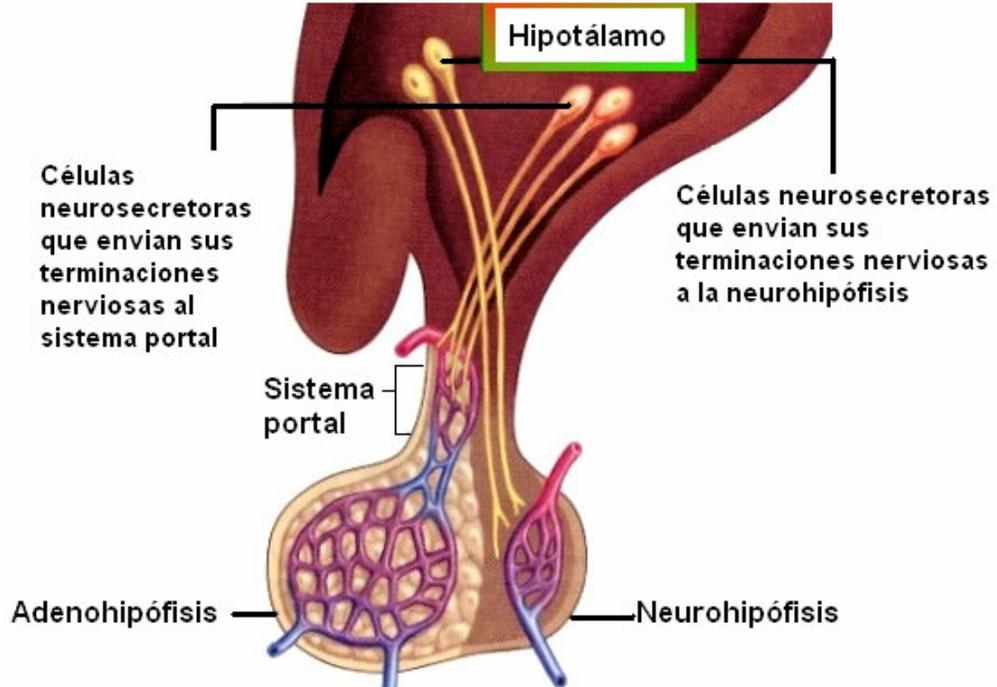


Figura 1.- Ubicación anatómica del hipotálamo en el cerebro del humano y el control que ejerce hacia la glándula pituitaria. A) El hipotálamo se encuentra en la parte superior del tronco cerebral, debajo de la comisura anterior y el tálamo. **B)** El hipotálamo controla a la adenohipófisis mediante un sistema especializado de vasos sanguíneos denominado sistema portal; por otro lado, controla a la neurohipófisis mediante proyecciones nerviosas directas.

1.1.2 Estructura y función de la pituitaria

La glándula pituitaria (también llamada hipófisis) se encuentra justo debajo del hipotálamo, tiene forma de pera y está unida a la base del cerebro. Las hormonas que secreta esta glándula son transportadas por el torrente sanguíneo para actuar sobre receptores específicos en sus células blanco y de esta manera controlar el funcionamiento de glándulas endocrinas del organismo (Schally, 1978) (figura 2). Esta glándula puede dividirse anatómicamente en dos regiones, la neurohipófisis ó “lóbulo posterior” y la adenohipófisis ó “lóbulo anterior” (figura 1b). La neurohipófisis por su parte, deriva de la base del cerebro y está compuesta por las terminaciones nerviosas provenientes del hipotálamo. La neurohipófisis no sintetiza ninguna hormona, sin embargo almacena dos hormonas que son producidas en el hipotálamo, la vasopresina y la oxitocina. La vasopresina liberada ejerce efecto en los riñones para regular el volumen y la concentración de sal en los vasos sanguíneos. La oxitocina liberada causa la contracción del músculo liso en el útero para facilitar la expulsión del feto así como la expulsión de leche por las glándulas mamarias durante la lactancia (Bear, et al., 1996). Por otro lado, la adenohipófisis, que aunque físicamente no forma parte del cerebro, es controlada por las secreciones hormonales que provienen de la eminencia media (definida como la porción ventral del hipotálamo) y que son transportadas por el sistema portal. Esto permite la irrigación directa de las moléculas mensajeras a la adenohipófisis y de esta manera se influencia la síntesis y liberación de otras hormonas.

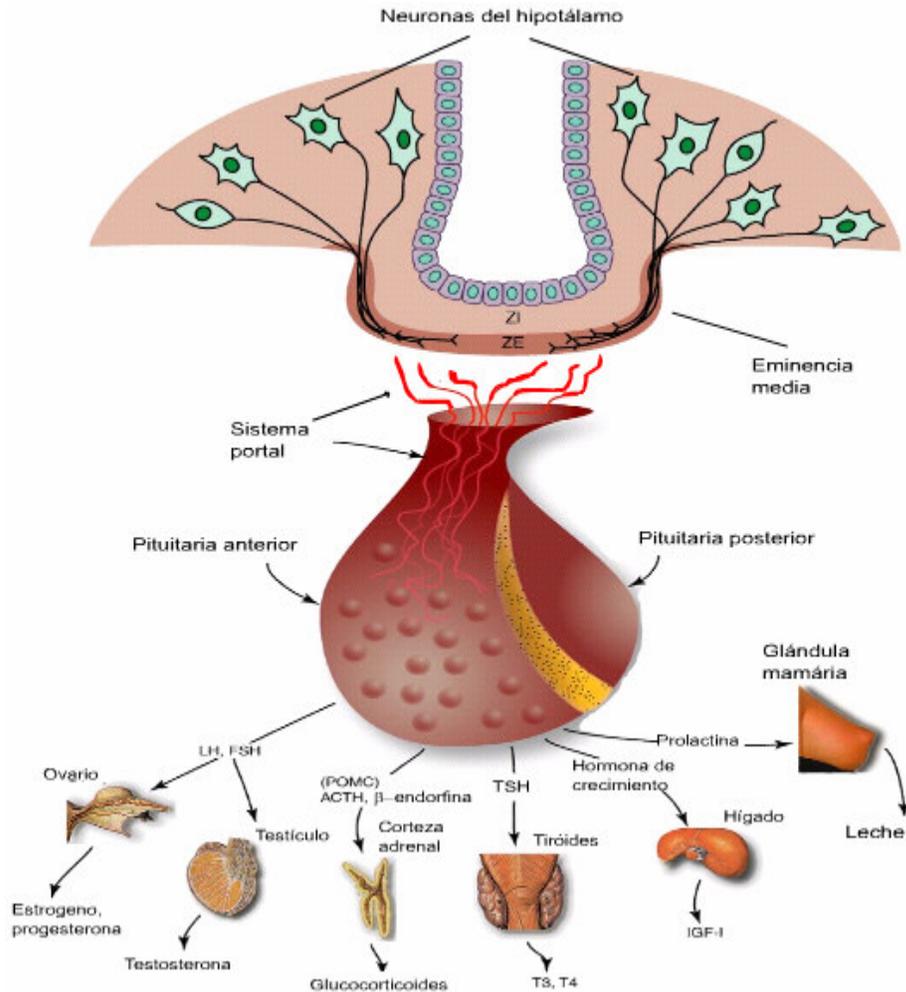


Figura 2.- Estructura general de los ejes hipotalámico-adenohipofisiario-órgano blanco. Las hormonas del hipotálamo son liberadas y transportadas a la pituitaria, la cual libera otras hormonas que estimulan o inhiben las glándulas endócrinas periféricas. ZI: zona interna de la eminencia media; ZE: zona externa de la eminencia media. Tomado y modificado de Squire et al., 2003.

1.1.2.1 Subpoblaciones celulares de la adenohipófisis

En los mamíferos, la mayoría de las células de la adenohipófisis se distribuyen con estrecha proximidad a los vasos sanguíneos y son las responsables de la producción de 7 hormonas, ACTH, MSH, FSH, LH, GH, PRL y TSH (ver tabla 1).

Como lo muestra la tabla 1, cada hormona es sintetizada y liberada por un subgrupo celular particular de la adenohipófisis (Gonzalez-Arenas et al, 2001); es por ello que a cada

subgrupo se le ha nombrado en alusión a la hormona que libera, por ejemplo, las células que liberan tirotrópina (TSH) son llamadas tirótropos, las células que liberan prolactina (PRL) son llamadas lactótropos. Estas células no presentan regionalización estricta; aunque algunos tipos celulares presenten una distribución preferente en determinadas zonas del lóbulo, se las puede encontrar en cualquier nivel del mismo.

Tabla 1.- Hormonas sintetizadas en la adenohipófisis y las células responsables de sintetizarlas.

Hormonas sintetizadas en la adenohipófisis	Nombre de la células que sintetizan la hormona en la adenohipófisis
Hormona adrenocorticotropa (ACTH)	Corticótropos
Hormona estimulante de melanocitos (MSH)	Melanótropos
Hormona foliculoestimulante (FSH)	Gonadótropos
Hormona luteinizante (LH)	Gonadótropos
Hormona de crecimiento (GH)	Somatótropos
Prolactina (PRL)	Lactótropos
Tirotrópina (TSH)	Tirótropos

Tomado y modificado de González-Arenas et al, 2001.

1.2 El eje hipotalámico-adenohipofisiario-tiroideo

El sistema neuroendócrino esta conformado por tres niveles: (1) la hormona hipotalámica que estimula o inhibe la síntesis de una hormona de la adenohipófisis; (2) la hormona de la adenohipófisis que es liberada al sistema circulatorio general; y (3) el órgano blanco que es regulado por la hormona liberada en la adenohipófisis (figura 2) (Squire et al., 2003). De esta manera, el conjunto de estos tres niveles se denomina eje hipotalámico-adenohipofisiario-órgano blanco. Por ejemplo, en el eje hipotalámico-adenohipofisiario-tiroideo, las neuronas TRHérgicas (que sintetizan y secretan a la hormona liberadora de tirotrópina [TRH por sus siglas en ingles; Tyrotropin Releasing Hormone]) ubicadas en el núcleo paraventricular del hipotálamo proyectan sus terminaciones nerviosas a la zona externa de la eminencia media. Es aquí donde secretan el neuropéptido TRH que viaja a

través del sistema portal hasta la adenohipófisis para inducir la síntesis y liberación de TSH y PRL en los tirótrofos y lactótrofos respectivamente. Por un lado la TSH es liberada al sistema circulatorio general y actúa sobre la glándula tiroidea en donde induce la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas tiroxina (T4) y triiodotironina (T3) para modular el metabolismo. A su vez, la T3 y la T4, a través de una retroalimentación negativa pueden controlar la producción de TRH y de TSH en las neuronas TRHérgicas del hipotálamo y en los tirótrofos de la adenohipófisis respectivamente (Joseph-Bravo et al., 1998; Squire et. al., 2003) (Figura 3). Por otro lado, la prolactina liberada de la adenohipófisis es transportada hasta la glándula mamaria en donde participa en la secreción de la leche (Haisenleder, 1992).

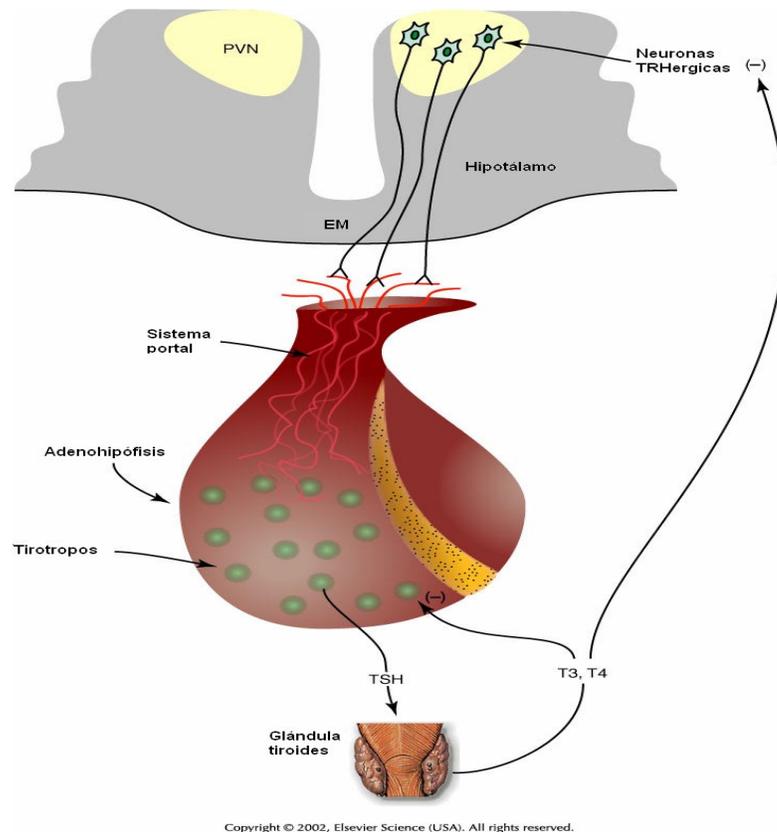


Figura 3.- El eje hipotalámico-adenohipofisiario-tiroideo. El TRH es sintetizado en el núcleo paraventricular del hipotálamo. Ante un estímulo fisiológico, las terminales nerviosas de estas neuronas ubicadas en la eminencia media liberan el péptido hacia el sistema portal, lo que permite que sea transportado a la adenohipófisis donde induce la liberación de tirotrópina. La tirotrópina secretada llega a la tiroides y estimula la liberación de T3 y T4. PVN: Núcleo paraventricular; EM: eminencia media. Tomado y modificado de Squire et al., 2003.

1.3 La hormona liberadora de tiotropina (TRH)

La molécula mensajera que participa en el primer nivel del eje hipotalámico-adenohipofisario-tiroideo es el péptido TRH, un tripéptido de secuencia pGlu-His-ProNH₂ (figura 4) presente no solo en las neuronas del hipotálamo, sino también en otras regiones del sistema nervioso central (Jackson, 1983). Es por eso que aunque fue primero reconocido como una hormona regulatoria hipotalámica se ha sugerido que puede funcionar como neurotransmisor y neuromodulador en el SNC (Horita et al., 1986).

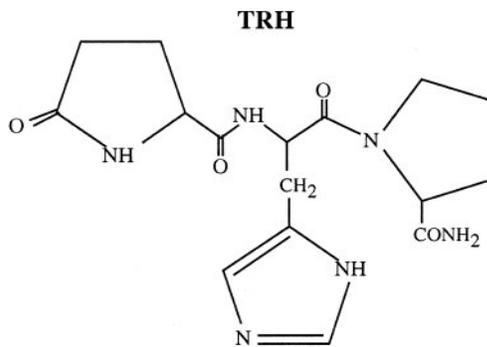


Figura 4.- La hormona liberadora de tiotropina. El TRH es un tripéptido de secuencia piriglutamil-histidil--prolinamida (pGlu-His-ProNH₂). Tomado de Cummins y O'Connor, 1998.

El gen que codifica para el TRH ha sido caracterizado en rata y humano. Ambos genes presentan un 73 % de identidad en todo el gen y 89 % en la región que codifica para el TRH (Lee et al., 1988; Yamada et al., 1990). El TRH es sintetizado a partir de un precursor de alto peso molecular que contiene 5 veces repetida la secuencia Gln-His-Pro-Gly. Mediante el empleo de cultivos primarios hipotalámicos de rata, se sabe que el procesamiento del precursor del TRH toma lugar durante el transporte axonal para posteriormente depositarse en las terminaciones nerviosas (Nillni et al., 1996). Durante su recorrido a través del sistema de endomembranas (retículo endoplásmico, aparato de Golgi y vesículas de transporte) este precursor es hidrolizado por convertasas y una carboxipeptidasa para generar Gln-His-Pro-Gly; enseguida, la enzima glutaminil ciclasa convierte la Gln a pGlu y finalmente por la acción de una monooxigenasa α -amidante de la

peptidoglicina (PAM) se forma el extremo NH₂ a partir del Gly (Joseph-Bravo et al., 1998).

1.3.1 Distribución

El conocimiento de la estructura primaria del TRH permitió el desarrollo de anticuerpos específicos, los cuales han sido una gran herramienta para establecer su localización a nivel celular o subcelular así como su distribución regional. Consistente con su papel de hormona hipotalámica, estudios de inmunocitoquímica mostraron inmunoreactividad hacia el TRH en la eminencia media y el núcleo paraventricular del hipotálamo (Lechan y Jackson, 1982). El TRH también ha sido detectado en otras regiones del cerebro tales como el tallo cerebral, el cerebelo, el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, la amígdala y el hipocampo, así como en órganos como la neurohipófisis, adenohipófisis, la próstata, el tracto gastrointestinal y el páncreas (Jackson, 1983). El papel de esta molécula en dichos órganos no ha sido elucidado aún. La amplia distribución del TRH en las células del SNC sugiere que puede tener funciones más allá de su papel neuroendócrino. Se ha sugerido que el TRH funciona como un neurotransmisor, un neuromodulador o un factor parácrino, como lo sugieren algunos estudios que lo involucran en la termorregulación, la memoria y la regulación del dolor, así como en efectos neuroprotectivos, antiepilépticos y antidepresivos (Nillni y Sevarino, 1999; Lloyd et al., 2001; Hinkle et al., 2002).

1.3.2 Receptor del TRH

El TRH inicia sus efectos sobre la adenohipófisis mediante su interacción con receptores membranales ubicados en la superficie de los tirótrofos y los lactótrofos. Las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de los ADNc del receptor de TRH de la línea tumoral tirotrópica, de la línea tumoral GH3 (una línea tumoral de lactótrofos que libera PRL en respuesta al TRH) y de la adenohipófisis de rata, permitieron mostrar que el receptor del TRH es un miembro de la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (Gershengorn y Osman, 1996) (figura 5). A este receptor se le ha denominado “receptor para TRH” (TRH-R, [por sus siglas en inglés Tyrotropin-Releasing Hormone Receptor]). Al comparar la secuencia de aa deducida entre diferentes especies se observa una alta identidad a lo largo de la secuencia primaria a excepción del carboxilo terminal: el TRH-R

de ratón tiene una secuencia de 393 aa, el de rata tiene una secuencia adicional de 18 aa (un total de 411 aminoácidos) y el TRH-R de humano presenta una secuencia de 398 aa (O'Leary y O'Connor, 1995). Recientemente se ha clonado a partir del cerebro de rata, un ADNc que codifica para un ARNm de 9.5 kb que se traduce a un subtipo del TRH-R, llamado TRH-R2 (para diferenciarlo del primero al cual denominaron TRH-R1) (Itadani et al., 1998). El ARNm del TRH-R2 codifica para una proteína de 325 aminoácidos que muestra un 51 % de identidad con el TRH-R1 (O'Dowd et al., 2000). Este subtipo de receptor solo se expresa en el cerebro (a diferencia del TRH-R1 que también se expresa en la adenohipófisis), por lo que se ha sugerido su participación en la transmisión TRHérgica dentro del SNC pero no en el sistema neuroendócrino.

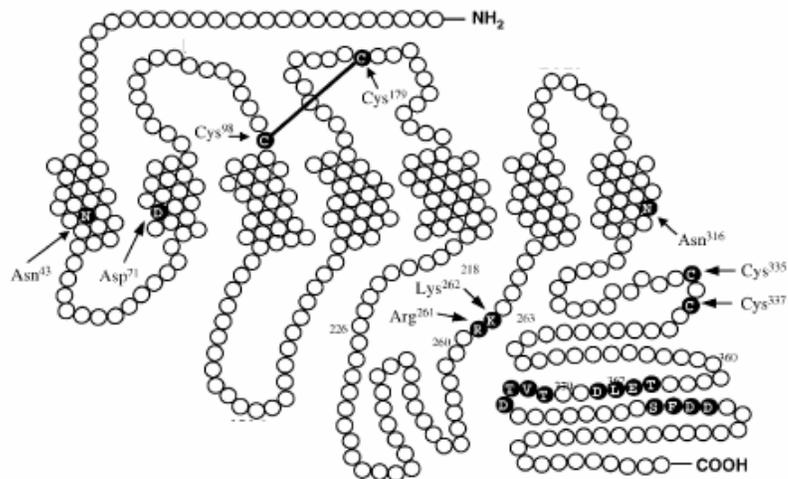


Figura 5.- Representación esquemática del receptor TRH-R1 de rata. El receptor TRH-R1 de rata consta de 411 aminoácidos, algunos de ellos (los señalados) importantes para mantener la función. Tomado y modificado de Pflieger et al., 2004.

Estudios realizados en la adenohipófisis de rata mediante la técnica de hibridación *in situ* o “Northern blot” mostraron que el ARNm del TRH-R1 está presente en el 60 % de la población celular y que de este porcentaje 62 % está en somatotropos y 30 % en lactotropos (Konaka et al., 1997). Sin embargo, en cultivos primarios de la adenohipófisis de rata, mediante la técnica de inmunocitoquímica y el empleo de un análogo fluorescente del TRH, el TRH-R fue detectado en los lactotropos y en los tirótropos, pero no en los somatotropos. Esto sugiere que el ARNm del TRH-R en los somatotropos no expresa al TRH-R, lo cual

concuera además con el hecho de que en condiciones normales, los somatótrofos no son blanco del TRH (Yu et al., 1998).

La cascada de señalización iniciada por el TRH al unirse a los TRH-Rs provoca el acoplamiento de proteínas $G_{q/11}$. Estas últimas activan a su vez a una enzima llamada fosfolipasa C, la cual promueve la hidrólisis de fosfatidil inositol 4,5- P_2 (PIP_2) para formar inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). Por un lado, el IP_3 promueve un primer aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} al unirse a su receptor localizado en las membranas del retículo endoplásmico, lo que conlleva a la activación de la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina ($Ca_2+/CamKin$) para posteriormente conducir a una primera fase de liberación de PRL. Por otro lado, el DAG activa la proteína cinasa C (PKC), que a su vez activa a canales dependientes de voltaje tipo L que permiten la entrada de Ca^{2+} extracelular dando como resultado final una segunda fase de liberación de PRL (Gollasch et al., 1993; Ashworth y Hinkle, 1996). Por otro lado, los estudios llevados a cabo en tirótrofos y en células de la línea tumoral de ratón, han comprobado que el TRH también provoca la hidrólisis de PIP_2 , lo que conlleva al incremento de Ca^{2+} intracelular y a la subsiguiente síntesis y liberación de tirotrópina (Brenner-Gati y Gershengorn, 1986; Ashworth y Hinkle, 1996).

La activación del TRH-R1 también estimula la proteína cinasa activadora de mitógeno (MAPK). Tanto la PKC, la $Ca_2+/CamKin$ y la MAPK inducen la transcripción del gen de la PRL y TSH mediante los factores de transcripción CREB, AP-1 y Elk-1 (Sun et al., 2003) (figura 6).

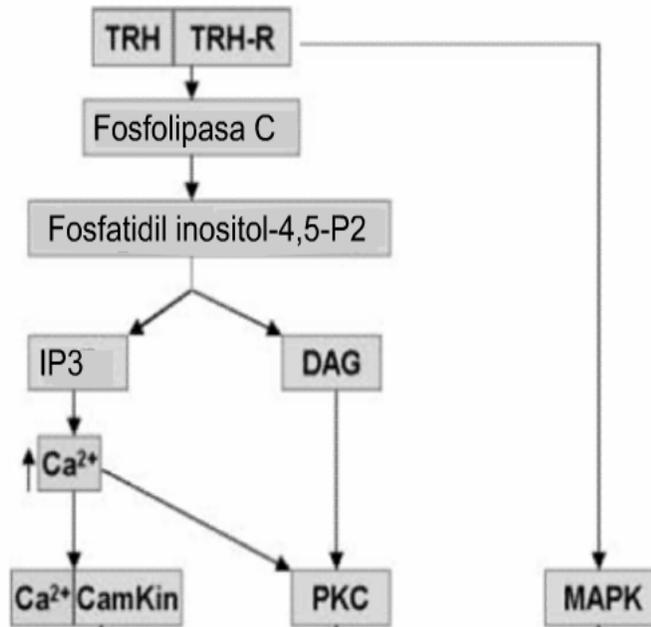


Figura 6. Transducción de señales iniciada mediante la unión del TRH a su receptor específico TRH-R1. Una vez que el TRH se une al TRH-R, este último provoca el acoplamiento de proteínas $G_{q/11}$, que a su vez activan a la fosfolipasa C promoviendo la hidrólisis de fosfatidil inositol 4,5- P_2 (PIP₂) para formar inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). La unión del IP₃ a su receptor localizado en las membranas del retículo endoplásmico promueve un primer aumento de Ca^{2+} que activa a la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina ($Ca_2^+/CamKin$) y a la proteína cinasa C (PKC). Por otro lado, el DAG también activa a la PKC, que a su vez activa a canales dependientes de voltaje tipo L que permiten la entrada de Ca^{2+} extracelular. Tanto la PKC, la $Ca_2^+/CamKin$ y la MAPK (que también es activada por el TRH-R) inducen la transcripción del gen de la PRL y TSH. Tomado y modificado de Sun et al., 2003.

