



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

PEPEL DE LA PIROGLUTAMIL
PEPTIDASA II EN EL SEPTUM, EN UN
MODELO DE ANALEPSIA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

IVÁN LAZCANO SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. JEAN LOUIS CHARLI CASALONGA

COMITÉ TUTOR:

Dra. PATRICIA BERTHA JUDITH DE GORTARI GALLARDO

Dr. ENRIQUE ALEJANDRO REYNAUD GARZA

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/453/10

ASUNTO: Oficio de Jurado

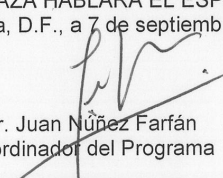
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 31 de mayo de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **LAZCANO SANCHEZ IVAN** con número de cuenta **300218978** con la tesis titulada **"Papel de la Piroglutamil peptidasa II en el Septum, en un modelo de analepsia"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. JEAN LOUIS CHARLI CASALONGA**:

Presidente: DR. OSCAR PROSPERO GARCIA
Vocal: DRA. PATRICIA BERTHA JUDITH DE GORTARI GALLARDO
Secretario: DR. JEAN LOUIS CHARLI CASALONGA
Suplente: DR. MIGUEL PEREZ DE LA MORA
Suplente: DR. ENRIQUE ALEJANDRO REYNAUD GARZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 7 de septiembre de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa



JNF/DCRV/ASR/grf*

Agradecimientos

- **Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.**
- **A los apoyos recibidos (beca CONACYT, apoyo DGAPA IN221109 y apoyo CONACYT 61804)**
- **Al Dr. Jean Louis Charli Casalonga, a la Dra. Patricia Bertha Judith de Gortari Gallardo, Dr. Miguel Pérez de la Mora, al Dr. Oscar Próspero García y al Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza al por ser miembros de mi comité tutor.**
- **Dr. Jean Louis Charli Casalonga, Q.F.B Miguel Cisneros Ramírez, Sr. Sergio Gonzales Trujillo, Biol. Alan Israel Jiménez Reyes, Dra. Patricia Joseph Bravo, M.Z.v. Biol. Karla Elisa Juárez Contreras, Elizabeth Mata Moreno, Dra. Leonor Pérez Martínez, Dra. Edith Sánchez Jaramillo, Dra. Rosa María Uribe Villegas, Miguel Ángel Vargas Suárez, por la asistencia teórica y técnica en el transcurso de esta tesis.**

Agradecimientos personales

- Al Dr. Jean Louis Charli Casalonga y a la Dra. Patricia Jospheh Bravo, así como todos los miembros del laboratorio por darme la oportunidad de trabajar en el grupo de neurobiología en el cual aprendí la vocación de la investigación.

- A la Universidad Nacional Autónoma de México

INDICE

Abreviaciones.....	8
Lista de tablas y figuras.....	9
Resumen.....	10
Resumen en ingles (Abstract).....	11
1.- INTRODUCCIÓN.....	12
1.1.- Generalidades sobre la comunicación peptidérgica; péptidos, receptores y ecto-enzimas.....	12
1.1.2.- Biosíntesis de los péptidos mensajeros intercelulares.....	12
1.1.3.- Unión péptido-receptor.....	13
1.1.4.- Hidrólisis de los péptidos por peptidasas.....	14
2.- ANTECEDENTES.....	18
2.1.- Comunicación peptidérgica por TRH.....	18
2.1.2.- Generalidades.....	18
2.2.- Biosíntesis de TRH.....	19
2.3.- Receptores de TRH.....	19
2.4.- Papel de TRH en la analepsia.....	20
2.5.- Degradación de TRH.....	23
2.5.1 Degradación por enzimas citosólicas.....	23
2.5.2.- Degradación por una enzima presente en suero.....	24
2.5.3.- Degradación por la Piroglutamil peptidasa II (PPII).....	24
2.6.- Las propiedades bioquímicas de la PPII sugieren que es la enzima responsable de inactivar al TRH.....	25
2.7.- La PPII es un miembro de la familia de metalo peptidasas de tipo 1 (M1).....	26
2.8.- Inhibición de la PPII.....	28
2.8.1.- Inhibición <i>in vitro</i>	28
2.8.2.- Inhibición <i>in vivo</i>	29
3.- Planteamiento del problema-Hipótesis.....	30
4.- Objetivo general.....	31
4.1.- Objetivos particulares.....	31
5.- Estrategia experimental.....	31
6.- Metodología.....	32
6.1.- Material biológico.....	32
6.2.- Drogas.....	32
6.3.- Narcosis inducida por etanol.....	32
6.4.- Implantación de una cánula.....	33
6.5.- Protocolo de analepsia.....	35
6.5.1 Efecto ip de TRH.....	36