1.4 Inactivación del TRH

La inactivación de neuropéptidos se lleva a cabo principalmente por ectopeptidasas (peptidasas con su sitio catalítico dirigido hacia el espacio extracelular). Varias evidencias sugieren que la degradación enzimática es el mecanismo responsable de regular la señal del TRH. A continuación se describen algunas enzimas que son capaces de degradar a este péptido *in vitro*.

1.4.1 Degradación por enzimas citosólicas

Estudios iniciales mostraron que dos enzimas citosólicas pueden degradar al TRH *in vitro*: la prolil endopeptidasa (PE; EC 3.4.21.26) y la piroglutamil aminopeptidasa I (PPI; EC 3.4.11.8) (O'Leary y O'Connor, 1995). La prolil endopeptidasa (PE) es una enzima de tipo serin proteasa que tiene un peso molecular de 70 kDa. Esta enzima hidroliza un amplio espectro de sustratos por el carboxilo terminal de la prolina (a excepción del enlace Pro-Pro). Sus sustratos incluyen un gran número de neuropéptidos tales como: la angiotensina I y II, la sustancia P, la neurotensina, a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y el TRH (Walter, 1976). Por su parte, la piroglutamil aminopeptidasa I (PPI) es una enzima monomérica de peso molecular variable (de 22 a 60 Kda, dependiendo de la fuente) y un pH óptimo entre 6.5 y 8.5 (Cummins y O'Connor, 1998). La PPI ha sido purificada a partir de la fracción soluble de distintos tejidos de mamífero, incluyendo el cerebro de bovino, de rata, de ratón y de cuyo, la adenohipófisis de bovino y de rata, el hígado de rata, la corteza cerebral humana y el riñón humano (Cummins y O'Connor, 1998). Ya que la PPI es una thiol proteasa, su actividad puede ser inhibida por agentes bloqueantes de grupos sulfidrilo, tales como N-etilmaleimida, PBC y 2-iodoacetamida (Cummins y O'Connor, 1998). La PPI hidroliza un amplio espectro de sustratos con residuo pGlu en el extremo amino terminal de los péptidos. Estos sustratos incluyen al TRH, GnRH, a la neurotensina y otros sustratos sintéticos (Cummins y O'Connor, 1998). La inhibición selectiva con inhibidores específicos, tanto de la PE como de la PPI, no cambia el contenido ni la liberación de TRH *in vitro* e *in vivo* en cerebros de roedores (Charli et al., 1987; Mendez et al., 1990). La localización citosólica de las enzimas, su amplio espectro de sustratos, su distribución y el hecho de que ambas enzimas no son liberadas al espacio extracelular, sugieren que estas enzimas (PE y PPI) juegan un papel en el catabolismo de péptidos intracelulares, más que funcionar como enzimas reguladoras de la actividad del TRH u otros neuropéptidos.

1.4.2 Degradación por una enzima presente en suero

Hace algunas décadas, se identificó y purificó a partir de suero de rata, una enzima que hidroliza la unión peptídica entre el pGlu-His del TRH (Bauer y Nowak, 1979). Se encontró que la enzima es diferente de la enzima citosólica PPI pues las características bioquímicas son muy distintas. La enzima de suero no es inhibida por agentes bloqueantes de grupos

sulfidrilo, pero es inhibida por quelantes de metal (lo que sugiere que es una metaloproteasa), su actividad es óptima a pH neutro y además tiene un peso molecular de 260 kDa, un peso mucho mayor que el de la PPI. Estudios llevados a cabo para determinar su especificidad mostraron que esta enzima era altamente específica para el TRH y péptidos sintéticos semejantes al TRH (Bauer y Nowak, 1979), ya que otros péptidos conteniendo el pGlu en el extremo amino terminal tales como la neurotensina o el LHRH no son sustrato de esta enzima. A consecuencia de tal selectividad, esta enzima fue llamada “Tiroliberinasa” (el TRH también era conocido como tiroliberina). Se ha comprobado que en el suero, el TRH es degradado principalmente por la tiroliberinasa (Frideman y Wilk, 1985), por lo que se ha sugerido que *in vivo*, la tiroliberinasa inactiva al TRH en el sistema portal, en donde el TRH entra en contacto con la sangre (Charli et al., 2006).

1.4.3 Degradación por la Piroglutamil peptidasa II (PPII)

Hace algunos años, se encontró que en membranas sinaptosomales de cerebro de rata existe una actividad que puede inactivar al TRH (Joseph-Bravo et al., 1979). Posteriormente se descubrió que la actividad correspondía a una hidrolasa, la cual corta el enlace peptídico pGlu-His del TRH (de igual manera que la PPI y la tiroliberinasa). A esta enzima se le denominó Piroglutamil peptidasa II (PPII; EC 3.4.19.6) (O'Connor y O'Cuinn, 1984; Garat et al., 1985). Más tarde se encontró que la actividad de esta enzima se encuentra enriquecida en el cerebro, con altos niveles en el bulbo olfatorio, hipotálamo, corteza cerebral, hipocampo y con bajos niveles en la medula espinal y varios órganos como la adenohipófisis (Vargas et al., 1987; Vargas et al., 1992 a). El hecho de que la actividad de la enzima se encuentre distribuida de manera heterogénea sugiere que tiene un papel definido en las regiones con alta actividad. En el cerebro, mediante el empleo de TRH radioactivo, se ha demostrado que regiones con mayor unión al TRH-R contienen altos niveles de actividad de la PPII (Vargas et al., 1987; Vargas et al., 1992 a).

1.4.3.1 Características bioquímicas de la PPII

La PPII tiene propiedades bioquímicas similares a la Tiroliberinasa; tiene actividad óptima a pH neutro, su actividad es inhibida mediante quelantes de metal, tiene masa molecular similar a la tiroliberinasa y selectividad de sustrato muy específica (Bauer et al., 1981). La

PPII ya ha sido purificada del cerebro de rata y de cerdo en donde está presente como un homodímero (Bauer et al., 1994). Un análisis de los fragmentos peptídicos de la tiroliberinasa obtenidos mediante digestión enzimática con proteinasas reveló que la secuencia peptídica de la enzima de suero es similar a una secuencia peptídica obtenida de la PPII de cerebro de cerdo previamente encontrada por la misma metodología (Schauder et al., 1994 y Schmitmeier et al., 2002). Todas estas similitudes observadas entre la enzima de suero y la enzima integral de membrana sugieren que ambas son productos del mismo gen.

La PPII es muy específica en cuanto a la selectividad para su sustrato, pues a diferencia de otras enzimas que pueden degradar varios péptidos muy grandes y con secuencias diferentes, la PPII hidroliza péptidos no mayores a 4 aminoácidos y con secuencias muy parecidas a las del TRH: **pGlu-X-Y ó Z**, donde **X** puede ser His, un aminoácido aromático ó neutro, **Y** puede ser Pro, Ala ó Trp, **Z** puede ser Pro-NH₂, Pro-Gly, ProBNA ó Pro-MCA (Wilk y Wilk, 1989; Elmore et al., 1990; Kelly et al., 2000). La *K_m* para el TRH es de 40 uM (Charli et al., 1998).

La secuencia proteica de esta enzima solo ha podido ser deducida a partir del ADNc de la PPII; tal secuencia corresponde a una proteína integral de membrana tipo II de 1025 aminoácidos en la rata y 1024 aminoácidos en el humano. Así mismo, se ha propuesto la siguiente topografía: una pequeña región N-terminal intracelular con un sitio potencial de fosforilación por proteínas cinasas C (PKC); una región transmembranal; y un gran región extracelular con la secuencia consenso His-Glu-X-X-His y un segundo Glu separado por 18 aa, aminoácidos característicos de las zinc peptidasas de la familia M1. El dominio extracelular también incluye un dominio C terminal, un dominio catalítico y 12 sitios posibles de N-glicosilación (Schauder et al., 1994; Schomburg et al., 1999; Chavez-Gutierrez et al., 2005) (figura 7).

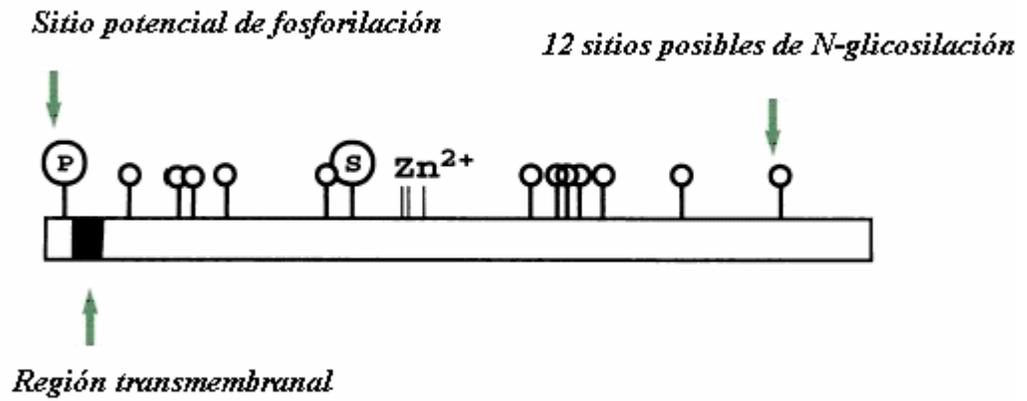


Figura 7.- Topografía de la PPII deducida a partir del ADNc del gen de la PPII. S: Sitio posible de sulfatación. Tomado y modificado de Schauder et al., 1994.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 La PPII en la adenohipófisis

La adenohipófisis es una glándula conformada por una población heterogénea de células. Algunas de las peptidasas encargadas de regular la señalización de péptidos provenientes del hipotálamo se encuentran solo en algunas de las subpoblaciones celulares de esta región. Tal es el caso de la enzima endopeptidasa neutra 24.11 (EC 3.4.24.11), la cual está presente solamente en gonadótropos (Barnes y Kenny, 1988). Esta enzima es capaz de hidrolizar al factor liberador de corticotropina, la sustancia P, las encefalinas y otros péptidos (Charli et al., 2006). Existen algunas evidencias que indican que la enzima convertidora de angiotensina (ACE, EC 3.4.15.1) está presente solo en gonadótropos en donde hidroliza a la Angiotensina I para generar a la molécula biológicamente activa Angiotensina II, sustancia circulante en la sangre con efecto vasoconstrictor (Ganong et al., 1989). Aunque la PPII se encuentra en la adenohipófisis (Vargas et al., 1987), existen evidencias de que esta enzima se encuentra solo en uno de los sitios blanco del TRH. Mediante el enriquecimiento de las subpoblaciones celulares de esta región, se encontraron evidencias de que esta enzima está presente solo en lactótropos pero no en tirótropos (Bauer et al., 1990). Aunado a esto, mediante el uso de hibridación *in situ* (ISH) para el ARNm de la PPII y el empleo de inmunohistoquímica para las hormonas prolactina y tirotropina, se encontró que ningún tirótropo expresa el ARNm de la PPII y que únicamente el 10 % de los lactótropos expresa el ARNm de la enzima (Cruz et al., no publicado).

2.1.1 Regulación de la PPII en la adenohipófisis

En la adenohipófisis la expresión de la PPII es regulada en diversos paradigmas endógenos del organismo. En la ontogenia de la rata, la expresión de la PPII de adenohipófisis coincide con la maduración de la eminencia media, la aparición de los lactótropos y la detección de hormonas tiroideas y la prolactina en suero (Vargas et al., 1992 b). En el ciclo circadiano de las ratas, se demostró que la actividad y el ARNm de la PPII fluctúan durante el día, y que algunas de estas fluctuaciones se deben a las variaciones en la actividad secretoria de las neuronas TRHérgicas (Vargas et al., 2002). Durante el ciclo estral, la actividad de esta enzima es variable, posiblemente por las fluctuaciones en los niveles de

estrógenos durante este ciclo (Uribe et al., 1991). Consistente con este hecho, la administración exógena de 17β -estradiol decreta la actividad específica y el ARNm de la PPII de adenohipófisis *in vitro* e *in vivo* (Bauer, 1988; Schomburg y Bauer, 1995). De manera opuesta, las hormonas tiroideas aumentan la actividad específica y el ARNm de la PPII de adenohipófisis *in vivo* (Bauer, 1988; Ponce et al., 1988; Schomburg y Bauer, 1995). Mediante el empleo de cultivos primarios de adenohipófisis se demostró que los efectos de las hormonas tiroideas actúan directamente sobre la enzima PPII ubicada en esta glándula (Bauer et al., 1990).

Algunos factores hipotalámicos que controlan la secreción de prolactina como la somatostatina, la dopamina y el TRH regulan la actividad de la PPII *in vitro*. Por ejemplo, la dopamina (que inhibe la síntesis y liberación de prolactina) aumenta la actividad de la PPII (Vargas et al., 1998). El TRH por sí mismo, así como el [3-Me-His(2)]-TRH (un potente agonista del receptor del TRH), disminuyen la actividad de la PPII de adenohipófisis y los niveles del ARNm de la enzima tanto *in vitro* como *in vivo* (Vargas et al., 1994; Vargas et al., 2002). Estos datos sugieren que múltiples factores hipotalámicos que regulan la secreción de prolactina también ejercen efectos regulatorios sobre la actividad de la PPII.

2.2 Inhibición de la PPII

La degradación enzimática regula la actividad de péptidos biológicamente activos (Griffiths y Kelly, 1979). Las peptidasas asociadas a membranas plasmáticas con su sitio activo orientado hacia el espacio extracelular están estratégicamente situadas para terminar la comunicación celular mediada por péptidos. La inhibición selectiva de las ectopeptidasas es una herramienta útil para investigar las funciones biológicas de los sistemas peptidérgicos (Roques, 2000). La inhibición de peptidasas tiene aplicaciones médicas. Un ejemplo conocido es el uso de inhibidores de la ACE, que se utilizan para tratar la insuficiencia cardíaca y la presión arterial alta (Cushman y Ondetti, 1995). Generalmente estos inhibidores se unen al sitio catalítico de las ectopeptidasas evitando que el sustrato sea hidrolizado. En el caso de la PPII, también se han sintetizado algunos inhibidores con los que se ha intentado determinar el papel de la PPII en la transmisión TRHérgica *in vitro*; sin

embargo, con ninguno se ha podido evaluar el papel fisiológico de la PPII *in vivo*. A continuación se describen algunas de las propiedades de los inhibidores de la PPII que hasta ahora se han caracterizado.

2.2.1 Inhibición por CPHNA

La PPII ha sido identificada como una metalopeptidasa que degrada específicamente al TRH, por lo que una molécula que pueda incorporar las características del TRH, así como un grupo capaz de quelar el ión metálico del sitio activo de la enzima pudiese generar un inhibidor muy potente. La aminación reductiva de péptidos con α -ceto ácido, es una herramienta para la síntesis de inhibidores dirigidos contra el sitio activo de algunas metaloenzimas. Por ejemplo, el enapril es un inhibidor de la ACE y es un ejemplo de estos componentes (Patchett et al., 1980). Mediante la aminación reductiva del His(N^{im} -benzyl)- β NA más fenilpiruvato, se sintetizó el CPHNA (N-(-carboxi-2-feniletíl)- N^{im} -benzil-histidil- β NA), un inhibidor sintético de la PPII. Un pGlu conteniendo el ceto ácido obviamente podría presentar mejores características de unión, desafortunadamente este intermediario no pudo ser sintetizado. El CPHNA fue el primer inhibidor sintético de la PPII (figura 8). Tiene una K_i (la concentración de inhibidor a la cual se inhibe 50 % la actividad de la enzima) de 8 μ M. Este inhibidor no inhibe la actividad enzimática de la PE, de la PPI (solo en dosis muy altas), o de la Aminopeptidasa N; esta última es una enzima de la misma familia de la PPII, lo que nos sugiere una buena especificidad de este inhibidor. La incubación de rebanadas de varias regiones del cerebro de rata en presencia de CPHNA, provocó un incremento en la cantidad de TRH recuperado, tanto en condición basal, como en condición despolarizante, indicando que los niveles de TRH fueron incrementados debido a la inhibición de la actividad PPII de dichas regiones (Charli et al., 1989). Cabe mencionar que este inhibidor es poco potente y que mostró tener efectos inespecíficos sobre la liberación de neurotransmisores clásicos, lo que dificultó su posterior empleo en el SNC en paradigmas relacionados con la inhibición de la PPII.

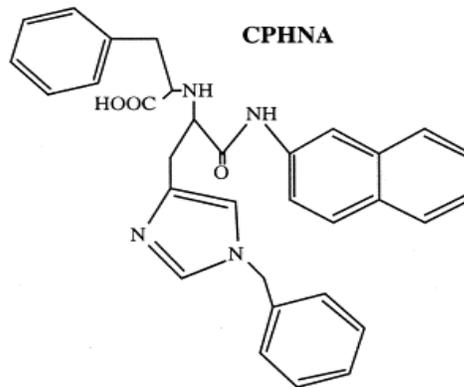


Figura 8.- Estructura del CPHNA, el primer inhibidor sintético de la PPII. Este inhibidor es de tipo reversible, cuenta con una K_i de 8 μM y no inhibe a la PE y a la PPI, enzimas que degradan al TRH *in vitro*. Tomado de Cummins y O'Connor, 1998.

2.2.2 Inhibidores sintéticos de la PPII en donde se ha sustituido la histidina por asparagina en la molécula del TRH

Mediante estudios cinéticos para determinar la especificidad de la PPII, usando una librería de péptidos en donde se sustituyó el residuo de histidina del TRH, se identificaron dos inhibidores de la enzima PPII: el pGlu-Asn-ProNH₂ y el pGlu-Asn-Pro-MCA, con un valor de K_i de 17.5 μM y 0.97 μM respectivamente (Kelly et al., 2000). La inyección intracerebroventricular e intraperitoneal de ratas con el inhibidor pGlu-Asn-Pro-MCA y el TRH, resultó en un incremento en la conducta llamada “wet-dog shake” (una conducta producida por la administración de TRH) respecto a las ratas inyectadas solo con TRH (Kelly et al., 2001). Más tarde, el mismo grupo publicó la síntesis de un inhibidor de secuencia pGlu-Asn-Pro-Tir-Trp-Trp-amido-MCA (P.I.), el cual hasta el momento es el inhibidor más potente con una K_i de 1 nM (Kelly et al., 2005). La incubación de rebanadas de hipotálamo en presencia y ausencia del P.I. (en una concentración de 100 μM) permitió recuperar mayor cantidad de TRH liberado, tanto en condición basal como en condición despolarizante (Kelly et al., 2005), sugiriendo su capacidad para proteger al TRH hipotalámico de la degradación por la enzima PPII. Aunque los datos mencionados en relación con estos inhibidores concuerdan con el papel de la PPII en la regulación de la señal del TRH en el cerebro, en el trabajo de estos investigadores no se determinó la especificidad de los inhibidores, es decir, no se sabe si inhiben a otras peptidasas, incluyendo a enzimas de la familia de la PPII. Otro inconveniente del P.I., es que aunque en

el trabajo publicado se reporta un valor de K_i de 1 nM, en los experimentos que los autores realizaron en rebanadas de hipotálamo lo utilizaron en una concentración de 100 uM, es decir, 100 000 veces mayor a la concentración de su K_i . Consistente con estos resultados, la ED50 determinada en nuestro laboratorio es de 1 μM. Por lo tanto, los resultados obtenidos con este inhibidor en este trabajo no son totalmente contundentes, pues pudiesen ser artefacto de la alta concentración de inhibidor utilizado o de su inespecificidad sobre otras peptidasas.

2.2.3 Inhibición por HcPI

Algunos invertebrados marinos (tales como las esponjas, equinodermos, anélidos, celenterados) son una fuente natural importante de inhibidores de proteasas (Fritz et al., 1972; Kolkenbrock y Tschesche, 1987; Scheitz et al., 1995). Estos inhibidores actúan principalmente sobre enzimas de tipo serinproteasas, aunque se ha podido aislar péptidos con actividad inhibitoria de diferentes clases de proteinasas a partir de algunos celenterados marinos. Siguiendo esta línea de trabajo, el grupo de la Dra. Chávez de la Universidad de La Habana, Cuba, en colaboración con nuestro laboratorio, logró aislar y purificar un inhibidor específico de la PPII a partir del anélido marino *Hermodice carunculata*, comúnmente conocido como gusano de fuego. Este inhibidor llamado HcPI, tiene una K_i de 51 nM, y es un inhibidor altamente específico. La inyección intraperitoneal de este inhibidor en ratones disminuye la actividad específica de la PPII de adenohipófisis y algunas regiones del SNC tal como el hipotálamo y el bulbo olfatorio, sugiriendo su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (Pascual et al., 2004). A diferencia del resto de los inhibidores de la PPII, la estructura de este inhibidor no ha sido determinada; sin embargo se sabe que su estructura no es proteica y que tiene un peso molecular menor a 1000 Da.

2.2.4 Inhibición por TRH-fosfínico

La sustitución del enlace peptídico (CO-NH) por el enlace PO_2-CH_2 ha dado como resultado una nueva familia de pseudopéptidos denominados péptidos fosfínicos. El empleo de esta nueva familia de pseudopéptidos ha conducido a la síntesis de potentes inhibidores, especialmente de las zinc metaloproteasas. Por ejemplo, existen inhibidores fosfínicos

contra la enzima ACE, la endopeptidasa 24-11, la leucinaminopeptidasa, entre otras (Dive et al., 2000; Collinsova y Jiracek, 2000). Por otra parte, se han sintetizado inhibidores fosfónicos contra proteasas ácidas, tal como la proteasa del virus de inmunodeficiencia humana (Dreyer et al., 1989). La similitud de la estructura química de los péptidos fosfónicos con la de los sustratos naturales de las enzimas ha conducido a la hipótesis de que estos pseudopéptidos pueden mimetizar la estructura del sustrato en el estado de transición (Dive et al., 2000). Con base en estos antecedentes, el Dr. Yiotakis sintetizó el inhibidor TRH-fosfónico a partir de la estructura del TRH, en donde la única diferencia entre estas dos moléculas radica en la sustitución del enlace (CO-NH) por el enlace (PO₂CH₂) entre el pGlu-His del TRH (figura 9). La *K_i* de este inhibidor es de 70 nM y actualmente no se cuenta con algún reporte de este inhibidor relacionado con la comunicación TRHérgica.

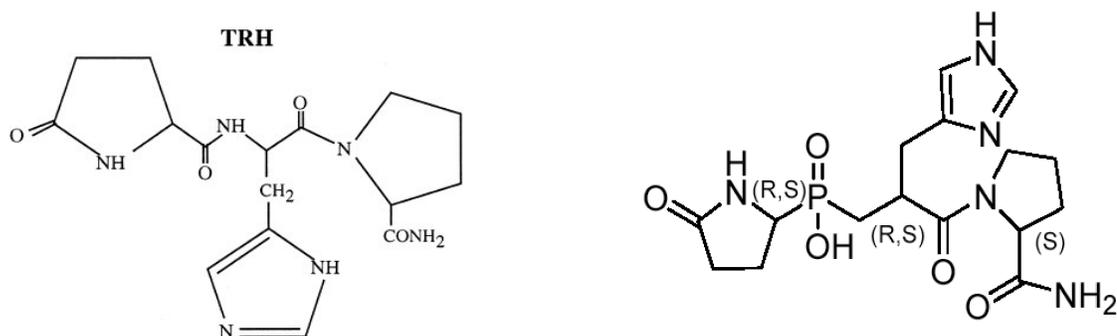


Figura 9.- Estructura del TRH (izquierda) y del TRH-fosfónico (derecha), un inhibidor sintético de la PPII. La estructura de la molécula TRH (pGlu-His-ProNH₂) y la estructura del TRH-fosfónico son similares; este último tiene la sustitución del enlace (CO-NH) por el enlace (PO₂CH₂), siendo esta la única diferencia entre ambas moléculas.

2.3 Datos preliminares sobre el efecto de la inhibición de la PPII de adenohipófisis

2.3.1 La inhibición de la expresión del ARNm de la PPII potencia la liberación de PRL pero no de TSH en cultivos primarios de adenohipófisis

Como se mencionó anteriormente, existen evidencias que indican que la PPII se encuentra presente solo en un pequeño porcentaje de lactótrofos, pero no en tirótrofos (Bauer, et al., 1990; Cruz et al., no publicado). Esto condujo a nuestro grupo de trabajo a una hipótesis muy interesante; si la PPII de adenohipófisis (localizada específicamente en los lactótrofos) es la encargada de terminar la señal del TRH extracelular, al suprimir la actividad de la enzima sería posible proteger al TRH de ser degradado en los sitios cercanos a los lactótrofos, aumentando su acción sobre la síntesis y liberación de prolactina. Sin embargo, la concentración de TRH extracelular cercano a los tirótrofos no cambiaría, puesto que en este subgrupo celular no existe la enzima encargada de regular los niveles de TRH, es decir, la acción del TRH sobre la síntesis y liberación de tirotrópina sería la misma en presencia y ausencia del inhibidor (figura 10). Para corroborar esta hipótesis, nuestro laboratorio se dio a la tarea de diseñar varios oligodeoxinucleótidos antisentido contra el ARNm de la PPII. Esta es una técnica utilizada en biología molecular y celular que permite reducir los niveles del ARNm mediante la inhibición de la traducción de un gen determinado. Los mecanismos de acción que explican la inhibición de la traducción del ARNm se deben a que los oligodeoxinucleótidos son pequeñas secuencias de DNA diseñadas de tal modo que pueden reconocer la secuencia complementaria del ARNm celular que se pretende estudiar. El reconocimiento del oligodeoxinucleótido al ARNm complementario evita que la maquinaria traduccional comience a sintetizar a la proteína, y por el otro lado, el heteroduplex de doble cadena es reconocido por la RNasa H, lo que conduce a la degradación del ARNm (Matteucci y Wagner, 1996). Luego de varias pruebas, el laboratorio eligió dos oligodeoxinucleótidos para iniciar los estudios planteados, inicialmente, en cultivos primarios de adenohipófisis. La hipótesis del laboratorio fue corroborada, pues se encontró que al inhibir al ARNm de la PPII con los

oligodeoxinucleótidos, se incrementa la liberación de prolactina en respuesta al TRH, mientras que la liberación de tirotrópina no se ve afectada (Cruz et al., no publicado). Estos datos confirman el papel de la PPII en la regulación de la señal del TRH, y además, que esta regulación se lleva a cabo en los sitios cercanos a los lactótrofos *in vitro*.

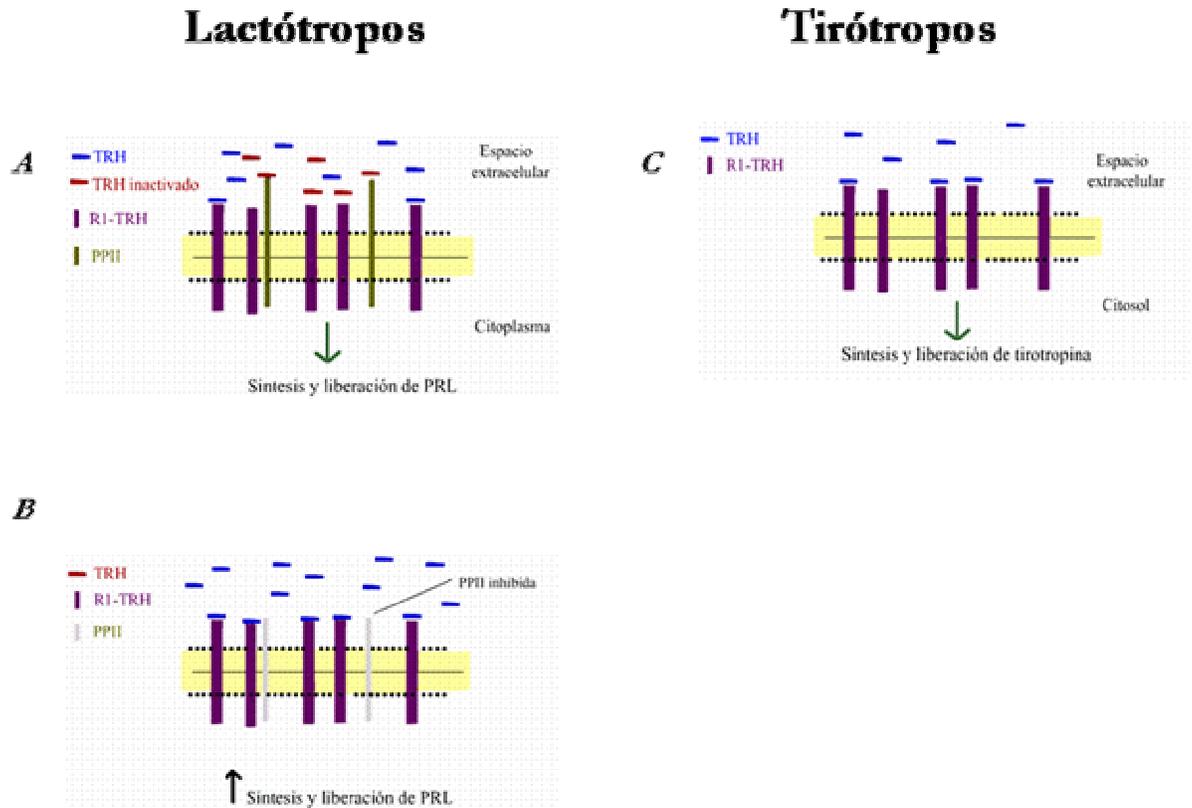


Figura 10.- Hipótesis sobre el efecto de la inhibición de la PPII en la respuesta fisiológica de los lactótrofos y de los tirótrofos. A) En los lactótrofos de la adenohipófisis, el TRH induce la liberación de PRL al unirse con su receptor TRH-R1, sin embargo esta señalización es regulada por la PPII, la cual degrada al TRH en el espacio extracelular. **B)** Al inhibir a la PPII, se podría proteger al TRH extracelular de la degradación enzimática y por tanto aumentar la señalización de esta molécula, lo que conllevaría a un aumento en la síntesis y liberación de PRL. **C)** En los tirótrofos de la adenohipófisis, el TRH induce la liberación de TSH al unirse con su receptor TRH-R; aunque se intente inhibir a la PPII, los niveles extracelulares del TRH y la liberación de TSH no cambiaran, por que la PPII no se expresa en estas células (Bauer et al., 1990; Cruz et al., no publicado).

2.3.2 Datos preliminares sobre el empleo de inhibidores de la PPII

Datos preliminares de nuestro laboratorio demostraron que el tratamiento de cultivos primarios de adenohipófisis con inhibidores de la PPII en conjunto con TRH, aumentan la liberación de prolactina. Tal es el caso para el inhibidor HcPI, que incubado con TRH aumentó los niveles de PRL secretada en el medio respecto al grupo incubado solo con TRH desde los 30 minutos y hasta el final del experimento (figura 11). Este no fue el caso para el inhibidor TRH-fosfínico, el cual solo aumentó los niveles de prolactina liberada ciertos tiempos del experimento (Vargas, comunicación personal). Por otro lado, el inhibidor pGlu-Asn-Pro-MCA, además de su efecto inhibitorio contra la PPII, induce por si mismo la liberación de PRL en el cultivo primario de adenohipófisis en concentraciones cercanas a su K_i , probablemente por un efecto agonista con el TRH-R1 (Vargas comunicación personal). Este último efecto también pudiese deberse a algún efecto inespecífico del inhibidor, por lo que se complica el empleo del pGlu-Asn-Pro-MCA en nuestros experimentos para comprender el efecto de la inhibición de la PPII.

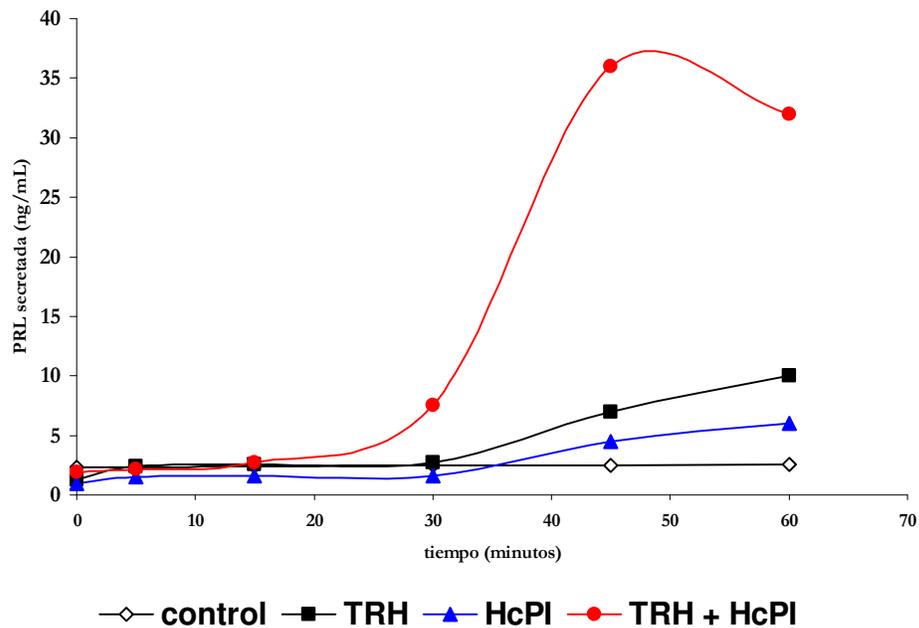


Figura 11.- Efecto del HcPI y el TRH sobre la liberación de prolactina en cultivos primarios de adenohipófisis. Pascual 2005, Tesis de Doctorado.

Capítulo 3. Hipótesis, justificación y objetivos

3.1 Hipótesis

La hipótesis de este trabajo es la misma que se planteó al inhibir la expresión del ARNm de la PPII de adenohipófisis con oligonucleótidos antisentido y es la siguiente: puesto que la PPII se encuentra en los lactótrofos pero no en los tirótrofos de la adenohipófisis, su inhibición aumentará únicamente los niveles extracelulares de PRL pero no de TSH en condiciones estimuladas por TRH.

3.2 Objetivos

3.2.1 General

Evaluar el efecto de la inhibición de la PPII sobre la liberación de PRL y TSH en cultivos primarios de adenohipófisis en condición basal y estimulada con TRH.

3.2.2 Particulares

In vitro

- Determinar el efecto del HcPI y otros inhibidores de la enzima PPII sobre la liberación de PRL y TSH en los cultivos primarios de adenohipófisis en condición basal y estimulada con TRH para determinar su posible uso en experimentos *in vivo*.

In vivo

Determinar el efecto de la inyección intraperitoneal en ratas de un inhibidor de la PPII sobre:

- La actividad específica de la PPII de adenohipófisis
- La liberación de las hormonas prolactina y tirotropina

3.3 Justificación

Con la finalidad de aportar mayor información y comprender mejor el papel de la PPII de adenohipófisis en la comunicación TRHérgica, es necesario determinar el efecto que tiene la inhibición de la enzima PPII. A pesar de que los resultados obtenidos con los

oligodeoxinucleótidos antisentido contra el ARNm de la PPII parecen ser muy contundentes, es necesario corroborarlos mediante otra metodología y así descartar que sean artefacto de dicha técnica. Por otro lado, es necesario evaluar el efecto de algunos de los inhibidores de la PPII sobre los cultivos primarios de adenohipófisis y de esta manera considerarlos para su posible uso *in vivo* en el sistema neuroendócrino y en el SNC.

Capítulo 4. Material y métodos

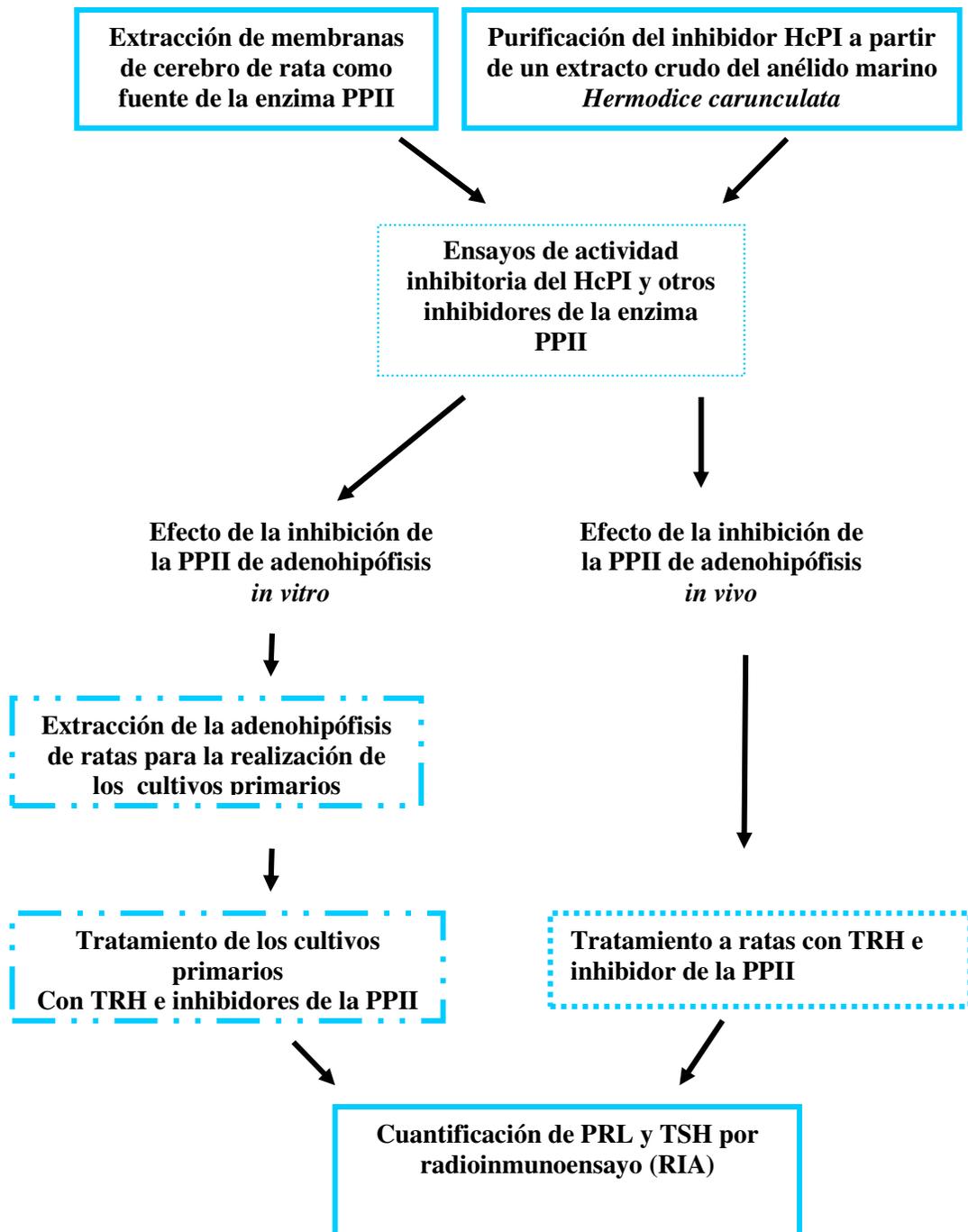


Figura 12.- Diagrama de flujo que representa la estrategia experimental empleada en este trabajo.

4.1 Material biológico

En todos los experimentos se utilizaron ratas hembras ó machos de la cepa Wistar de 60 a 70 días de edad y un peso aproximado de 170 a 280 grs. Se mantuvieron en condiciones controladas de luz-oscuridad (7:00 am-7:00 pm), acceso a agua y alimentos *ad libitum*.

Los ejemplares del anélido marino *Hermodice carunculata*, fueron recolectados en la costa de la Ciudad de la Habana. Fueron secados sobre papel filtro, cortados en pequeños pedazos con tijeras y homogenizados en agua destilada a 4° C. Los homogenados fueron centrifugados a 10 000 g durante 30 minutos a 4° C en una centrífuga Beckman J2 21. El sobrenadante fue filtrado sobre lana de vidrio y se le denominó “extracto crudo”. El extracto fue liofilizado y guardado en congelación hasta su utilización para la purificación del inhibidor.

4.2 Obtención de membranas de cerebro y de adenohipófisis de rata

Membranas de cerebro de rata y de adenohipófisis se usaron como fuente de la enzima PPII. Por un lado, los cerebros previamente extraídos y congelados a -70° C se homogenizaron en buffer A (buffer fosfatos de sodio 50 mM, pH 7.5) en una relación de 10% peso/volumen y centrifugaron a una velocidad de 1949 g por 15 minutos. El sobrenadante se mantuvo a 4 °C, mientras que el precipitado se homogenizó nuevamente en buffer A y se centrifugó a 1949 g por 15 minutos. El sobrenadante de la última centrifugación se mezcló con el primero y se centrifugaron a 17 400 g por 15 minutos. El precipitado se resuspendió en buffer A y se separó en alícuotas de 100 a 150 µL que se guardaron a -70 °C para posteriores ensayos enzimáticos de la PPII. Por otro lado, las adenohipófisis se sonicaron 10 a 15 segundos en buffer A. El homogenado obtenido fue centrifugado a 17 400 g por 20 minutos a 4° C. El sedimento fue resuspendido en 130 µL de buffer A y almacenado a -70° C.

4.3 Cuantificación de la concentración de proteínas

Las proteínas de membranas totales se cuantificaron de acuerdo al método de Lowry (Lowry et al., 1951). Para ello, se realizó una curva estándar con concentraciones

conocidas de albúmina de suero bovino a partir de un stock de 1 mg/mL. Del stock se tomaron los siguientes volúmenes: 0, 10, 20, 40, 60 y 80 μL y se completó el volumen con agua a 100 μL c/u. Por otro lado, se tomaron 100, 50, 25 y 12.5 μL de las muestras de proteína a cuantificar y de igual forma se completó el volumen a 100 μL c/u. Tanto a los tubos de la curva estándar como a las muestras problema se les agregó 100 μL de hidróxido de sodio 1 N más 900 μL de solución E (carbonato de sodio al 1.96 %, sulfato de cobre al 0.01 % y tartrato de potasio al 0.02 %), se agitaron y se dejaron reposar por 10 minutos. Se les agregó 100 μL de solución de Folin 1 N, se agitaron nuevamente y se dejaron reposar de 20 a 30 minutos. Se midió la absorbancia a 750 nanómetros en un espectrofotómetro Beckman DU 50.

4.4 Determinación de la actividad enzimática y de la actividad inhibitoria de la PPII

Se determinó la actividad enzimática de la PPII de membranas de cerebro, de adenohipófisis y de suero mediante un método fluorogénico que consiste en utilizar al sustrato fluorogénico TRH- βNA ó TRH- MCA, así como un exceso de la enzima dipeptidil aminopeptidasa IV (DAPIV; EC 3.4.14.4). El fundamento de este ensayo es el siguiente: la PPII hidroliza al TRH entre el pGlu y la His lo que nos genera el producto pGlu más el His-Pro-BNA ó el His-Pro-MCA. Posteriormente el fluoróforo (βNA ó MCA) es hidrolizado de su enlace con la prolina mediante el empleo de la enzima DAP IV. Esta última hidrólisis genera los productos His-Pro más el fluoróforo libre que puede ser detectado en el espectrofluorómetro (figura 13).

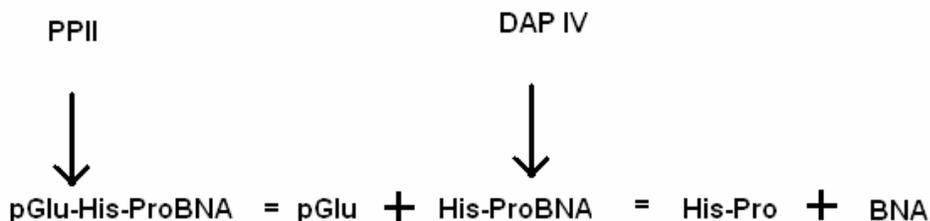


Figura 13.- Esquema que representa el ensayo acoplado de actividad enzimática de la PPII utilizado en los experimentos. La PPII hidroliza al TRH entre el piroglutamil y el histidil generando el producto pGlu más el His-Pro-βNA ó el His-Pro-MCA. La enzima DAPIV hidroliza el enlace entre la prolina y el fluoróforo (BNA ó MCA). Esta última hidrólisis genera los productos His-Pro más el fluoróforo libre que puede ser detectado en el espectrofluorómetro.

La mezcla de reacción en un volumen final de 240 μL de buffer A fue la siguiente:

- 100-150 μg de una preparación de membranas, ó 20 μL de suero de rata.
- 20 uL de DAP IV (2 mU). Una miliunidad de enzima (mU) se define como la cantidad de enzima requerida para convertir un nanomol de sustrato (His-Pro-β-Naftilamida ó el His-Pro-MCA) en producto por minuto.
- 10 μL de bacitracina y N-etilmaleimida conteniendo 1 mM de cada una. La bacitracina y la N-etilmaleimida son inhibidores de la PE y la PPI respectivamente, enzimas citosólicas que pueden degradar al TRH *in vitro*. A pesar de utilizar solo las membranas para el ensayo enzimático, el empleo de estos reactivos aumenta la especificidad del ensayo, ya que las membranas pudieran estar contaminadas con trazas de proteínas citosólicas.

Se completó el volumen a 240 μL con buffer A. Esta mezcla se preincubó durante 10 minutos a 37 °C, se adicionaron 10 μL de sustrato (TRH-β-Naftilamida ó TRH-MCA 10 mM, 400 uM final) y se tomaron alícuotas de 50 μL a diferentes tiempos. La reacción se detuvo con un volumen de 50 μL de metanol frío al 100 % y posteriormente se agregaron 300 μL de metanol al 50 % en buffer A. Las alícuotas se centrifugaron a 10 000 g por 5 minutos. El sobrenadante se utilizó para medir la fluorescencia en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS 508 Shelton, con los parámetros: 355 nm de excitación y 410 nm de emisión. Para realizar las lecturas de fluorescencia fue necesario preparar una curva estandar de concentraciones conocidas de βNA ó MCA para calibrar el espectrofluorómetro. Se preparó el blanco que contenía solo buffer A y metanol en una

relación 1:1 así como concentraciones de 50, 100 y 200 picomolas de β NA ó MCA. Para determinar el efecto de los inhibidores de la PPII se realizó el mismo procedimiento para determinar la actividad enzimática de la PPII arriba mencionado, sin embargo, la mezcla de reacción se preincubó con una concentración del inhibidor a utilizar.

4.5 Purificación del inhibidor HcPI

4.5.1 Pasos iniciales de purificación

Se pesaron 200 mg del extracto liofilizado del anélido marino *Hermodice carunculata* y se resuspendieron en 5 mL de agua. Posteriormente se adicionó 0.5 mL de ácido tricloroacético al 25 %, lo cual tiene como objetivo precipitar contaminantes proteicos inestables en medio ácido. Se agitó por 10 minutos a 4 °C, luego de lo cual se centrifugó a 12 000 g durante 15 minutos a 4° C. El precipitado fue desechado y se ajustó el pH del sobrenadante entre 7.5-8 con NaOH 1 M; al resultado de este tratamiento le denominamos “extracto inicial”. Este extracto se guardó a -20° C y al mismo tiempo se realizó un ensayo de actividad inhibitoria (50 μ L permiten hacer una medición de actividad). Una vez corroborada la actividad inhibitoria, el “extracto inicial” se dializó a 4° C en agitación constante con una membrana de diálisis de corte de 500 Da en 1 L de agua, luego se hizo un cambio de agua a las dos horas y un ultimo cambio a las tres horas en 2 L de buffer A en el que se dejo toda la noche.

4.5.2 Cromatografía de intercambio aniónico

Una tercera parte del contenido del dializado se aplicó a una cromatografía de intercambio aniónico mediante el empleo de una matriz de DEAE-Sephacel de 2 x 7 cm de resina en una columna de 2 x 10 cm, equilibrada con bufer A. La elución se realizó con buffer B (buffer fosfatos de sodio 50 mM, pH 7.5, NaCl 1M). Se colectaron fracciones de 1.3 mL en un colector LKB, a las cuales se les midió la absorbancia a 215 y 280 nm y la conductancia. Con base en lo reportado por Pascual y colaboradores (2004), se midió solo la actividad inhibitoria de PPII de las fracciones que eluyeron antes del inicio del gradiente salino (100-150 μ L permiten hacer una medición de actividad inhibitoria).

4.5.3 Cromatografía de exclusión molecular

Las fracciones de la cromatografía de intercambio aniónico que contenían actividad inhibitoria se juntaron y se aplicaron a una cromatografía de exclusión molecular mediante el empleo de una matriz de Sephadex G-25 de 2.7 x 32 cm de resina, en una columna de 2.7 x 47 cm, equilibrada con buffer A. Se colectaron fracciones de 1.3 mL y se detectó la absorbancia a 215 y 280 nm. Con base en reportado por Pascual y colaboradores (2004), se midió la actividad inhibitoria de las fracciones que se encontraban en el pico de absorbancia a 215 nm (100-150 μ L permiten hacer una medición de actividad inhibitoria). Las fracciones que contenían la actividad inhibitoria se juntaron, se liofilizaron y se guardaron a -20° C.

4.5.4 Cromatografía líquida de alta presión en fase reversa

Para corroborar la pureza del producto purificado, se realizó una cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC (por sus siglas en ingles: Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography)) mediante el empleo de una columna C-18. Para ello, se resuspendió el liofilizado obtenido de la cromatografía de exclusión molecular en 2.5 mL de agua y se paso por un filtro de 0.2 μ m. Posteriormente se aplicaron solamente 5 μ L del “filtrado” en una columna de fase reversa C-18 a una velocidad de flujo de 0.8 mL/min empleando un gradiente lineal de 0-15 % de acetonitrilo durante 15 minutos (para el resto del programa: 15-100 % acetonitrilo en 5 min; 100 % acetonitrilo por 5 min; 100-0 % acetonitrilo en 5 min). Se colectaron las fracciones que mostraban picos de absorbancia a 215 nm, se secaron en un evaporador Savant y se guardaron a -20° C. Se midió la actividad inhibitoria de PPII de las fracciones eluidas mediante la resuspensión de c/u en 200 μ L de agua (usando 5 μ L para el ensayo enzimático de PPII). Puesto que solo una de las fracciones tenia actividad inhibitoria de PPII, se purificó el resto del “filtrado” por RP-HPLC y de esta manera obtener la fracción que contenía actividad inhibitoria de PPII, es decir, el HcPI. Una vez hecho esto, nuevamente se liofilizó y se guardó a -20° C. Por último, se resuspendió en 200 μ L de agua y se midió el porcentaje de inhibición de PPII utilizando 11 μ L de este resuspendido.

4.6 Cultivos primarios de adenohipófisis

Los cultivos primarios de adenohipófisis se cultivaron de la siguiente manera: se extrajeron 15 glándulas pituitarias de ratas hembra de la cepa wistar de 60 días de edad a las que se les separó la neurohipófisis. Las adenohipófisis se lavaron con solución A (DMEM suplementado con NaHCO₃ al 0.37 %, glucosa al 0.25 % y BSA al 3 %), se cortaron en fragmentos pequeños, se volvieron a lavar con solución A y se incubaron 18 minutos a 37 °C en 3 mL de solución A que contenía 5 mg/mL de tripsina. A continuación se agregaron 4.5 mL de solución A que contenía 12 µg de DNAsa y se incubaron por 1 minuto a 37 °C. Una vez que el tejido sedimentó, el sobrenadante se eliminó y las adenohipófisis se incubaron en 3 mL de solución A, que contenía 1.5 mg de inhibidor de tripsina. Posteriormente se desechó el sobrenadante y el tejido se incubó en 6 mL de solución B1 (0.74 mg/mL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en solución C, ver bajo) por 8 minutos a 37° C y luego durante 15 minutos con B2 (0.37 mg/mL de EDTA en solución C). Posterior a esto, las células se lavaron tres veces con solución C, se dispersaron mecánicamente, se resuspendieron en 25.5 mL de solución A que contenía 68 µg de DNAsa y se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos. Se sembraron 1x10⁶ células por pozo sobre placas de cultivo de 35 mm de cuatro pozos. Las células se cultivaron en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10 %, vitaminas (1 % v/v), penicilina (50 U/ml), estreptomycin (50 mg/mL), fungisona (125 ng/mL), glutamina (2 mM), glucosa (14 mM) y 3,3',5',-triiodotironina (T3, 10⁻⁸ M). Después de dos días de incubación a 37 °C en una atmósfera saturada de agua al 95% de aire y 5% de CO₂ el medio fue cambiado y se volvieron a guardar en las mismas condiciones hasta el día del tratamiento.

- La solución C esta compuesta de los siguientes materiales:

- | | |
|--|---------------------------------------|
| - 6.8 g/L de NaCl | - 2.8 g/L de albúmina de suero bovino |
| - 0.4 g/L de KCl | - 2.2 g/L de NaHCO ₃ |
| - 0.14 g/L de NaH ₂ PO ₄ | - 34 g/L de penicilina |
| - 1g/L de glucosa | - 50 g/L de estreptomycin |
| - 0.01 g/L de rojo fenol | |

4.6.1 Tratamiento de los cultivos primarios

Se probó el efecto de los inhibidores sobre la liberación de PRL y TSH en presencia y ausencia de TRH. Para ello, las células de los cultivos primarios se lavaron con DMEM no suplementado e inmediatamente se hicieron los grupos experimentales y el grupo control. Se añadió en cada pozo lo siguiente: 500 μL de DMEM, a este plato se le denominó grupo control; 500 μL de DMEM conteniendo TRH 10^{-8} M, a este plato se le denominó grupo estimulado; 500 μL de DMEM más la concentración del inhibidor a estudiar, a este grupo se le denominó grupo con inhibidor; y 500 μL de DMEM conteniendo TRH 10^{-8} M más la concentración del inhibidor a estudiar, a este plato se le denominó grupo con TRH más inhibidor. Los pozos se incubaron a 37°C en una atmósfera saturada de agua al 95% de aire y 5% de CO_2 y finalmente se tomaron alícuotas de 50-70 μL a los tiempos 15, 30, 60, 180 y 360 minutos y se guardaron a -20°C para la posterior cuantificación de prolactina y/o tirotrópina por la técnica de radioinmunoensayo.

4.7 Método de iodinación de las hormonas PRL y TSH por el método de cloramina T

El método de iodinación de las hormonas PRL y TSH tiene como objetivo incorporar un ^{125}I a moléculas conteniendo residuos tirosil y en menor grado en residuos histidil, y de esta manera obtener la hormona iodada que se utiliza en el método de radioinmunoensayo (RIA). El principio consiste en que la cloramina T oxida al ^{125}I confiriéndole una carga positiva permitiendo que se incorpore a los anillos aromáticos de los residuos tirosil. Poco tiempo después se adiciona metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), el cual reduce al ^{125}I deteniendo la reacción. La reacción de iodinación para la hormona PRL se lleva a cabo de la siguiente manera:

- 50 μL de PRL (5 μg de PRL en 0.1 M NaHCO_3)
- + 50 μL de buffer A
- + Na^{125}I (1 mCi ^{125}I) en 10 μL de buffer A
- + 20 μL de cloramina T (0.01 gr en 10 mL de buffer A)

Se mezclan las soluciones anteriores y se dejan reaccionar durante 30 segundos como máximo (la adición de cloramina T corresponde al tiempo 0). La reacción se detiene con:

- 10 μL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (0.013 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ en 650 μL de buffer A)
- + 50 μL de buffer fosfatos de sodio 50 mM, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% BSA grado RIA, 50 mM EDTA (buffer de RIA)

Posteriormente la mezcla de reacción fue aplicada a una columna de exclusión molecular Sephadex G-50 de 22 x 0.8 cm, equilibrada con buffer de RIA. Se colectaron fracciones de 500 μL y se toman 5 μL de cada fracción para el conteo de la emisión por radiación gamma en un aparato de conteo de radiaciones gamma LKB Wallac 1275 Minigamma. Al determinar las cuentas por minuto (cpm) se obtuvieron dos picos de radiación, el primero conteniendo la ^{125}I -PRL y el segundo conteniendo Na^{125}I . Se hizo un conjunto del primer pico de radioactividad y se contó cuantas cpm habían en 5 μL para posteriormente estimar el volumen a utilizar en el RIA.

Reacción de iodación para la TSH

La mezcla de reacción fue la siguiente:

- 2 μg de TSH en 20 μL de buffer A
- + 20 μL de fosfatos de sodio 500 mM, pH 7.5
- + 1 mCi de ^{125}I en 10 μL de buffer de RIA
- + 10 μg de cloramina T en 10 μL de buffer A

Se mezclan las soluciones anteriores y se dejan reaccionar 30 segundos como máximo (la adición de cloramina T corresponde al tiempo 0). La reacción se detiene con:

- 13 mg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ en 650 μL de buffer de RIA
- + 50 μL de buffer de RIA

La purificación de la ^{125}I -TSH se realizó de la misma manera que en el caso de la ^{125}I -PRL.

4.8 Determinación de la concentración de PRL y TSH mediante la técnica de radioinmunoensayo

Los niveles de hormona liberada en el medio extracelular de los cultivos primarios y del suero de las ratas se cuantificaron mediante la técnica de RIA. Este ensayo se basa en la competencia de unión a un anticuerpo (Ab) entre la hormona presente en las muestras y la hormona marcada con iodo radioactivo (^{125}I). La técnica de RIA para PRL y para TSH se resume en las tablas 2 y 3. Para ambos casos, al final de la incubación, los complejos antígeno-anticuerpo son precipitados y las cpm del precipitado se contaron en un aparato de conteo de radiaciones gamma LKC Wallac 1275 Minigamma. Se transformaron los valores de cpm de las curvas estándar y de las muestras problema a nanogramos utilizando el Software “enri”.

4.9 Tratamiento *in vivo* de ratas macho de la cepa Wistar con el inhibidor pGlu-Asn-Pro-Tyr-Trp-Trp-7-amido-4-MCA (P.I.)

De manera paralela a los estudios *in vitro* con el P.I., y en ausencia de inhibidor HcPI puro para emplear en este estudio *in vivo*, decidimos emplear el inhibidor P.I. para los estudios de inhibición de la PPII *in vivo*. Para cada tratamiento se utilizaron 6 organismos. El tratamiento fue via intraperitoneal: Se realizó una primera inyección a todas las ratas, al primer grupo se le inyectó el P.I. (20 $\mu\text{g/g}$ de peso), mientras que al segundo grupo, así como al grupo control se les inyectó únicamente el vehículo (dimetil sulfóxido anhídrido [DMSO] al 5 %). Una vez transcurridos 15-20 minutos después de la primera inyección se inyectó TRH (1 $\mu\text{g/kg}$ de peso) a los dos grupos experimentales mientras que al grupo control se le inyectó solo solución salina (NaCl al 0.9 %). 15 minutos después, todas las ratas fueron sacrificadas por decapitación. Las adenohipófisis y la sangre se guardaron a -70° C para los posteriores ensayos enzimáticos y la cuantificación de prolactina y/o tirotropina.

4.10 Análisis estadístico

Los datos representan la media \pm el valor de error estandar (ES). Se determinó la significancia estadística usando el análisis de varianza ANOVA, seguido de una prueba de Fisher. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P < 0.05$.

Tabla 2.- Protocolo del RIA para prolactina

RIA de prolactina	Día 1	Día 2	Día 3
Totales (T)= Control interno que permite verificar el número de cpm en 100 uL		Se añaden 10 000 cpm de ¹²⁵ I-PRL en 100 µL de buffer de RIA* y se deja incubar de 18 a 24 h.	Solo se cuentan las cpm
Unión inespecífica (NSB) = Control interno que permite determinar la unión inespecífica de la ¹²⁵ I-PRL en ausencia de anticuerpo (NSB)	Se añaden 300 µL de buffer de RIA*.	Se añaden 10 000 cpm de ¹²⁵ I-PRL en 100 µL de buffer de RIA* y se deja incubar de 18 a 24 h.	Se añaden 100 µL de γ-globulina*, se incuban dos horas, se añade 500 µL de PEG*, se centrifugan a 4 000 rpm por 30 minutos y se aspira el sobrenadante. Se cuantifican las cpm del precipitado.
Bo = Control interno que permite determinar la unión entre la ¹²⁵ I-PRL y el anticuerpo en ausencia de PRL	Se añaden 200 µL de buffer de RIA* mas el Ab contra PRL en una dilución 1:105 000 y se deja incubar de 18 a 24 h.	Se añaden 10 000 cpm de ¹²⁵ I-PRL en 100 µL de buffer de RIA* y se deja incubar de 18 a 24 h.	Se añaden 100 µL de γ-globulina*, se incuban dos horas, se añade 500 uL de PEG*, se centrifugan a 4 000 rpm por 30 minutos y se aspira el sobrenadante. Se cuantifican las cpm del precipitado.
Preparación de curva estandar	Curva estándar que en 200 µL contiene concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2,000 y 4,000 picogramos de prolactina. Se añade el Ab contra PRL en una dilución 1:105 000 y se deja incubar de 18 a 24 h.	Se añaden 10 000 cpm de ¹²⁵ I-PRL en 100 µL de buffer de RIA* y se deja incubar de 18 a 24 h.	Se añaden 100 µL de γ-globulina*, se incuban dos horas, se añade 500 uL de PEG*, se centrifugan a 4 000 rpm por 30 minutos y se aspira el sobrenadante. Se cuantifican las cpm del precipitado.
Muestras	Se añade un volumen de la muestra de cultivo o de suero y se completa el volumen con 200 µL de buffer de RIA* mas el Ab contra PRL en una dilución 1:105 000 y se deja incubar de 18 a 24 h.	Se añaden 10 000 cpm de ¹²⁵ I-PRL en 100 µL de buffer de RIA* y se deja incubar de 18 a 24 h.	Se añaden 100 µL de γ-globulina*, se incuban dos horas, se añade 500 µL de PEG*, se centrifugan a 4 000 rpm por 30 minutos y se aspira el sobrenadante. Se cuantifican las cpm del precipitado.

-**Buffer de RIA***= (buffer fosfatos de sodio 50 mM, pH 7.5, 150mM NaCl, 1% BSA grado RIA, 50mM EDTA).

- **γ-globulina***= Gamma Globulina Bovina al 0.05 % en PBS (buffer fosfatos de sodio 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5). Este reactivo reconoce al complejo anticuerpo-¹²⁵I-PRL

- **PEG***= Polietilenglicol al 20 % en PBS. Este reactivo separa al complejo γ-globulina- anticuerpo-¹²⁵I-PRL.

Tabla 3.- Protocolo del RIA para tirotopina

<i>RIA de tirotopina</i>	Día 1	Día 2	Día 3
Totales (T)= Control interno que permite verificar el numero de cpm en 100 µL		Se añaden 10 000 cpm de ¹²⁵ I-TSH en 100 µL de buffer de RIA* y se deja incubar de 18 a 24 h.	Solo se cuentan las cpm
Unión inespecífica (NSB) = Control interno que permite determinar la unión inespecífica de la ¹²⁵ I-TSH en ausencia de anticuerpo (NSB)	Se añaden 300 µL de buffer de RIA*.	Se añaden 10 000 cpm de ¹²⁵ I-TSH en 100 µL de buffer de RIA* y se deja incubar de 18 a 24 h.	Se añade 100 µL de inmunoglobulina G* mas 100 µL de suero normal de conejo*, se incuban dos horas, se añade 1 mL de PEG*, se centrifugan a 4 000 rpm por 30 minutos y se aspira el sobrenadante. Se cuantifican las cpm del precipitado.
Bo = Control interno que permite determinar la unión entre la ¹²⁵ I-TSH y el anticuerpo en ausencia de TSH	Se añaden 200 µL de buffer de RIA* mas el Ab contra TSH en una dilución 1:375 000 y se deja incubar de 18 a 24 h.	Se añaden 10 000 cpm de ¹²⁵ I-TSH en 100 µL de buffer de RIA* y se deja incubar de 18 a 24 h.	Se añade 100 µL de inmunoglobulina G* mas 100 µL de suero normal de conejo*, se incuban dos horas, se añade 1 mL de PEG*, se centrifugan a 4 000 rpm por 30 minutos y se aspira el sobrenadante. Se cuantifican las cpm del precipitado.
Preparación de curva estandar	Curva estándar que en 200 µL contiene concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2,000 y 4,000 picogramos de TSH. Se añade el Ab contra TSH en una dilución 1:375 000 y se deja incubar de 18 a 24 h.	Se añaden 10 000 cpm de ¹²⁵ I-TSH en 100 µL de buffer de RIA* y se deja incubar de 18 a 24 h.	Se añade 100 µL de inmunoglobulina G* mas 100 µL de suero normal de conejo*, se incuban dos horas, se añade 1 mL de PEG*, se centrifugan a 4 000 rpm por 30 minutos y se aspira el sobrenadante. Se cuantifican las cpm del precipitado.
Muestras	Se añade un volumen de la muestra de cultivo o de suero y se completa el volumen a 200 µL con buffer de RIA* mas el Ab contra TSH en una dilución 1:375 000 y se deja incubar de 18 a 24 h.	Se añaden 10 000 cpm de ¹²⁵ I-TSH en 100 µL de buffer de RIA* y se deja incubar de 18 a 24 h.	Se añade 100 µL de inmunoglobulina G* mas 100 µL de suero normal de conejo*, se incuban dos horas, se añade 1 mL de PEG*, se centrifugan a 4 000 rpm por 30 minutos y se aspira el sobrenadante. Se cuantifican las cpm del precipitado.

- **Inmunoglobulina G***= Inmunoglobulina G de conejo al 2.5 % en PBS (buffer fosfatos de sodio 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5). Este reactivo reconoce al complejo anticuerpo-¹²⁵I-TSH.

- **Suero normal de conejo***= Suero normal de conejo al 2 % en PBS. Este reactivo reconoce al complejo anticuerpo-¹²⁵I-TSH.

- **PEG***= Polietilenglicol al 4 % en PBS. Este reactivo separa al complejo Inmunoglobulina G-Suero normal de conejo-anticuerpo-¹²⁵I-TSH.

Capítulo 5. Resultados

5.1 Purificación del HcPI a partir de un extracto crudo de *Hermodice carunculata*

5.1.1 Tratamiento con TCA

Para purificar este inhibidor, se partió del extracto liofilizado del anélido *Hermodice carunculata*. La figura 14 muestra el efecto del “extracto inicial” sobre la actividad enzimática de la PPII de membranas de cerebro de rata. Se puede observar en la figura que la actividad enzimática del grupo experimental es mucho menor que la del grupo control, lo cual muestra que este extracto contenía actividad inhibitoria de PPII. En esta etapa de purificación los valores de inhibición son mayores al 50 %.

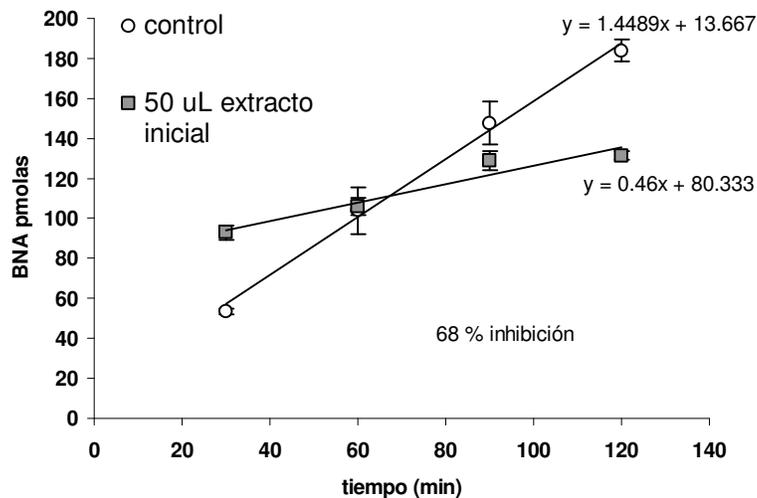


Figura 14.- Efecto del extracto inicial del gusano de fuego sobre la actividad enzimática de PPII de membranas de cerebro de rata. La enzima fue preincubada 10 minutos con 50 uL del extracto inicial, en buffer A en presencia de bacitracina y N etilmaleimida y DAP IV a 37° C antes de la adición de TRH-βNA. El ensayo se realizó por triplicado y se representa la media ± ES. Círculos blancos: actividad de la enzima en el tiempo, en ausencia de extracto inicial; cuadros grises: actividad de la enzima en el tiempo, en presencia de extracto inicial.

5.1.2 Cromatografía de intercambio aniónico

Dado que el extracto inicial tenía actividad inhibitoria de PPII, se llevaron a cabo los siguientes pasos de purificación. El extracto inicial se dializó y posteriormente se aplicó a una cromatografía de intercambio aniónico. La figura 15 muestra el patrón de elución de las fracciones obtenidas mediante esta cromatografía. Pascual y colaboradores (2004) reportan que las fracciones con actividad inhibitoria generalmente se encuentran antes de que comience a eluir el gradiente salino, por lo que se midió la actividad inhibitoria de PPII de las fracciones 13 a la 25. La figura 16 muestra claramente que las fracciones con actividad inhibitoria se encontraban entre las fracciones 15 y 21.

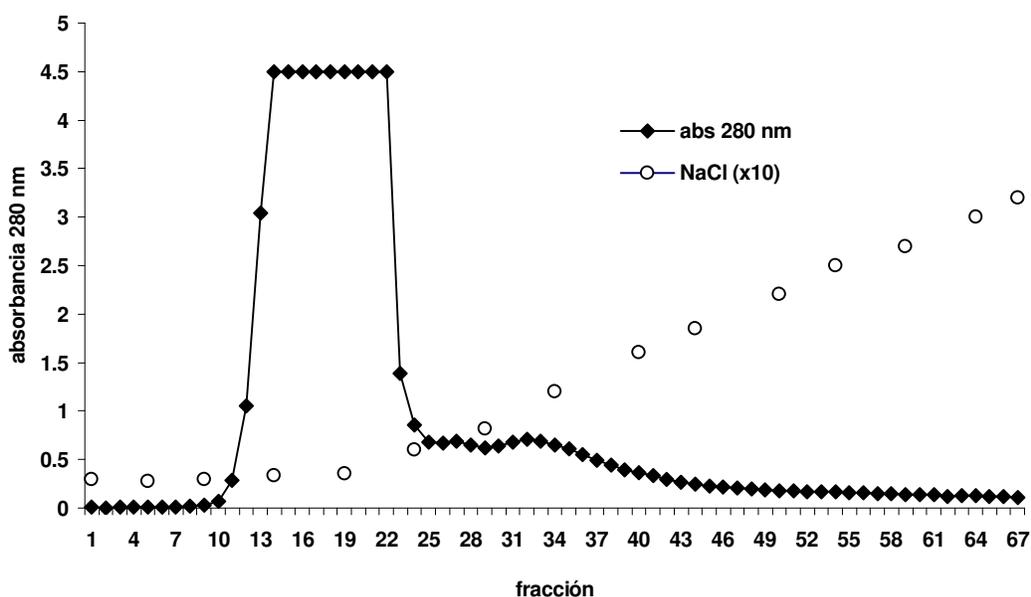


Figura 15.- Cromatografía de intercambio aniónico del extracto del gusano de fuego. La cromatografía se desarrolló en una columna de DEAE-Sephacel de 2 x 7 cm de resina en una columna de 2 x 10 cm, equilibrada con buffer A. La elución se llevó a cabo mediante un gradiente salino lineal (NaCl 1 mol/L) en el mismo buffer. Se colectaron fracciones de 1.3 mL. Rombo negro: absorbancia a 280 nanómetros (nm); círculo blanco: concentración de sal. Varias aplicaciones independientes a la columna dan como resultado, esencialmente, el mismo perfil cromatográfico.

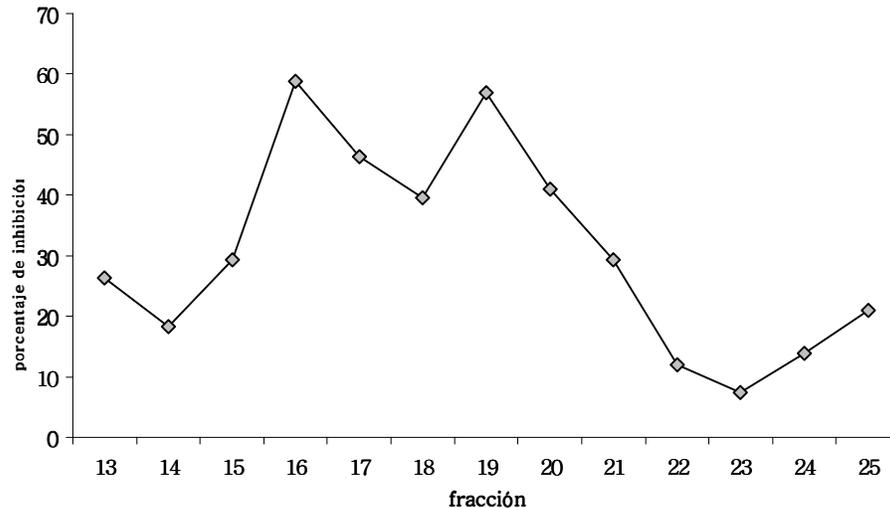


Figura 16.- *Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de PPII en las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico. La enzima fue preincubada 10 minutos con 100 μ L de las fracciones 13 a 25 eluidas por cromatografía de intercambio aniónico, en buffer A en presencia de bacitracina y N-etilmaleimida y DAP IV a 37 ° C antes de la adición de TRH- β NA.*

5.1.3 Cromatografía de exclusión molecular

Las fracciones que contenían actividad inhibitoria obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico se unieron y se aplicaron a una cromatografía de exclusión molecular. La figura 17 muestra el patrón de elución de las fracciones obtenidas por esta cromatografía. Con un total de 125 fracciones eluidas, la figura 18 muestra que la actividad inhibitoria estaba presente en las fracciones 57 a la 75.

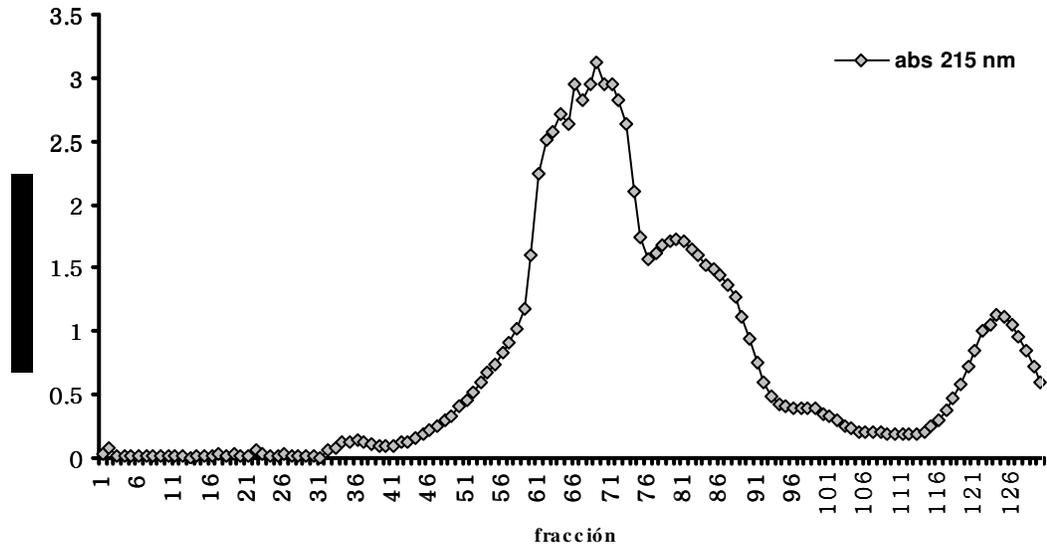


Figura 17.- Cromatografía de exclusión molecular de las fracciones que contenían actividad inhibitoria en la cromatografía de intercambio aniónico. La cromatografía se desarrolló en una columna de Shephadex G-25 de 2.7 x 32 cm, en una columna de 2.7 x 47 cm, equilibrada con buffer A. Se colectaron fracciones de 1.3 mL y se midió la absorbancia a 215 nm. Varias aplicaciones independientes a la columna dan como resultado, esencialmente, el mismo perfil cromatográfico.

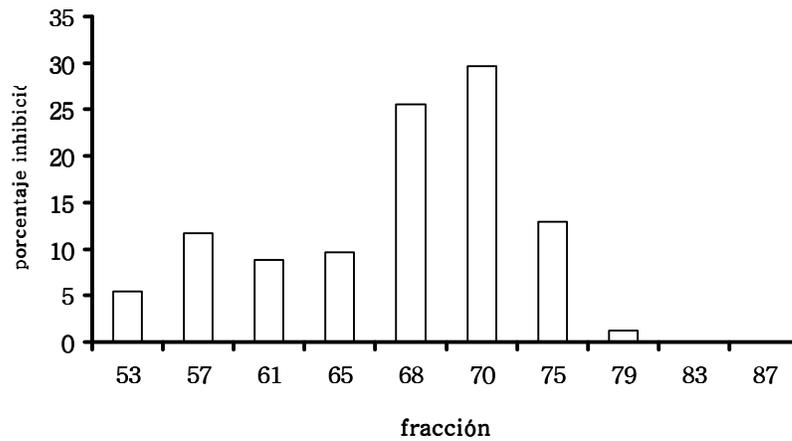


Figura 18.- Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de PPII en las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular. La enzima fue preincubada 10 minutos con 100 μ L de varias fracciones comprendidas de la 53 a la 87 eluidas por cromatografía de exclusión molecular, en presencia de bacitracina y N.etilmaleimida y DAP IV a 37° C antes de la adición de TRH- β NA.

5.1.4 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

Para corroborar la pureza del inhibidor de la PPII, se realizó una RP-HPLC de la fracción activa obtenida de la cromatografía de exclusión molecular. El perfil obtenido se muestra en la figura 19, donde se observan tres componentes que eluyen poco después de los dos minutos. Debido a que el inhibidor no estaba puro (esperábamos eluyera solo un componente) se intentó elucidar cual de estos tenía actividad inhibitoria y de esta manera purificar solamente este componente. Para ello, se probó cual de ellos tenía actividad inhibitoria de PPII. La figura 20 muestra el porcentaje de inhibición de los tres componentes obtenidos. Se observa que la primera fracción es la que contenía actividad inhibitoria, por lo que todo el resto de la muestra obtenida mediante la cromatografía de exclusión molecular se purificó mediante RP-HPLC, colectando solo la primera fracción (donde estaba el HcPI). Al probar la actividad inhibitoria de toda la muestra purificada, se encontró un decremento en la actividad inhibitoria, pues como lo muestra la figura 21, solo se recobro 9.5 % de inhibición (anteriormente 5 uL inhibieron 24 % (figura 20)). Nosotros creemos que la pérdida de actividad inhibitoria del HcPI esta relacionada con su inestabilidad como molécula; sin embargo no podemos precisar esta afirmación puesto que no conocemos su estructura. Por ello, decidimos volver a purificar el inhibidor de PPII bajo las mismas condiciones a las mencionadas en material y métodos, pero a partir de un extracto del gusano *Hermodice carunculata* diferente al empleado inicialmente. En este caso se obtuvo un inhibidor puro y más activo que el anterior (no mostrado); este inhibidor se empleó en los tratamientos de los cultivos primarios de adenohipófisis que se describen en la siguiente sección.

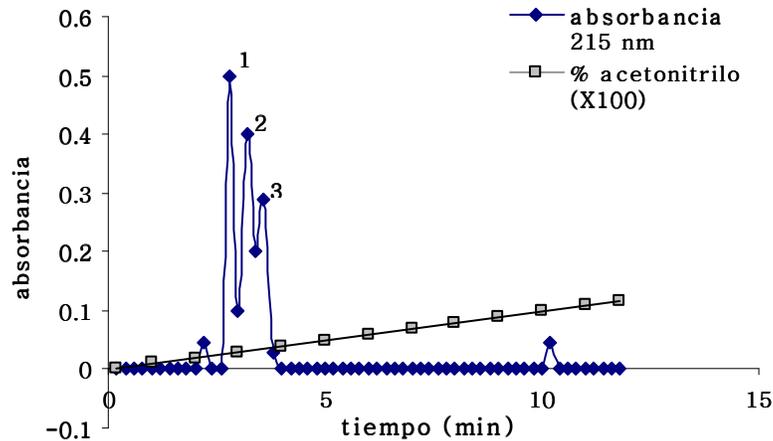


Figura 19.- Cromatografía de fase reversa de las fracciones obtenidas por cromatografía en gel. Las fracciones con actividad inhibitoria y obtenidas por cromatografía de exclusión molecular se juntaron y se liofilizaron, posteriormente este liofilizado se resuspendió en 2.5 mL de agua y de esta manera se aplicaron solo 5 μ L a la cromatografía de fase reversa. La cromatografía se desarrolló en una columna C-18 (200 x 7.5 mm) empleando un gradiente lineal de 0-15% de acetonitrilo durante 15 minutos. Se colectaron las fracciones que detectaban picos de absorbancia a 215 nm. Rombos oscuros: absorbancia a 215 nm; cuadros grises; % de acetonitrilo.

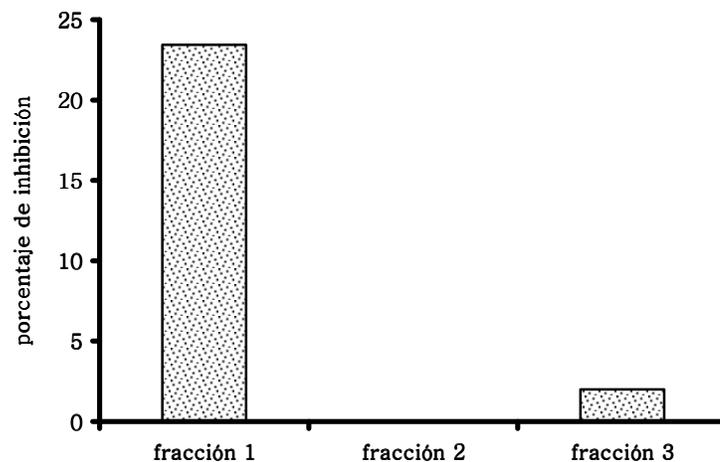


Figura 20.- Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de PPII de las fracciones obtenidas por cromatografía de fase reversa. Se evaluó la actividad inhibitoria de PPII de las tres fracciones obtenidas mediante cromatografía en fase reversa. La enzima fue preincubada 10 minutos con 5 μ L de cada una de las fracciones eluidas por cromatografía en fase reversa en presencia de bacitracina y N etilmaleimida y DAP IV a 37° C antes de la adición de TRH- β NA.

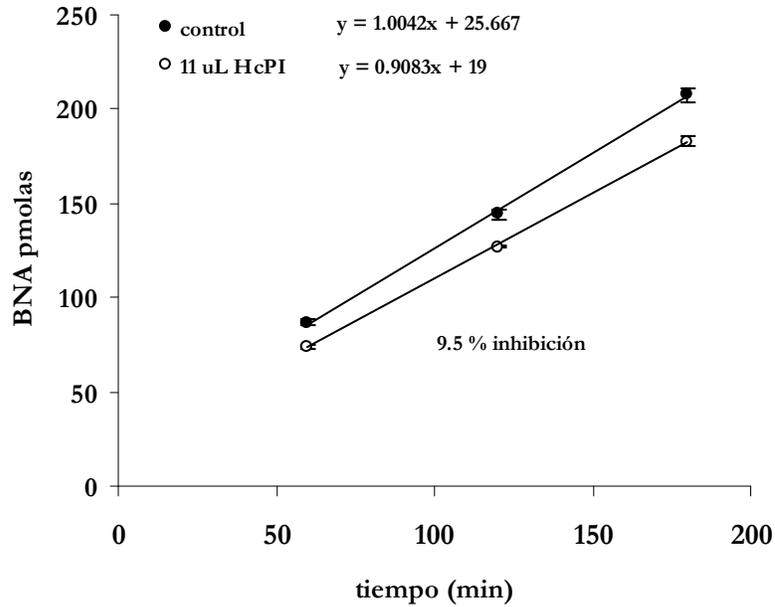


Figura 21.- Efecto del HcPI purificado mediante cromatografía en fase reversa sobre la actividad enzimática de PPII. La enzima fue preincubada 10 minutos con 11 μ L de HcPI en presencia de bacitracina y N etilmaleimida y DAP IV a 37° C antes de la adición de TRH- β NA. El ensayo se realizó por triplicado y se representa la media \pm ES. Círculos negros: actividad de la enzima en el tiempo, en ausencia de HcPI; círculos blancos: actividad de la enzima en el tiempo, en presencia de HcPI.

5.2 Efecto del HcPI sobre la liberación de PRL y TSH en cultivos primarios de adenohipófisis

La figura 22 muestra el efecto del HcPI obtenido en la segunda purificación, en conjunto con TRH 10^{-8} M, sobre la liberación de PRL en cultivos primarios de adenohipófisis a distintos tiempos. En estos resultados se observa una mayor liberación de PRL desde los 15 minutos y hasta las tres horas en el grupo incubado con TRH y HcPI (barra verde) respecto al grupo incubado solo con TRH (barra negra), reflejando una mayor señalización de la molécula de TRH en este grupo, probablemente por una menor degradación del péptido en el espacio extracelular. Al comparar estos grupos, observamos que el grupo incubado con HcPI y TRH incrementa la liberación de PRL en 98 %, 27 %, 88 %, y 22 % a los 15, 30, 60 y 3 horas respectivamente. El análisis estadístico solo mostró diferencias significativas a los 15 y a los 60 minutos (figura 22). Estos datos corroboran los resultados obtenidos

previamente con el inhibidor HcPI mencionado en los antecedentes de este trabajo (figura 11), y al mismo tiempo demuestran el papel de la PPII en la degradación del TRH en el espacio extracelular de la adenohipófisis.

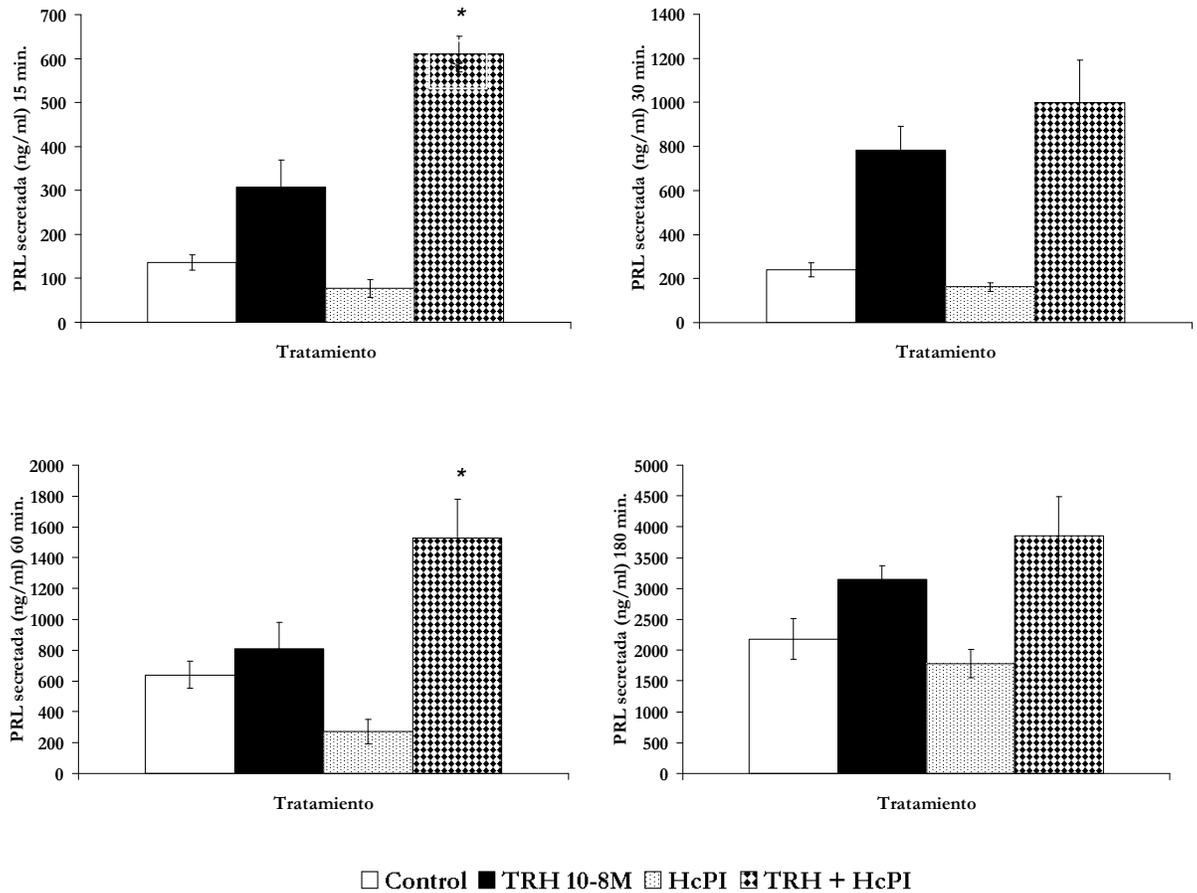


Figura 22.- Efecto del HcPI en presencia de TRH, sobre la liberación de PRL en cultivos primarios de adenohipófisis. Se inoculó en los grupos solo DMEM (barra blanca); DMEM conteniendo TRH 10^{-8} M (barra negra); DMEM conteniendo 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HcPI (barra punteada); y TRH más HcPI (barra con rombos). Se tomaron alícuotas del medio de cultivo a los tiempos 15, 30, 60 180 y 360 minutos para la posterior determinación de la concentración de PRL por el método de RIA. Se indica en cada caso la media de los valores de la concentración de PRL para cada tratamiento \pm ES (n=4). (*) Significancia estadística entre el grupo estimulado con TRH y el grupo incubado con TRH más inhibidor.

Ya que en el experimento se observaron cambios en la liberación de PRL en el grupo incubado con TRH más inhibitor, se decidió determinar el efecto del HcPI sobre la liberación de TSH, hormona que también se libera en respuesta al TRH. Al comparar el grupo incubado con TRH (barra negra) contra el grupo incubado con HcPI y TRH (barra con cuadros) se encontró que se incrementa la liberación de TSH en 17 %, 20 %, 39 %, y 134 % a los 15, 30, 60 y 180 minutos respectivamente. El análisis estadístico solo mostró diferencias significativas a los 180 minutos (figura 23). Podemos concluir que el efecto de la inhibición de la PPII de adenohipófisis mediante HcPI potencia la liberación de PRL y solo en menor grado la liberación de TSH, corroborando los resultados previamente encontrados mediante la supresión de la expresión de la PPII de adenohipófisis (Cruz et al., no publicado).

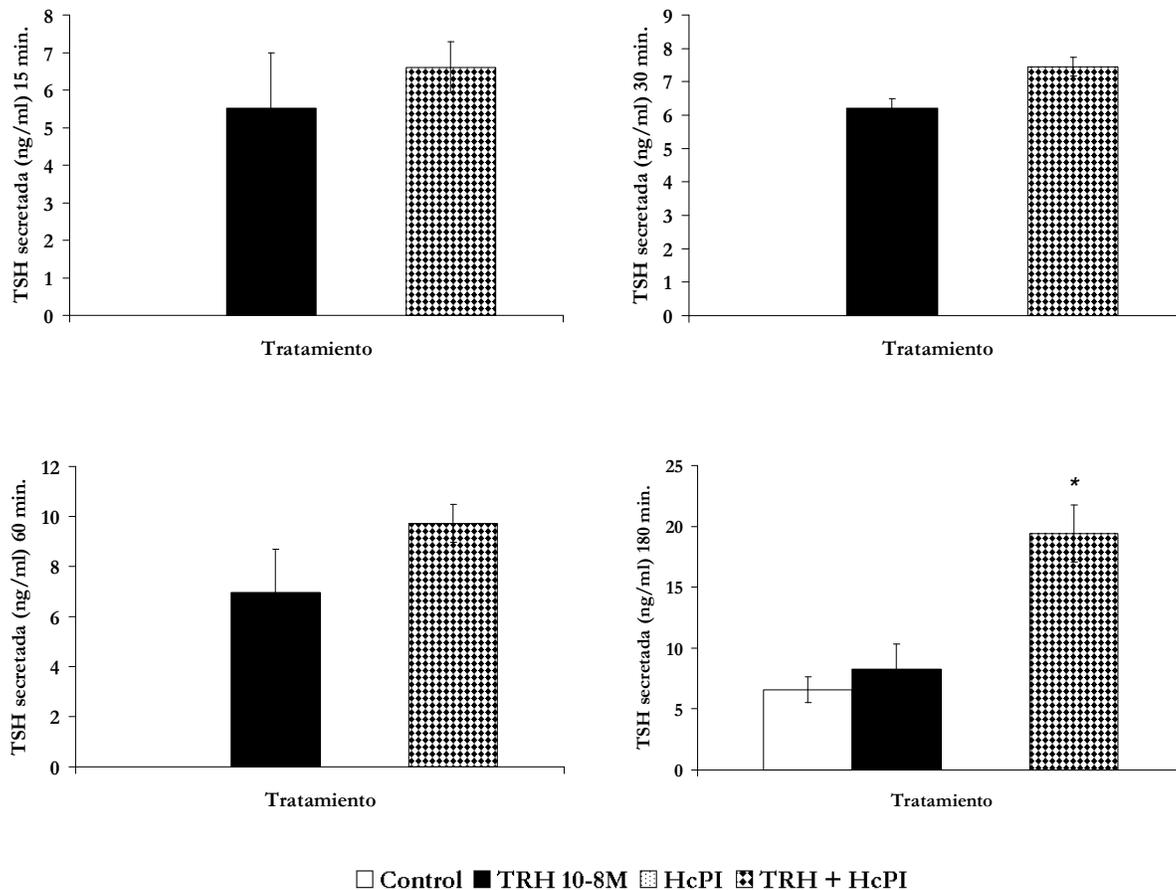


Figura 23.- Efecto del HcPI en presencia de TRH, sobre la liberación de TSH en cultivos primarios de adenohipófisis. Se inoculó en los grupos solo DMEM (barra blanca); DMEM conteniendo TRH 10-8 M (barra negra); DMEM conteniendo 0.025 μ /mL de HcPI (barra punteada); y TRH más HcPI (barra con rombos). Se tomaron alícuotas del medio de cultivo a los tiempos 15, 30, 60 180 y 360 minutos para la posterior determinación de la concentración de TSH por el método de RIA. Se indica en cada caso la media de los valores de la concentración de TSH para cada tratamiento \pm ES (n=4). nd=no detectado. (*) Significancia estadística entre el grupo estimulado con TRH y el grupo incubado con TRH más inhibidor.

5.3 Efecto del CPHNA sobre la actividad enzimática de la PPII de membranas de cerebro y sobre la liberación de PRL y TSH en cultivos primarios de adenohipófisis

De manera paralela a los estudios con el inhibidor HcPI en el cultivo primario de adenohipófisis, se decidió emplear otros inhibidores de la enzima PPII, y así obtener datos adicionales sobre la respuesta a la inhibición de la PPII. Uno de ellos, el CPHNA, un inhibidor sintético de la PPII que tiene una K_i de 8 μM . Para cumplir parte de los objetivos mencionados, primero se probó que el inhibidor tuviera actividad inhibitoria de PPII. En una concentración de 10^{-4} M el inhibidor disminuyó la actividad de la PPII hasta un 41% (figura 24), de manera similar a lo reportado por Charli y colaboradores en 1989.

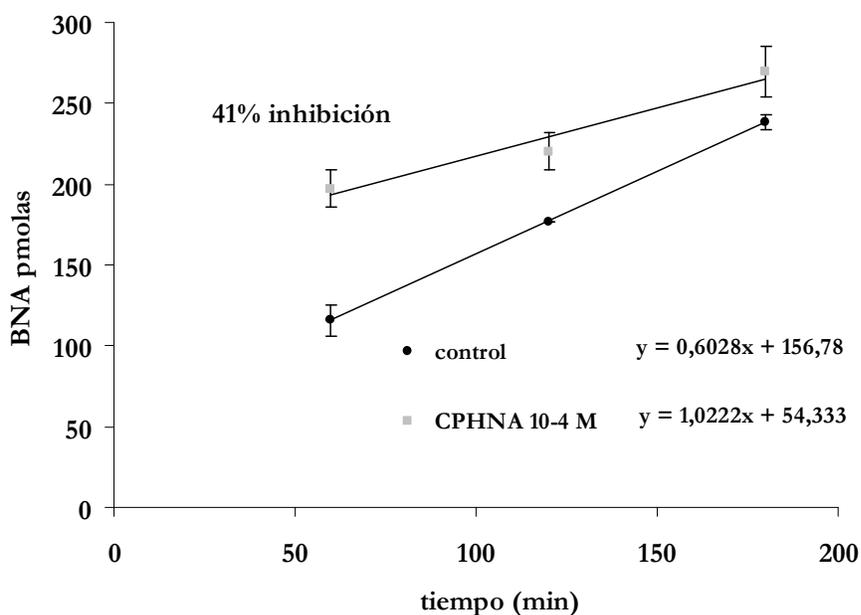


Figura 24.- Efecto del CPHNA sobre la actividad enzimática de la PPII de membranas de cerebro de rata. La enzima fue preincubada 10 minutos con CPHNA 10^{-4} M en presencia de bacitracina y N etilmaleimida y DAP IV a 37° C antes de la adición de TRH-BNA. El ensayo se realizó por triplicado y se representa la media \pm ES. Círculos negros: actividad de la enzima en el tiempo, en ausencia de CPHNA; cuadros grises: actividad de la enzima en el tiempo, en presencia de CPHNA 10^{-4} M.

Posteriormente se evaluó el efecto del TRH y el CPHNA sobre la liberación de TSH en cultivos primarios de adenohipófisis. En la figura 25 se observa que el grupo incubado con CPHNA en una concentración de 10^{-4} M, tiene una mayor liberación de tirotropina en el medio desde los 15 minutos y hasta el final del experimento, incluso mayor que en el grupo incubado con TRH en una concentración de 10^{-8} M. Así mismo, el grupo que tiene TRH y CPHNA muestra la mayor liberación de TSH en el experimento, pudiendo ser el efecto sumatorio que tiene el CPHNA y el TRH sobre la liberación de TSH. Puesto que el CPHNA mostró tener un efecto inespecífico por si solo sobre la liberación de TSH en una concentración de 10^{-4} M, se decidió probarlo en una concentración de 10^{-5} M en un experimento similar al anterior. En esta concentración, la liberación de PRL en el medio a los 15, 30 (figura 26) y 60 minutos (no mostrado) es similar en el grupo incubado con TRH más el CPHNA (barra con rombos) respecto al grupo estimulado con TRH (barra negra). Solo se observan diferencias significativas a las 180 y 360 minutos del experimento, donde el grupo incubado con TRH y CPHNA mostró un incremento estadísticamente significativo en la liberación de PRL del 39 % y 49 % respectivamente (figura 26). Por otro lado, la liberación de TSH secretada en este experimento no mostró cambios ni a tiempos cortos (no mostrado) ni a tiempos largos (figura 27). De manera breve podemos concluir que CPHNA en una concentración de 10^{-4} M tiene efectos inespecíficos sobre la liberación de TSH y que la inhibición de la PPII de adenohipófisis mediante CPHNA en una concentración de 10^{-5} M, potencia los efectos del TRH sobre la liberación de PRL a tiempos largos, sin afectar los niveles de TSH en estos mismos tiempos.

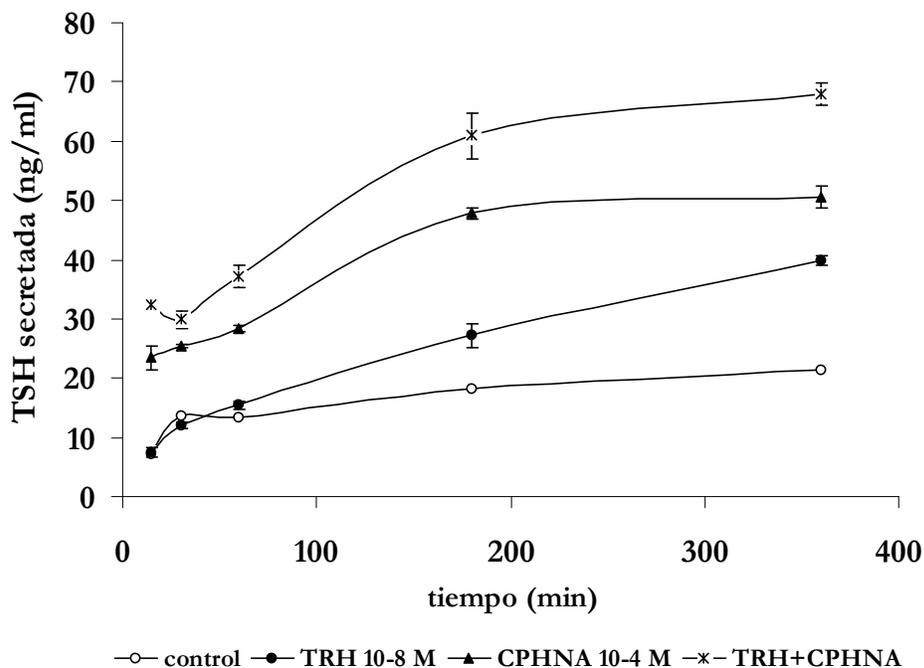


Figura 25. Cinética del efecto de la inoculación de CPHNA 10^{-4} M en el medio de cultivo sobre la liberación de TSH en cultivos primarios de adenohipófisis, en presencia de TRH. Se añadió a cada grupo lo siguiente: solo DMEM (círculos blancos); DMEM conteniendo TRH 10^{-8} M (cuadros oscuros); DMEM conteniendo CPHNA 10^{-4} M (triángulos oscuros); DMEM conteniendo CPHNA más TRH (asteriscos). Se tomaron alícuotas del medio de cultivo a los tiempos 15, 30, 60, 180 y 360 minutos para la posterior determinación de la concentración de TSH por el método de RIA. Se indica en cada caso la media de los valores de la concentración de TSH para cada tratamiento \pm ES ($n=3$).

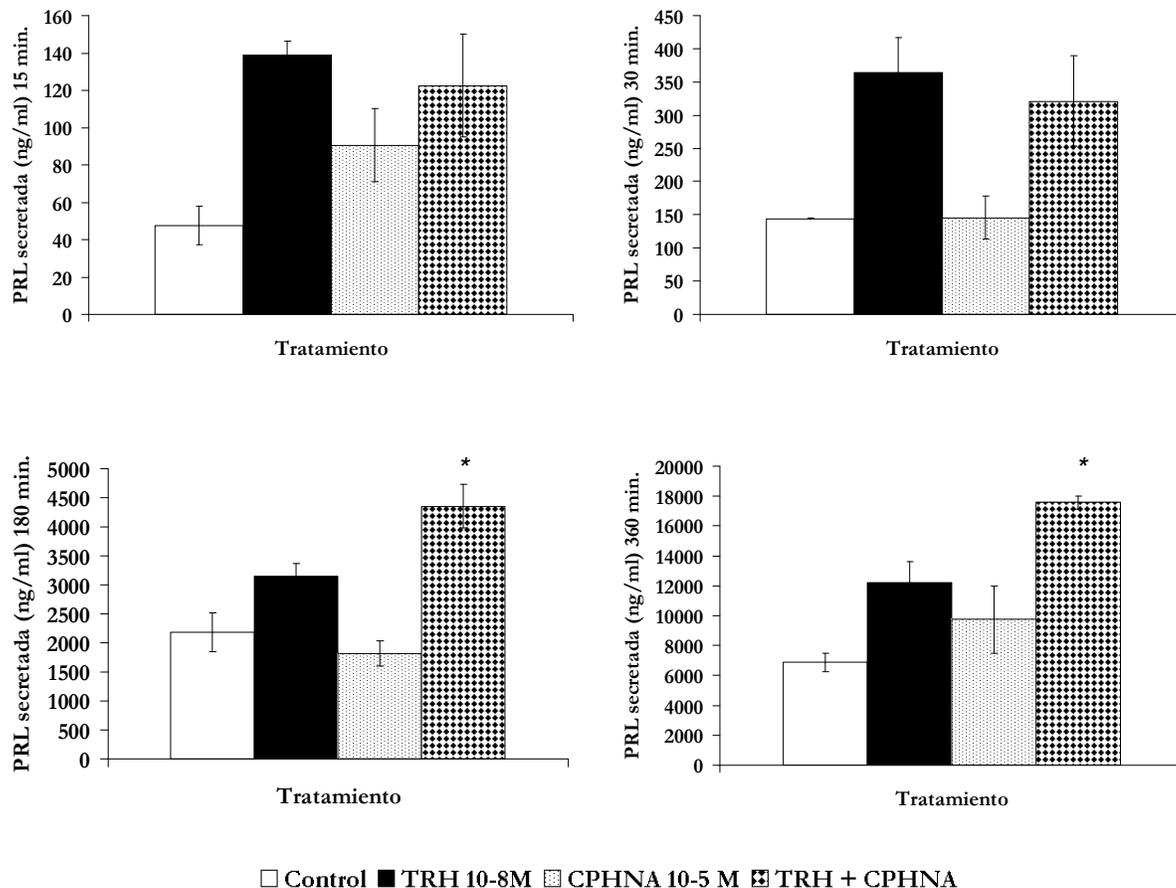


Figura 26.- Efecto de la inoculación de CPHNA en el medio de cultivo sobre la liberación de PRL en cultivos primarios de adenohipófisis, en presencia de TRH. Se añadió a cada grupo lo siguiente: solo DMEM (barra blanca); DMEM conteniendo TRH 10^{-8} M (barra negra); DMEM conteniendo CPHNA 10^{-5} M (barra punteada); DMEM conteniendo CPHNA más TRH (barra con rombos). Se tomaron alícuotas del medio de cultivo a los tiempos 15, 30, 180 y 360 minutos para la posterior determinación de la concentración de PRL por el método de RIA. Se indica en cada caso la media de los valores de la concentración de PRL para cada tratamiento \pm ES (n=4). (*) Significancia estadística entre el grupo estimulado con TRH y el grupo incubado con TRH más inhibidor.

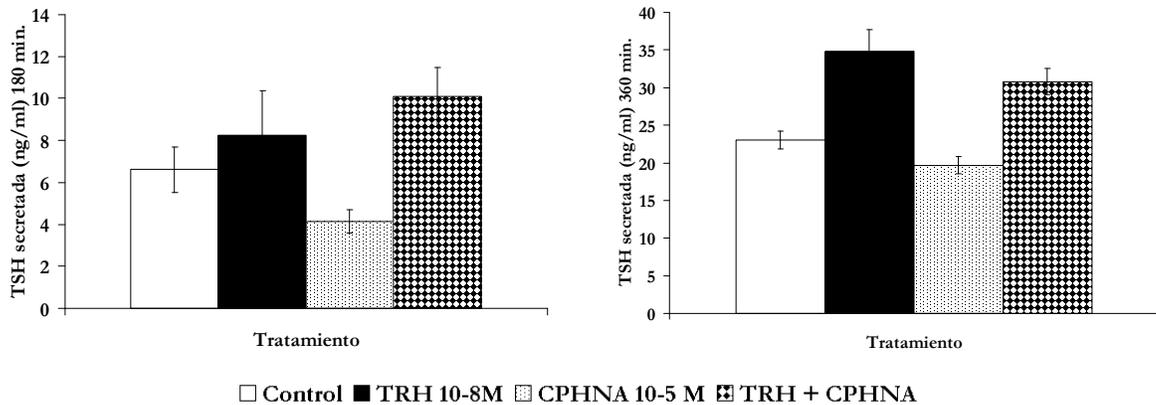


Figura 27.- Efecto de la inoculación de CPHNA 10⁻⁵ M en el medio de cultivo sobre la liberación de TSH en cultivos primarios de adenohipófisis, en presencia de TRH. Se añadió a cada grupo lo siguiente: solo DMEM (barra blanca); DMEM conteniendo TRH 10⁻⁸ M (barra negra); DMEM conteniendo CPHNA 10⁻⁵ M (barra punteada); DMEM conteniendo CPHNA más TRH (barra con rombos). Se tomaron alícuotas del medio de cultivo a los tiempos 15, 30, 60 180 y 360 minutos para la posterior determinación de la concentración de TSH por el método de RIA. Se indica en cada caso la media de los valores de la concentración de PRL para cada tratamiento \pm ES (n=4).

5.4 Efecto del TRH-fosfínico sobre la liberación de PRL en cultivos primarios de adenohipófisis

También se evaluó al inhibidor TRH fosfínico en una concentración superior a su K_i , sobre la liberación de PRL en cultivos primarios de adenohipófisis. En este experimento se encontró que el grupo incubado con TRH 10⁻⁸ M y TRH-fosfínico 1 μ M (barra con rombos), mostró una mayor liberación de PRL en el medio solo a los 30 minutos comparado con el grupo estimulado (barra negra) (figura 28). En el resto del experimento este grupo se comportó de manera similar al grupo incubado solo con TRH. A diferencia de CPHNA que en conjunto con TRH mostró cambios en la liberación de PRL a tiempos prolongados, este inhibidor mostró únicamente cambios a los 30 minutos. Nuestro grupo de trabajo, en experimentos similares al presentado en este trabajo con TRH-fosfínico, encontró mayor liberación de PRL solo a tiempos cortos (entre 15 y 30 minutos) en el grupo incubado con inhibidor y TRH. El resultado presentado en este trabajo y los resultados anteriores sugieren que este comportamiento se debe a la inhibición de la

enzima PPII por parte del TRH-fofosínico solo a ciertos tiempos, y que este tipo de inhibición se debe a las propiedades bioquímicas del inhibidor.

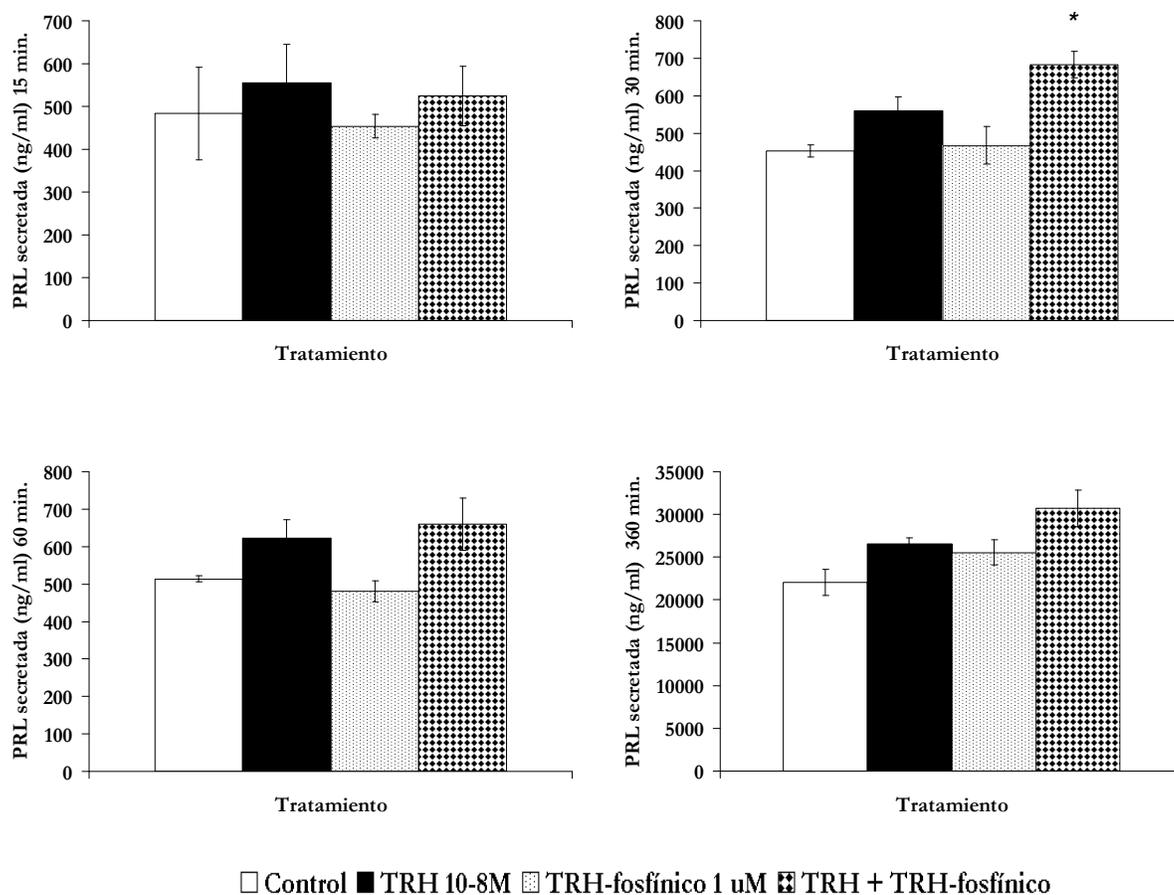


Figura 28.- Efecto de la inoculación de TRH- fosfínico en el medio de cultivo sobre la liberación de PRL en cultivos primarios de adenohipófisis, en presencia de TRH. Se añadió a cada grupo lo siguiente: solo DMEM (barra blanca); DMEM conteniendo TRH 10⁻⁸ M (barra negra); DMEM conteniendo TRH-fofosínico 1 uM (barra punteada); DMEM conteniendo TRH-fofosínico más TRH (barra con rombos). Se tomaron alícuotas del medio de cultivo a los tiempos 15, 30, 60, 180 y 360 minutos para la posterior determinación de la concentración de PRL por el método de RIA. Se indica en cada caso la media de los valores de la concentración de PRL para cada tratamiento \pm ES (n=4). (*) Significancia estadística entre el grupo estimulado con TRH y el grupo incubado con TRH más inhibidor.

5.5 Efectos *in vitro* del inhibidor pGlu-Asn-Pro-Tyr-Trp-Trp-amido-MCA (P.I.)

El inhibidor pGlu-Asn-Pro-Tyr-Trp-Trp-amido-MCA (referido como P.I. (péptido inhibidor)) es un inhibidor sintético de la PPII que tiene una K_i de 1 nM; por lo que es considerado el inhibidor más potente hasta ahora reportado (Kelly, et al., 2005). Sin embargo en estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, no se ha obtenido inhibición de la PPII de membranas de cerebro en concentraciones cercanas a su valor K_i , solo se ha podido inhibir a la enzima en concentraciones de 1 000 a 10 000 veces mayor respecto a su valor de K_i . Por ejemplo, en concentraciones de 1 μ M y 10 μ M se inhibe 55% y 65% la actividad de la PPII de membranas de cerebro de rata respectivamente. Por lo anterior, se evaluó el efecto del TRH en presencia y ausencia del P.I. 10 μ M y 50 μ M sobre la liberación de PRL en cultivos primarios de adenohipófisis. De manera general, se observó la misma respuesta en la liberación de PRL del grupo estimulado con TRH como del grupo incubado con TRH más inhibidor (10 μ M) (figura 29). Por otro lado, al incubarse P.I. en una concentración de 50 μ M se encontró que por sí solo induce la liberación de prolactina desde los 15 minutos y a lo largo del experimento, mientras que el grupo incubado con TRH más P.I. mostró mayores niveles de PRL liberada en comparación con el grupo incubado solo con TRH (no mostrado). Esto se debe posiblemente a un efecto inespecífico del P.I. en esta concentración más que a un efecto producido por la protección de la degradación del TRH. Esta respuesta es similar a la que observamos con CPHNA en una concentración de 10^{-4} M (figura 25). En resumen, el P.I. en una concentración de 10 μ M no potenció la liberación de PRL a diferencia de lo que se encontró con HcPI, CPHNA y TRH-fosfínico, mientras que en una concentración de 50 μ M indujo por sí solo la liberación de PRL.

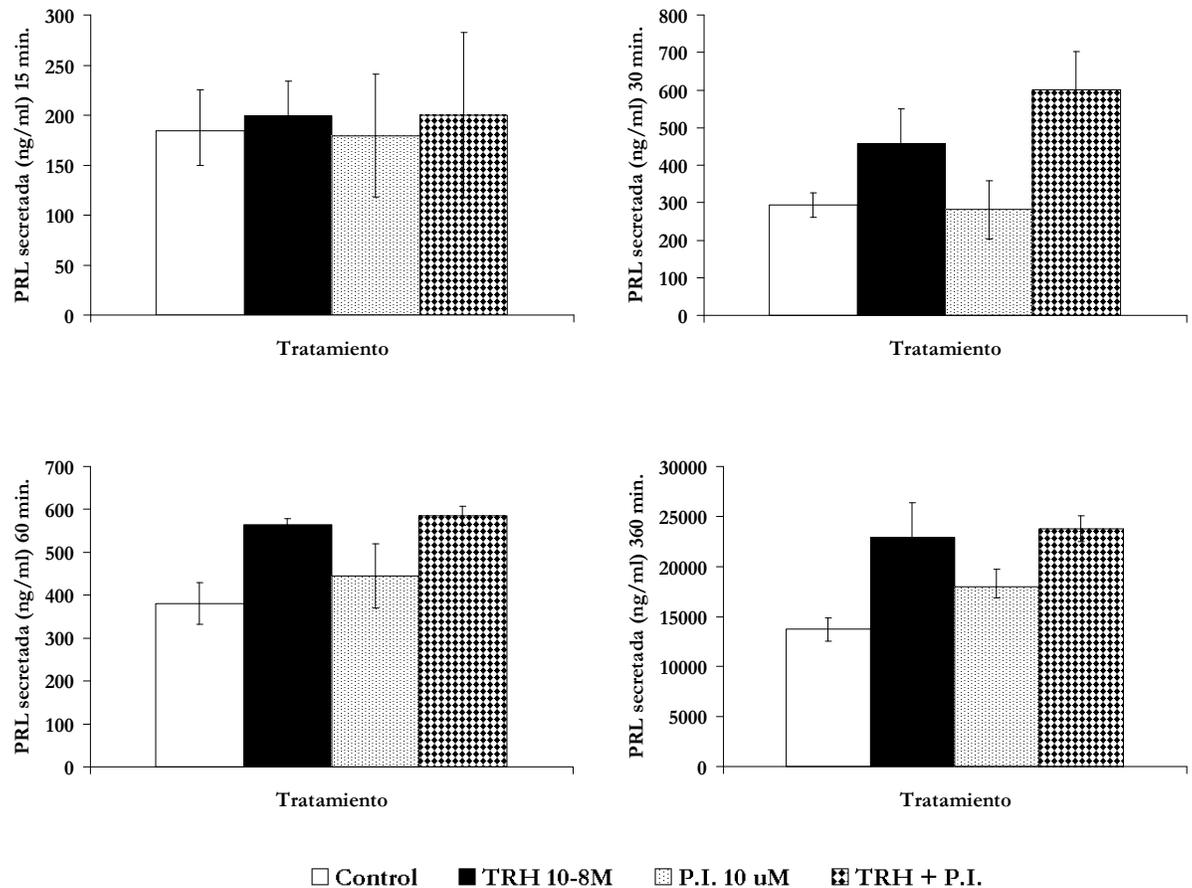


Figura 29.- Efecto de la inoculación de P.I. en el medio de cultivo sobre la liberación de PRL en cultivos primarios de adenohipófisis, en presencia de TRH. Se añadió a cada grupo lo siguiente: solo DMEM (barra blanca); DMEM conteniendo TRH 10^{-8} M (barra negra); DMEM conteniendo P.I. $10 \mu\text{M}$ (barra punteada); DMEM conteniendo P.I. más TRH (barra con rombos). Se tomaron alícuotas del medio de cultivo a los tiempos 15, 30, 60 180 y 360 minutos para la posterior determinación de la concentración de PRL por el método de RIA. Se indica en cada caso la media de los valores de la concentración de PRL para cada tratamiento \pm ES (n=4).

5.6 Efectos *in vivo* del P.I.

De manera paralela a los estudios *in vitro* con el P.I., y en ausencia de inhibidor HcPI puro para emplear en este estudio *in vivo*, se evaluó el efecto de la inyección intraperitoneal de TRH y P.I. en ratas, sobre la actividad enzimática de la PPII de adenohipófisis, la actividad enzimática de la tiroliberinasa de rata y la liberación de TSH sérica. La inyección de TRH tuvo un efecto claro sobre la concentración de TSH sérica, la cual se incrementó varias veces (figura 32) y un pequeño efecto estimulador sobre la actividad específica de la PPII de adenohipófisis (figura 30). Sin embargo, no se observó ninguna diferencia significativa en la actividad específica de PPII en la adenohipófisis (figura 30), en la actividad enzimática de la tiroliberinasa (figura 31) ni en la liberación de tirotrópina sérica (figura 32) entre el grupo inyectado con TRH y el grupo inyectado con TRH y P.I.

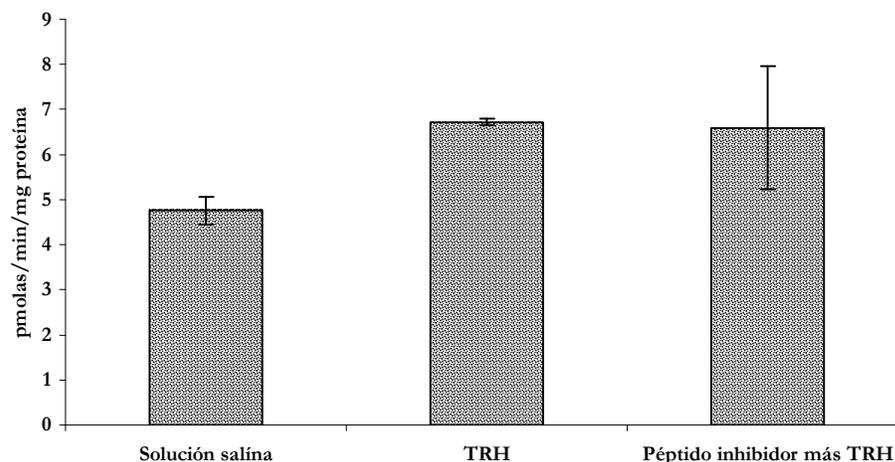


Figura 30.- Efecto de la inyección intraperitoneal del TRH y el P.I. sobre la actividad específica de PPII de adenohipófisis en ratas. En la gráfica se representa la actividad específica de la PPII de los diferentes grupos inyectados con solución salina (NaCl 0.9 %), TRH (1 ug/kg de peso) ó el P.I. (20 ug/g de peso) más TRH. Los datos representan la media \pm ES (n=6).

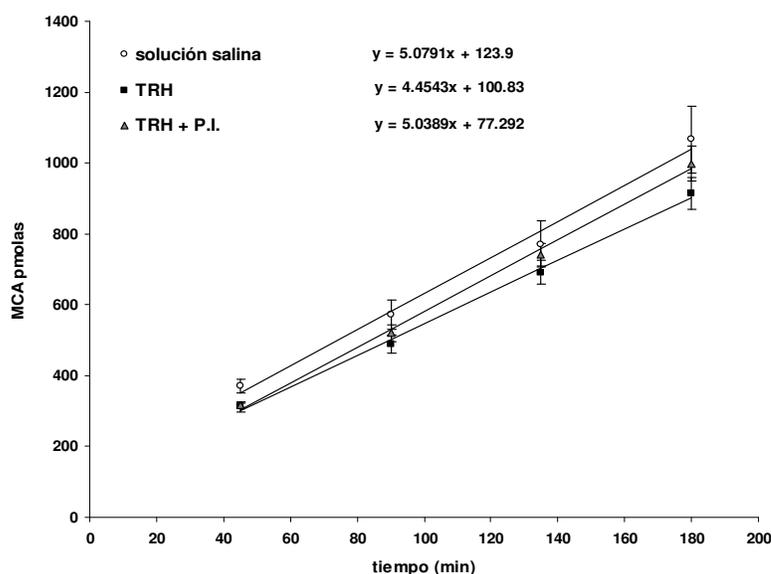


Figura 31.- Efecto de la inyección intraperitoneal del TRH y el P.I sobre la actividad enzimática de la tiroliberinasa de suero de rata. En la gráfica se representa la actividad enzimática de la tiroliberinasa en los diferentes grupos; círculos blancos: ratas inyectadas con solución salina (0.9 %); cuadros negros: ratas inyectadas con TRH (1 μ g/kg de peso); triángulos grises: ratas inyectadas con TRH más el P.I. 20 μ L de suero de rata obtenido de los diferentes tratamientos

fueron preincubados 10 minutos en presencia de bacitracina y N etilmaleimida y DAP IV a 37° C antes de la adición de TRH-MCA. Se representa la media \pm ES (n=6).

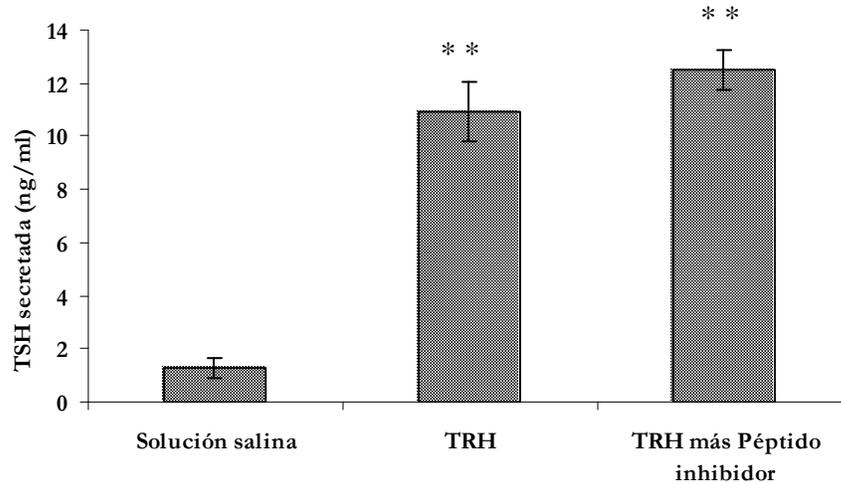


Figura 32.- Efecto de la inyección intraperitoneal del TRH y el P.I. sobre la liberación de TSH en ratas. Los animales fueron inoculados con una inyección de solución salina (NaCl 0.9 %), TRH (1 μ g/kg de peso) ó el P.I. (20 μ g/g de peso) más TRH. Los datos representan la media \pm ES (n=6). (***) Significancia estadística comparado con el grupo inyectado con solución salina.

El P.I. es una molécula muy hidrofóbica y de secuencia peptídica larga, es posible que al ser transportado por el torrente sanguíneo haya sido degradado por peptidasas ó que por su hidrofobicidad, se haya pegado a las membranas celulares, lo que evitó su acción sobre la enzima PPII de adenohipófisis y la tiroliberinasa de suero. Esto también explica los resultados obtenidos sobre a la liberación de TSH sérica, pues al no inhibir a la PPII de adenohipófisis ni al la tiroliberinasa, el grupo inyectado con TRH más P.I. se comporta igual al grupo inyectado solo con TRH pues el TRH sigue ejerciendo su acción sin ser protegido de degradación enzimática. De manera general, los resultados obtenidos con el P.I. *in vitro* e *in vivo* brindan información sobre el efecto de la inhibición de la PPII, pues dadas las propiedades bioquímicas del P.I. lo hacen poco eficaz en los sistemas biológicos.

Capítulo 6. Discusión

La inhibición selectiva de la actividad de las peptidasas es una herramienta que permite determinar el papel fisiológico de estas enzimas. Las principales estrategias para inhibir su actividad son la generación de ratones knock-out, el empleo de oligodeoxinucleótidos antisentido, de RNAi, e inhibidores de la actividad enzimática. Por ejemplo, algunos estudios revelaron que *in vitro*, la ectopeptidasa ACE degrada a las proteínas de tipo beta-amiloides (proteínas que se encuentran en el cerebro de pacientes con Alzheimer) (Hu et al, 2001). Sin embargo en el cerebro, esta función no había sido bien definida. Con el objetivo de determinar el papel de la ACE en la regulación de proteínas de tipo beta-amiloides *in vivo*, se analizó la acumulación de estas proteínas en ratones que carecían de la expresión de la ACE y en ratones normales inyectados con inhibidores específicos de esta enzima. En ambos casos, la concentración de proteínas de tipo beta-amiloides no se vio afectada, lo que descartó el papel fisiológico de la ACE en la regulación de estas proteínas en el cerebro (Eckman et al., 2006). En investigaciones para comprender el papel preciso de la angiotensina II y angiotensina III cerebral, péptidos involucrados en el control de la presión arterial, se diseñaron inhibidores específicos de las ectoenzimas que degradan a estos péptidos. La enzima aminopeptidasa A hace un corte proteolítico sobre la angiotensina II, dando como resultado al péptido angiotensina III, que a su vez es degradado por la enzima aminopeptidasa N. Mediante la inhibición de la aminopeptidasa A cerebral, se suprimió el efecto sobre la presión arterial que tiene la angiotensina II administrada exógenamente, lo que sugirió que este péptido debía ser convertido a angiotensina III para incrementar la presión arterial. Además, mediante la inhibición de la aminopeptidasa N cerebral, la enzima que degrada a la angiotensina III, se incrementó la presión arterial de estos animales (Reaux et al., 1999 y Reaux et al., 2000). Estos resultados demostraron el papel efector de la angiotensina III en el control central de la presión arterial. Por otro lado, se ha sugerido la participación de enzimas proteolíticas en la invasión y degradación de la matriz extracelular como elemento clave en el progreso de varios tumores celulares (Mignatti et al., 1993). La enzima catepsina B, que se encuentra normalmente presente en los lisosomas de varios tipos celulares, participa en la degradación de moléculas que son endocitadas del espacio extracelular. Sin embargo, esta enzima existe también en una forma anclada a la membrana

plasmática en diferentes tipos de tumores, lo cual la sugirió como un componente importante en un la degradación de la matriz extracelular. Mediante el empleo de oligonucleotidos antisentido contra el ARNm de la Catepsina B en una línea celular de osteosarcoma humano, se disminuyó el potencial invasivo de la línea tumoral, con lo que se demostró que la catepsina B participa en los procesos proteolíticos de invasión en este modelo de tumor (Krueger et al., 1999). Finalmente, en un estudio llevado a cabo en cultivos primarios de adenohipófisis para determinar el papel de las ectopeptidasas aminopeptidasa N, ACE y endopeptidasa 24.11 sobre el efecto del péptido CRF extracelular (que induce la liberación de corticotropina en la adenohipófisis), se emplearon inhibidores específicos de estas enzimas. Los resultados mostraron que únicamente la inhibición de la endopeptidasa 24.11 y de la aminopeptidasa N potencian la secreción de corticotropina inducida por CRF en estos cultivos. Tal aumento en la liberación de corticotropina se debe probablemente a que la inhibición de estas enzimas permitió mayor señalización del CRF (Ritchie et al., 2003). Los reportes mencionados en este párrafo muestran que la disrupción de la actividad de las peptidasas es una herramienta que permite elucidar el papel fisiológico de estas enzimas *in vitro* e *in vivo*.

En nuestro grupo de trabajo, se estudia el papel fisiológico de la enzima PPII, la cual es probablemente la única enzima responsable de degradar al TRH extracelular, aparte de su forma soluble, la tiroliberinas (Charlí et al., 1998). La PPII se expresa en la adenohipófisis en donde posiblemente regula los niveles extracelulares del TRH proveniente del hipotálamo, el cual estimula la síntesis y liberación de PRL y TSH. Para observar el efecto de la inhibición de la PPII sobre las acciones del TRH en esta región, decidimos emplear inhibidores de la actividad enzimática, pues a diferencia de otras metodologías, permiten estudiar el efecto a la inhibición a corto plazo, se pueden obtener efectos potentes y generalmente son específicos y rápidos. Actualmente contamos con varios inhibidores de la PPII; el HcPI, CPHNA, TRH-fosfínico y el P.I. Como modelo de estudio, empleamos cultivos primarios de adenohipófisis de rata. Estos cultivos responden a múltiples factores hipotalámicos de manera similar a lo que pasa *in vivo*. Por ejemplo, se induce la liberación de PRL y TSH al administrar TRH y se inhibe la liberación de PRL al administrar dopamina. Aunque la integridad funcional y estructural de las interacciones celulares no es

como lo encontramos *in vivo*, este es un buen modelo para estudiar la comunicación TRHérgica. Además, al extraer la adenohipófisis y utilizar todas las células de esta glándula, las células mantienen la comunicación parácrina que ha mostrado jugar un papel importante en la fisiología de estas células (Schwartz et al., 2000). Es por tanto un buen modelo para estudiar la regulación de la transmisión TRHérgica por la PPII *in vitro*. En el presente trabajo se analizó el efecto de inhibidores de la enzima PPII de adenohipófisis sobre las secreciones de PRL y TSH inducidas por TRH, para demostrar el papel funcional de esta enzima en la regulación del TRH extracelular y al mismo tiempo, establecer cual es el más apropiado para emplearlo en otros modelos relacionados con la inhibición de la enzima PPII.

Hoy en día no solo se emplean inhibidores sintéticos (inhibidores que se obtienen por la vía de la síntesis química) para el estudio científico de las peptidasas, también se han utilizado inhibidores aislados de fuentes naturales. Se han aislado inhibidores de la enzima PE a partir de las plantas *Ginkgo biloba* y *Rhodiola sacra* (Lee et al., 2004 y Fan et al., 1999). Existen reportes de obtención de inhibidores de proteasas a partir de las semillas de ciertas leguminosas que afectan la actividad enzimática de la tripsina, la quimiotripsina y la subtilisina (Richardson, 1991). Otra fuente natural de inhibidores de proteasas son los organismos marinos; de ellos se han descrito inhibidores de proteasas pertenecientes a todas las clases mecanísticas (Fritz et al., 1972; Kolkenbrock y Tschesche, 1987; Scheitz et al., 1995). El inhibidor HcPI es un inhibidor natural de la PPII aislado del organismo marino *Hermodice carunculata* (Pascual et al., 2004): este inhibidor ofrece varias ventajas respecto a otros inhibidores de la PPII entre las que destacan; su *Ki* de 51 nM y su alta especificidad (Pascual et al., 2004). Por estas ventajas iniciamos los estudios de este inhibidor sobre la transmisión TRHérgica en cultivos primarios de adenohipófisis partiendo de un extracto crudo del gusano de fuego *Hermodice carunculata*. En un primer intento de purificación, no pudimos aislar el HcPI con actividad inhibitoria importante, ya que tuvo perdida de actividad inhibitoria en el último paso de purificación. Pensamos que la inestabilidad de la molécula HcPI depende del estadio biológico de los organismos colectados, ya que en un segundo intento de purificación a partir de un extracto crudo distinto, purificamos al inhibidor HcPI sin ninguna complicación. La adición de TRH a nuestros cultivos primarios

en conjunto con el HcPI obtenido en la segunda purificación, incrementó la liberación de PRL respecto al grupo incubado solo con TRH. Esto se debe a la acción inhibitoria de HcPI sobre la enzima PPII, lo que evita que el TRH sea hidrolizado aumentando la vida media de este péptido en el espacio extracelular, y por tanto, su acción sobre la liberación de PRL. Es también notable que la liberación de PRL en el grupo incubado con TRH y HcPI es mayor a lo largo de todo el experimento, lo cual se explica por que HcPI tiene propiedades de inhibidor irreversible. Este tipo de inhibidores se unen fuertemente a la enzima de forma tal que el tiempo de su disociación es largo. Es por eso que al inhibir a la enzima PPII con un inhibidor de unión fuerte, su acción sobre la degradación del TRH se vio interrumpida a lo largo de todo el experimento, lo cual permitió una mayor acción del TRH en este grupo desde el inicio y hasta el final del experimento. Pascual y colaboradores (2004) observaron que la inyección intraperitoneal de HcPI en ratones, y la posterior obtención de la adenohipófisis y otras regiones del SNC, disminuyó la actividad específica de la PPII en estas regiones respecto a los grupos inyectados solo con solución salina, lo que sugirió que el inhibidor se mantenía pegado a la enzima PPII aun después de las disecciones y durante la medida de la actividad inhibitoria, corroborando su propiedad irreversible (Pascual et al., 2004). No obstante, la liberación de TSH, hormona que también se libera en respuesta al TRH, no se ve potenciada, es muy similar en el grupo incubado con TRH y el grupo incubado con TRH y HcPI. Por tanto, estos resultados concuerdan con lo que encontró Cruz (no publicado) al inhibir la traducción del ARNm de la PPII mediante oligonucleótidos antisentido, en donde únicamente se potenció la liberación de PRL pero no la de TSH en cultivos administrados con TRH. La explicación de este hecho es el siguiente: la inhibición de la actividad de la PPII ubicada particularmente en lactótrofos, pero no en tirótrofos (Bauer et al., 1991 y Cruz et al., no publicado), protege solo al TRH extracelular cercano a los lactótrofos, potenciando así solo la liberación de PRL, pero no la de TSH. En los resultados de este trabajo también observamos que la liberación de TSH en el grupo incubado con TRH y HcPI únicamente se potenció hasta los 180 minutos del experimento. El efecto potenciador que observamos sobre la secreción de TSH a este tiempo posiblemente se debe a la acumulación de TRH extracelular cercano a los lactótrofos debido a la inhibición de la enzima PPII, y que luego de un tiempo prolongado de acumulación termina por llegar a los tirótrofos, potenciando la liberación de TSH pero a

tiempos prolongados. Estos resultados sugieren que la regulación del péptido extracelular por la PPII solo ocurre en uno de los sitios blanco del TRH, los lactótrofos. Al mismo tiempo se demuestra el papel de esta enzima en el metabolismo del TRH en el espacio extracelular de la adenohipófisis, pues al inhibir a esta enzima se potencia la liberación de la PRL inducida por TRH.

Por otro lado, el CPHNA fue el primer inhibidor sintético reportado para la PPII, cuenta con una K_i de 8 μM y no inhibe a otras enzimas que pueden degradar al TRH *in vitro* (Charli, et al., 1989). Decidimos emplear este inhibidor para aportar datos adicionales sobre el efecto de la inhibición de la PPII de adenohipófisis. Primero, evaluamos la actividad inhibitoria del CPHNA en una concentración de 10^{-4} M sobre la actividad enzimática de PPII de membranas de cerebro de rata. En esta concentración, inhibe 41% la actividad de la PPII, similar a lo reportado por Charli y colaboradores en 1989. Sin embargo, en esta concentración, CPHNA por si solo tiene un efecto inespecífico sobre la liberación de TSH desde los 15 minutos y hasta el final del experimento. Esta liberación de TSH en presencia de CPHNA también explica el aumento en la liberación de TSH en presencia de TRH y CPHNA, la cual muestra la mayor liberación de TSH de todo el experimento, pudiendo deberse al efecto aditivo del CPHNA y del TRH. Este efecto inespecífico se debe probablemente a la concentración de CPHNA 10^{-4} M, la cual es relativamente alta para un inhibidor. En esta concentración elevada, el CPHNA podría estar interactuando con las proteínas de superficie celular, modificando su estado conformacional y por tanto su actividad. Otra explicación es que el CPHNA esté actuando como agonista del TRH-R1, lo que pudiese conllevar a la respuesta que observamos en la liberación de TSH. Viendo este efecto inespecífico de CPHNA 10^{-4} M, decidimos probarlo en una concentración de 10^{-5} M. En esta concentración, no observamos que por si solo el CPHNA indujera la liberación de prolactina, pero de manera satisfactoria, observamos que a las 3 y a las 6 horas, se potenció la liberación de PRL en el grupo incubado con TRH y CPHNA. Posiblemente observamos un aumento en la liberación de PRL a tiempos prolongados (a diferencia de HcPI donde se observa desde los 15 minutos) ya que con la concentración de CPHNA 10^{-5} M, así como la baja afinidad de este inhibidor por la enzima PPII, inhibe menos moléculas de PPII al principio del experimento. Por eso, en los primeros tiempos del experimento, el TRH

extracelular es protegido de la degradación de una forma muy leve, sin observar cambios en la liberación de PRL. Luego de un tiempo prolongado de protección de TRH extracelular, se logra observar un efecto en la liberación de PRL mediada por TRH. De igual forma a los resultados obtenidos con HcPI, se potenció la liberación de PRL, pero no la de TSH, dando mayor soporte a los resultados obtenidos con HcPI. En conclusión, podemos decir que el empleo de CPHNA 10^{-4} tuvo efectos inespecíficos sobre la liberación de TSH y que el CPHNA 10^{-5} M potencia la liberación de PRL en presencia de TRH a tiempos prolongados, confirmando el papel de la enzima PPII en la degradación del TRH extracelular en la adenohipófisis.

Las propiedades bioquímicas de cada inhibidor parecen explicar el tipo de resultado obtenido en este trabajo. Por ejemplo, el inhibidor TRH-fosfínico en una concentración de $1 \mu\text{M}$ en conjunto con TRH solo mostró un aumento en la liberación de PRL a los 30 minutos. Este tipo de inhibidores son de tipo reversible, pues al ser tan parecidos a los sustratos naturales de las enzimas existe un alto recambio de los inhibidores con el sitio activo de la enzima. Pensamos que la inhibición de la enzima PPII por TRH-fosfínico, la cual se lleva a cabo de manera reversible, permite aumentar la vida media del TRH extracelular cuando la enzima esta inhibida. Una vez que el inhibidor se despega de la enzima, la PPII comienza a degradar al TRH, evitando que se potencien los efectos sobre la liberación de PRL. Es por ello que el inhibidor en conjunto con TRH solo potencia la liberación de PRL al principio del experimento. Además, este resultado es similar a los resultados encontrados previamente con este inhibidor en el cultivo primario, en donde también se potencia la liberación de PRL al inicio del experimento (Vargas, comunicación personal).

Por otro lado, el P.I. es un inhibidor de la enzima PPII que prometía ser una gran herramienta para el estudio de la inhibición de la enzima PPII, ya que su valor de K_i es de 1 nM . Es por tanto el inhibidor más potente hasta ahora reportado (Kelly et al., 2005). En valores cercanos a su K_i , nuestro grupo de trabajo no pudo encontrar actividad inhibitoria de PPII en membranas de cerebro de rata; solo en concentraciones de $1 \mu\text{M}$ y $10 \mu\text{M}$ (1000 y 10000 veces mayor a su valor de K_i), se inhibió la actividad de la enzima PPII 55% y 65

% respectivamente. No obstante, al utilizar una concentración de 10 μM de P.I. en conjunto con TRH 10^{-8} M en el cultivo primario, no observamos ningún aumento en la liberación de PRL a ninguno de los tiempos del experimento, y al utilizar una concentración de P.I. 50 μM , es decir, 5 veces más que la anterior, observamos un efecto inespecífico sobre la liberación de PRL en el grupo incubado solo con el inhibidor desde los 15 minutos. Por otro lado, como parte del objetivo de este trabajo, se administró intraperitonealmente el P.I. en conjunto con TRH, para ver si era capaz de inhibir a la tiroliberinasa, a la PPII de adenohipófisis y potenciar la liberación de PRL y TSH. A pesar de observar un efecto claro del TRH sobre la concentración de TSH sérica, no encontramos efectos significativos sobre la actividad enzimática de la tiroliberinasa, la actividad de la PPII de adenohipófisis, ni sobre la concentración de TSH sérica en respuesta al TRH e inhibidor, ya que ambos grupos se comportan de manera similar. Las características químicas particulares del P.I. pueden explicar los resultados observados *in vitro* e *in vivo* que se presentan en este trabajo. Cuando Bauer y colaboradores reportaron la síntesis de este inhibidor, la determinación de la *Ki* se llevó a cabo mediante el empleo de la enzima PPII purificada (Kelly et al., 2005). Es posible pensar que en un sistema biológico más complejo, la *Ki* tenga valores distintos a los obtenidos con el empleo de la enzima PPII purificada. Esto pudiera explicar por que nuestro laboratorio no pudo inhibir a la PPII con el P.I. en valores cercanos a su *Ki*. Este inhibidor es un inhibidor hidrofóbico, diseñado para promover mayor unión del inhibidor a la enzima blanco y de esta manera hacerlo más potente. Esta hidrofobicidad pudiese ser una desventaja debido a que la molécula pudiese unirse a las membranas biológicas de las células, las cuales están constituidas principalmente por moléculas hidrofóbicas. Es posible que este inhibidor se una a las membranas biológicas, lo cual evita su acción inhibitoria tanto *in vitro* como *in vivo*. También es probable que el inhibidor al ser de una secuencia de varios aminoácidos, haya sido reconocido y degradado por peptidasas presentes en suero y/o la adenohipófisis y que por lo tanto, la acción inhibitoria de P.I. *in vitro* e *in vivo* se vio interrumpida.

Mediante el empleo de un inhibidor natural de la enzima PPII denominado HcPI, y mediante dos inhibidores sintéticos de la PPII (CPHNA y TRH-fosfínico), se corroboran los resultados obtenidos mediante la supresión del ARNm de la enzima PPII relacionados

con el aumento en la liberación de PRL inducida por TRH pero no de TSH en el cultivo primario de adenohipófisis. Esto sugiere el papel de la PPII en la regulación del TRH extracelular en los sitios cercanos a los lactótrofos. Sin embargo, los tirótrofos también son blanco de las acciones del TRH, entonces, ¿cual es el mecanismo de regulación de la señal del TRH por los tirótrofos, los cuales son los responsables de la síntesis de TSH que participa en el eje hipotalámico-adenohipofisiario-tiroideo? Una posible respuesta sería que *in vivo*, la PPII de adenohipófisis regulara la concentración de TRH extracelular frente a los lactótrofos y al mismo tiempo, la de los tirótrofos que se encuentran en sitios muy cercanos de los lactótrofos, pues la adenohipófisis es una glándula en donde las células interactúan alrededor de otras gracias al soporte de la matriz extracelular. Esta interacción obviamente se pierde en el cultivo primario de adenohipófisis. Sin embargo, mediante estudios de inmunocitoquímica contra las hormonas de la adenohipófisis de rata se ha encontrado que los lactótrofos y los tirótrofos no se encuentran distribuidos de manera similar (Nakane, 1970); este hecho no permite resolver nuestra duda. Probablemente, la forma de regular la señal del TRH extracelular que participa en el eje hipotalámico-adenohipofisiario-tiroideo es a través de la tiroliberinasa, la cual puede degradar al TRH en el sistema portal en donde el TRH entra en contacto con la sangre. Esta afirmación se apoya en el hecho de que la tiroliberinasa es la enzima responsable de degradar al TRH en el suero (Friedman y Wilk, 1985) y que el ARNm de la tiroliberinasa en el hígado aumenta tras la administración de hormonas tiroideas, lo cual aumenta los niveles de tiroliberinasa en el suero (Lin y Wilk, 1998). Recientemente nuestro laboratorio ha encontrado que el ARNm y la actividad de la PPII que se encuentra en los tanicitos (un tipo de células gliales del cerebro que se encuentra cerca del sitio de liberación del TRH neuroendócrino), es también regulada positivamente por hormonas tiroideas (no publicado). Es así como la tiroliberinasa y la PPII presente en los tanicitos podrían participar en la regulación de la señal del TRH, controlando a su vez la actividad del eje hipotalámico-adenohipofisiario-tiroideo. Es por ello que se debe intentar elucidar estas dudas en modelos *in vivo*. Los resultados obtenidos con el inhibidor HcPI lo hacen el inhibidor candidato para seguir estudiando el efecto de la inhibición de la enzima PPII no solo en el sistema neuroendócrino, si no también en otros modelos relacionados con la transmisión TRHérgica en el SNC.

Capítulo 7. Conclusiones y perspectivas.

7.1 Conclusiones

- La inhibición de la PPII mediante el HcPI potencia la liberación de PRL inducida por TRH, afectando escasamente la liberación de TSH, similar a los resultados donde se inhibió la traducción del ARNm de la PPII.
- El CPHNA 10^{-4} M tiene efectos inespecíficos sobre la liberación de TSH y en una concentración de 10^{-5} M, potencia la liberación de PRL a tiempos prolongados.
- El TRH-fosfínico potencia la liberación de PRL a tiempos cortos, posiblemente por ser un inhibidor de tipo reversible.
- El P.I. no potenció la transmisión TRHérgica *in vitro* y no inhibió a la PPII de adenohipófisis ni a la tiroliberinasa *in vivo* debido a sus propiedades bioquímicas las cuales evitaron su acción.
- El HcPI es el inhibidor candidato para seguir estudiando la comunicación TRHérgica en otros modelos.
- La PPII de adenohipófisis regula la señal del TRH extracelular en los sitios cercanos a los lactótrofos, mientras que la tiroliberinasa o la PPII presente en los tanicitos pudiese regular los niveles de TRH extracelular en el sistema portal, regulando el TRH que participa en el eje hipotálamico-adenohipofisiario-tiroideo.

7.2 Perspectivas

- Observar el efecto de la inyección del HcPI sobre la liberación de PRL y TSH *in vivo*.
- Emplear el HcPI en un paradigma relacionado con la regulación de la transmisión TRHérgica en el SNC.

Bibliografía

ASHWORTH, R. and Hinkle, P. M. (1996). Thyrotropin-releasing hormone-induced intracellular calcium responses in individual rat lactotrophs and thyrotrophs. *Endocrinology*. 137: 5205-5212.

BARNES, K. and Kenny, A. J. (1988). Endopeptidase 24.11 in the adenohypophysis of the pigs is localized in the gonadotropin cells. *Peptides*. 9: 5.

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 (Paris)*. 70: 69-74.

BAUER, K. (1994). Purification and characterization of the thyrotropin-releasing-hormone-degrading ectoenzyme. *European Journal of Biochemistry*. 1: 387-96.

BAUER, K., and Nowak, P. (1979). Characterization of a thyroliberin-degrading serum enzyme catalyzing the hydrolysis of thyroliberin at the pyroglutamyl-histidine bond. *European Journal of Biochemistry*. 99: 239-246.

BAUER, K., Nowak, P., and Kleinkauf, H. (1981). Specificity of a serum peptidase hydrolyzing thyroliberin at pyroglutamyl-histidine bond. *European Journal of Biochemistry*. 118: 173-176.

BAUER, K., Carmeliet, P., Schulz, M., Baes, M. and Deneff, C. (1990). Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohypophyseal cells. *Endocrinology*. 127:1224-33.

BRENNER-GATI, L. and Gershengorn, M. C. (1986). Effects of thyrotropin-releasing hormone on phosphoinositides and cytoplasmic free calcium in thyrotropic pituitary cells. *Endocrinology*. 118: 163-169.

BEAR, M., Connors, B., and Paradiso, M. (1996). *Neuroscience: exploring the brain*. Lippincott Williams and Wilkin, 2001.

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: 373-8.

CHARLI, J. L., Méndez, 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.

CHARLI, J. L., Vargas, M. A., Cisneros, M., de Gortari, P., Baeza, M. A., Jasso, P., Bourdais, J., Perez, L., Uribe, R. M., and Joseph-Bravo P.(1998). TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology*. 6: 45-57.

CHARLI, J. L., Pascual I., Cruz R., and Vargas M .A. (2006). Post-secretory inactivation of peptides in the hypothalamic-adenohypophyseal axis. Focus on pyroglutamyl peptidase II, the thyrotropin releasing hormone inactivating ectoenzyme, in *Molecular Endocrinology*. Pags 39-64. Edit. Joseph-Bravo. Research Signpost.

CHAVEZ-GUTIERREZ, L., Bourdais, J., Aranda, G., Vargas, M.A., Matta, E., Ducancel, F., Segovia, L., Joseph-Bravo P., and Charli, J.L. (2005). A truncated isoform of pyroglutamyl aminopeptidase II produced by exon extension has dominant negative activity, *Journal of Neurochemistry*. 92: 807-17.

COLLINSOVA, M., and Jiracek J. (2000) Phosphinic acid compounds in biochemistry, biology and medicine. *Current Medicinal Chemistry*. 7: 629–647.

CUMMINS, P., and O'Connor B. (1998). Pyroglutamyl aminopeptidase: An overview of the three known enzymic forms. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1429: 1-17.

CUSHMAN, D. W., and Ondetti, M. A. (1995). Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nature Medicine*. 5: 1110–1112.

DIVE, V., Lucet-Levannier, K., Georgiadis, D., Cotton, J., Vassiliou, S., Cuniasse, P. et al. (2000) Phosphinic peptide inhibitors as tools in the study of the function of zinc metallopeptidases. *Biochemical Society Transactions*. 28: 455–460.

DREYER, G. B., Metcalf, B. W., Tomaszek, T. A. Jr, Carr, T. J., Chandler, A. C. 3rd, Hyland L. et al. (1989) Inhibition of human immunodeficiency virus 1 protease in vitro: rational design of substrate analogue inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86: 9752–9756.

ECKMAN, E. A. S., Adams, S. K., Troendle, F. J., Stodola, B. A., Kahn, M.A., Fauq, A. H., Xiao, H. D., Bernstein, K. E., and Eckman, C.B. (2006). Regulation of steady-state beta-amyloid levels in the brain by neprilysin and endothelin-converting enzyme but not angiotensin-converting enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 281: 30471–30478.

ELMORE, M.A., Griffiths, E.C., O'Connor, B., and O'Cuinn, G. (1990). Further characterization of the substrate specificity of a TRH hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Neuropeptides*. 15: 31-36.

FAN, W., Tezuka, Y., Komatsu, K., Namba, T., And Kadota, S. (1999). Prolyl endopeptidase inhibitors from the underground part of *Rhodiola sacra* S. H. *Fu*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 22:157-161.

FRIEDMAN, T. C., and Wilk, S. (1985). The effect of inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase on TRH degradation in rat serum. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 132: 787-794

FRITZ, H., Brey B. and Beress, L. (1972). Polyvalent Isoinhibitoren für trypsin, chymotrypsin, plasmin und kallikrein aus seeanemonen (*Anemonia sulcata*), Isolierung, Heimverhalten und Aminosäurezusammensetzung. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*. 353: 19–30.

GANONG, W. F., Deschepper, C. F., Steele, M., K., and Intebi A. (1989). Renin-angiotensin system in the anterior pituitary of the rat. *American Journal of Hypertension*. 2: 320-2.

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.

GERSHENGORN, M. C., and Osman, R. (1996). Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiological Reviews*. 76: 175-190.

GOLLASCH, M., Kleuss, Ch., Hesheler, J., Wittl, B., and Zchultz, G. (1993). Gi2 and protein kinase C are required for thyrotropin-releasing hormone-induced stimulation of voltage-dependent Ca²⁺ channels in rat pituitary GH3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90: 6265-6269.

GONZÁLEZ-ARENAS, A., Reyna-Neyra, A., Gómez, M., Méndez, I., Larrieta-Carrasco M. A., Haces, M. L., Jiménez, B., y Camacho-Arroyo, I. (2001). Los mensajeros químicos del sistema neuroinmunoendócrino. *Educación Química*. 12: 158-162.

GRIFFITHS, E. C., and Kelly, J. A. (1979). Mechanisms of inactivation of hypothalamic regulatory hormones. *Molecular Cell Endocrinology*. 14: 3–17.

HAISENLEDER, D. J., Ortolano, G. A., Dalkin, A.C., Yasin, M., and Marshall J.C. (1992). Differential actions of thyrotropin (TSH)-releasing hormone pulses in the expression of prolactin in the lactating rat. *Endocrinology*. 130: 29-2923.

HINKLE P. M., Pekary A. E, Senanayaki S., and Sattin A. (2002). Role of TRH receptors as possible mediators of analeptic actions of TRH-like peptides. *Brain Research*. 935: 59–64.

HORITA, A., Carino, M., and Lai, H. (1986). Pharmacology of thyrotropin-releasing hormone. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 26: 311–332.

HU, J., Igarashi, A., Kamata, M., and Nakagawa, H. (2001). Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*. 21: 47863–47868.

ITADANI, H., Nakamura, T., Itoh, J., Iwaasa, H., Kanatani, A., Borkowski, J., Ihara, M., and Ohta, M. Cloning and characterization of a new subtype of thyrotropin-releasing hormone receptors. (1998). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 250: 68-71.

JACKSON, I. M. D. (1983). Thyrotropin-releasing hormone (TRH): Distribution in mammalian species and its functional significance. In; thyrotropin releasing hormone. Editado por Griffiths, E. C y Bennett, G. W. Raven Press, New York.

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 Research*. 166: 321-329.

JOSEPH-BRAVO, P., Uribe, R. M., Vargas M. A., Pérez-Martínez L., Zoeller R.T, and Charli J. L. (1998). Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 18: 231–247.

KELLY, J. A., Slator, G. R., Tipton, K. F., Williams, C. H., and Bauer K. (2000). Kinetic investigation of the specificity of porcine brain thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme for thyrotropin-releasing hormone-like peptides. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 16746-16751.

KELLY, J. A., Bennett, G. W., Beckett, S., Slator, G. R., Roe, C. H., O'Loinsigh, E. D., and O'Boyle, K. M. (2001) Effects of thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme inhibitors on thyrotropin-releasing hormone actions *in vivo*. *British Journal of Pharmacology*. 133: 187.

KELLY, J. A., Scalabrino, G. A., Slator, G. R., Cullen A. A., Gilmer, J. F., Lloyd, D. G., Bennett, G. W., Bauer, K., Tipton, K. F., and Williams C. H. (2005). Structure-activity studies with high-affinity inhibitors of pyroglutamyl-peptidase II. *The Biochemical Journal*. 15: 569-576.

KOLKENBROCK, H., and Tschesche, H. (1987). A new inhibitor of elastase from the sea anemone (*Anemonia sulcata*). *Biological chemistry Hoppe-Seyler*. 368: 93-99.

KONAKA, S., Yamada, M., Saoth, T., Osawa, H., Watanabe, E., Takaka, K., and Mori M. (1997). Expression of thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor mRNA in somatotrophs in the rat anterior pituitary. *Endocrinology*. 138: 827-830.

KRUEGER, S., Haeckel, C., Buehling, F., and Roessner, A. (1999). Inhibitory effects of antisense cathepsin B cDNA transfection on invasion and motility in a human osteosarcoma cell line. *Cancer Research*. 59: 6010-6014.

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

LEE, J. H., Lee, S. Y., Lee, K. S. Jang, H. J., Lee, K. H., Han, T. R., and Paik, Y. S. (2004). Prolyl endopeptidase inhibitors from the leaves of *Ginkgo biloba*. *Planta Medica*. 70: 1228-1230.

LEE, S.L., Stewart, K. and Goodman R.H. (1988). Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *Journal of Biological Chemistry*. 263:16604-16609.

LIN, J., and Wilk, S. (1998). Quantitation and regulation of pyroglutamyl peptidase II messenger RNA levels in rat tissues and GH3 cells. *Neuroendocrinology*. 67: 197-208.

LLOYD, R. L., Pekary A. E., Sattin A., and Amundson, T. (2001). Antidepressant effects of thyrotropin-releasing hormone analogues using a rodent model of depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 70:15-22.

LOWRY, O., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.

MIGNATTI P., and Rifkin D. E. (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiological Reviews*. 73: 161-195.

MATTEUCCI, M. D., and Wagner, R. W. (1996). In pursuit of antisense. *Nature*. 7: 20-22.

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 brain. *Neuropeptides*. 17: 55-62.

NAKANE, P. (1979). Classifications of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *The Journal of histochemistry and cytochemistry*. 18: 9-21.

NILLNI, E. A., Luo, L. G., Jackson, I. M. D., and McMillan, P. (1996). Identification of the precursor, its processing products and its coexpression with convertase 1 (PC1) in primary cultures of hypothalamic neurons. *Anatomic localization of PC1 and PC2*. *Endocrinology*. 137; 5651-5661.

NILLNI, E. A., and Sevarino, K. A. (1999). The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocrine Reviews*. 20: 599-648.

O'CONNOR, B., and O'Cuinn, G. (1984). Localization of a narrow specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain. *European Journal of Biochemistry*. 144: 271-278.

O'DOWD, B. F., Lee, D. K., Huang, W., Nguyen, T., Cheng, R., Liu, Y., Gershengorn, M. C., and George, S. R. (2000). TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. *Molecular Endocrinology*. 14:183-193.

O'LEARY, R. and O'Connor, B (1995). Thyrotropin-releasing-hormone. *Journal of Neurochemistry*. 65: 953-963.

PASCUAL, I., Gil-Parrado, S., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P., Diaz, J., Possani, L. D., Charli, J. L., and Chavez, M. (2004). Purification of a specific inhibitor of pyroglutamyl aminopeptidase II from the marine annelide *Hermodice carunculata*: *in vivo* effects in rodent brain. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 36:138-152.

PASCUAL Alonso, Isel. (2005). Purificación y caracterización del primer inhibidor natural de la piroglutamil aminopeptidasa II (enzima que degrada al TRH), aislado del anélido marino *Hermodice carunculata*, Pallas, 1766 (Polycheta). Tesis de Doctorado. Universidad de la Habana. Habana, Cuba.

PATCHETT, A. A., Hams, E., Tristram, E. W., Wyvratt, M. J., Wu, M. T., Taub, D., Peterson, E. R., Ikeler, T. J., Broeke, T. J., Payne, L. G., Ondeka, D. L., Thorsett, E. D., Grenlee, W. J., Lohr, N. S., Hoffsomer, R. D., Joshua, A., Ruyle, W. V., Rothrock, J. W., Aster, S. D., Maycock, A. L., Rpbinson, F. M. and Hirschman, C. R. (1980). A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Nature*. 228: 280-283.

PONCE, G., Charli, J.L., Pasten, J.A., Aceves, C., and Joseph-Bravo, P. (1988) Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 48, 211-213.

REAUX, A., de Mota, N., Zini, S., Cadel, S., Fournie-Zaluski, M. C., Roques, B. P., Corvol, P., and Llorens-Cortes, C. (1999). PC18, a specific aminopeptidase N inhibitor, induces vasopressin release by increasing the half-life of brain angiotensin III. *Neuroendocrinology*. 69: 370-376.

REAUX, A., Iturrioz, X., Vazeux, G., Fournie-Zaluski, M.C., David, C., Roques, B. P., Corvol, P., and Llorens-Cortes, C. (2000). Aminopeptidase A, which generates one of the main effector peptides of the brain renin-angiotensin system, angiotensin III, has a key role in central control of arterial blood pressure. *Biochemical Society Transactions*. 28: 435-440.

PFLEGER, K. D., Kroeger, K. M., and Eidne, K. A. (2004). Receptors for hypothalamic releasing hormones TRH and GnRH: oligomerization and interactions with intracellular proteins. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 15: 269-280.

RICHARDSON, M. (1991). Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: Rogers, L. J., Ed., *Methods in Plant Biochemistry, Amino Acids, Proteins and Nucleic Acids*. Vol. 5: 259-305. Academic Press, New York.

RITCHIE, J. C., Davis, T.P., and Nemeroff, C. B., (2003). Action of three ectopeptidases on corticotropin-releasing factor: metabolism and functional aspects. *Neuropsychopharmacology*. 28: 22-33.

ROQUES, B. P. (2000). Novel approaches to targeting neuropeptide systems. *Trends in Pharmacological Sciences*. 21: 475-483.

SCHALLY, A. (1978). Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. *Science* 202: 18-28.

SCHAUDER, B., Schomburg, L., Köhrle, J., and Bauer, K. (1994). Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91: 9534-9538.

SCHEITZ, H., Bruhn, T., Guillemare, E., Moinier, D., Lancelin, J. M., Beress L., and Lazdunsky, M. (1995). Kaliclutines and Kaliseptines. *Journal of Biological Chemistry*. 270: 25121-25126.

SCHMIDT-NIELSEN, K. (1986). *Animal physiology: adaptation and environment*. Cambridge University Press, New York.

SCHMITMEIER, S., Thole, H., Bader, A., and Bauer, K. (2002). Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone (TRH)-degrading serum enzyme and its identification as a product of liver origin. *European Journal of Biochemistry*. 269:1278-1286.

SCHOMBURG, L. and Bauer, K (1995). Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology*. 136: 3480–3485.

SCHOMBURG, L., Turwitt, S., Prescher, G., Lohmann, D., Horsthemke, B., and Bauer, K. (1999). Human TRH-degrading ectoenzyme. cDNA cloning, functional expression, genomic structure and chromosomal assignment. *European Journal of Biochemistry*. 265: 415-422.

SCHWARTZ, J., (2000). Intercellular communication in the anterior pituitary. *Endocrine Reviews*. 21: 488-513.

SQUIRE, L., Bloom, F. E., Spitzer, N. C., and Roberts, J. L. (2003). *Fundamental Neuroscience*. 2a edition. Academic Press, New York.

SUN, Y., Lu, X., and Gershengorn M.C. (2003). Thyrotropin-releasing hormone receptors similarities and differences. *Journal of Molecular Endocrinology*. 30: 87-97.

THORNDYKE, M. C., and Georges, D. (1988). Functional aspects of peptide neurohormones in protochordates. In: *Neurohormones in Invertebrates*. Eds. M. C., Thorndyke and G. J. Goldsworthy. Cambridge: Cambridge University Press.

URIBE, R. M., Joseph-Bravo, P., Pasten, J., Ponce, G., Méndez, M., Covarrubias, L., and Charli J.L. (1991). Some events of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology*. 54: 493-498.

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

VARGAS, M. A., Herrera, J., Charli, J. L., and Joseph-Bravo P. (1992 a). Regional distribution of pyroglutamyl peptidase II in rabbit brain, spinal cord, and organs. *Peptides*. 13: 255-60.

VARGAS, M. A., Herrera, J., Uribe, R. M., Charli, J. L., and Joseph-Bravo P. (1992 b). Ontogenesis of pyroglutamyl peptidase II activity in rat brain, adenohypophysis and pancreas. *Developmental Brain Research*, 66: 251-256.

VARGAS, M. A., Joseph-Bravo, P., and Charli, J.L. (1994). Thyrotropin-releasing hormone downregulates pyroglutamyl peptidase II activity in adenohypophyseal cells. *Neuroendocrinology*. 60: 323-330.

VARGAS, M. A., Bourdais, J., Sánchez, S., Uriostegui, B., Moreno, E., Joseph-Bravo, P., and Charli, J.L. (1998). Multiple hypothalamic factors regulate pyroglutamyl peptidase II in cultures of adenohypophyseal cells: role of the cAMP pathway. *Journal of Neuroendocrinology*. 10: 199-206.

VARGAS, M. A., Cisneros, M., Joseph-Bravo P., and Charli, J.L (2002). TRH-induced down-regulation of pyroglutamyl aminopeptidase II activity involves L-type calcium channels and Cam kinase activities in cultures of adenohypophyseal cells. *Journal of Neuroendocrinology*. 14: 184-193.

WALTER, R. (1976). Partial purification and characterization of PPCE: Enzymatic inactivation of neurohypophyseal hormones by kidney preparation of various species. *Biochimica et Biophysica Acta*. 442: 138-158.

WILK, S., and Wilk, E.K. (1989). Pyroglutamyl peptidase II, a thyrotropin releasing hormone degrading enzyme: purification and specificity studies of the rabbit brain enzyme. *Neurochemistry International*. 15: 81-89.

YAMADA, M., Radovick S., Wondisfore, F. E., Nayakama, Y., Weintraub, B. D., and Wilber, J. F. (1990). Cloning and structure of human genomic DNA and hypothalamic cDNA encoding human preprothyrotropin-releasing hormone. *Molecular Endocrinology*. 4: 551-556.

YU, R., Ashworth, R., and Hinkle, P. M. (1998). Receptors for thyrotropin-releasing hormone on rat lactotropes and thyrotropes. *Thyroid*. 8: 887-894.