6.5.2.- Efecto de TRH y de otras drogas sobre el SNC	36
6.5.3.- Efecto de TRH icv e intra-septal.....	37
6.6.- Efecto de la microinyección <i>in vivo</i> del inhibidor de PPII pGlu-Asn-PromCA sobre la actividad específica de PPII.....	38
6.7.- Extracción del septum medial a partir del cerebro de los animales.....	38
6.8.- Cuantificación de proteína total.....	39
6.9.- Medida de la actividad enzimática de la PPII	40
6.10.- Estadística.....	41
7.- RESULTADOS.....	42
7.1.- Efecto de la inyección ip de TRH sobre la duración de la narcosis inducida por etanol.....	42
7.2.- Efecto analéptico de TRH inyectado en el SNC.....	43
7.3.- Efecto de la coinyección de TRH y péptidos en el paradigma de analepsia.....	46
7.3.1.- Coinyección de TRH y el inhibidor pGlu-Asn-PromCA.....	46
7.3.2.- Coinyección de TRH y un péptido sin actividad inhibitoria de PPII.....	48
7.3.3.- Coinyección de TRH y TRH fosfínico.....	49
8.- Discusión y conclusión.....	52
8.1.- Efecto analéptico de TRH.....	52
8.2.- Efecto de la coinyección de TRH y péptidos.....	54
9.- PERSPECTIVAS.....	57
10.- BIBLIOGRAFIA.....	58

Abreviaciones

TRH-MCA: pGlu-His-Pro metilcoumarina

PPII: Piroglutamil peptidasa II

SNC: Sistema nervioso central

TRH: Hormona liberadora de tiotropina

TRH-R1: Receptor tipo 1 para TRH

TRH-R2: Receptor tipo 2 para TRH

Lista de tablas y figuras

- Figura 1.- Representación gráfica de la biosíntesis de los péptidos mensajeros intercelulares.**
Figura 2.- Representación de la hidrólisis de los péptidos por una peptidasa.
Figura 3. Topología de las ecto-peptidasas.
Figura 4.- La hormona liberadora de tirotropina.
Figura 5.- Representación esquemática del receptor TRH-R1 de rata.
Figura 6.- Ubicación del septum y de las varias regiones septales en el cerebro de rata.
Figura 7.- Topografía de la PPII deducida a partir de la secuencia de un DNAc de la PPII.
Figura 8.- Estrategia de implantación para la microinyección intra-septal.
Figura 9.- Variaciones en el protocolo de analepsia, de acuerdo al sitio de inyección de los péptidos.
Figura 10.- Representación gráfica de la manipulación del cerebro de rata para obtener el septum medial.
Figura 11.- Efecto de la inyección ip de etanol y TRH sobre la duración de la narcosis en ratas.
Figura 12. Efecto de la administración de TRH en el SNC sobre la duración de narcosis inducida por etanol.
Figura 13. Localización histológica de los sitios de inyección en el septum medial, de acuerdo al Atlas de Paxinos y Watson (1982).
Figura 14. Efecto de la administración de TRH y pGlu-Asn-PromCA en el septum medial. Figura 16.- Efecto de la coinyección de TRH y de un péptido que carece de actividad inhibitoria de PPII, en el paradigma de analepsia.
Figura 17.- Efecto de la microinyección de TRH-fosfínico, inhibidor de la PPII, solo y en conjunto con TRH en el septum medial, en el paradigma de analepsia y sobre la actividad específica de PPII.
Figura 18.- Esquema que muestra las eferencias del septum medial que son afectadas por el etanol.
Figura 19.- Papel de la PPII en la degradación de TRH en la sinapsis.
- Tabla 1.- Principales clases de peptidasas, de acuerdo a la entidad molecular que realiza la catálisis.**
Tabla 2.- Ectopeptidasas de la familia Metallo 1 (M1).
Tabla 3. Preparación de la curva estándar para la determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford.

RESUMEN.

LA COMUNICACIÓN PEPTIDÉRGICA ES UN TIPO DE COMUNICACIÓN INTERCELULAR QUE UTILIZA MOLÉCULAS DE NATURALEZA PEPTÍDICA. ESTOS PÉPTIDOS TIENEN SECUENCIAS Y MODIFICACIONES QUE LES BRINDAN DISTINTA ACTIVIDAD BIOLÓGICA. SON SINTETIZADOS Y SECRETADOS POR LAS CÉLULAS, DIFUNDEN EN EL ESPACIO EXTRACELULAR HASTA ALCANZAR A SU CÉLULA BLANCO, QUE TIENE RECEPTORES ESPECÍFICOS PARA CADA PÉPTIDO. UNO DE LOS MECANISMOS DE TERMINACIÓN DE LA ACCIÓN DE ESTOS PÉPTIDOS SON ENZIMAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA CON SU SITIO CATALÍTICO DIRIGIDO AL ESPACIO EXTRACELULAR (ECTO-ENZIMAS). LA ECTO-ENZIMA DENOMINADA PIROGLUTAMIL PEPTIDASA II (PPII) HIDROLIZA EL ENLACE PGLU-HIS DE LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH; PGLU-HIS-PRO-NH₂) *IN VITRO*, UN TRIPÉPTIDO DE AMPLIO INTERÉS BIOMÉDICO QUE TIENE DIFERENTES PROPIEDADES HOMEOSTÁTICAS. ES CAPAZ DE REDUCIR LA DURACIÓN DE LA NARCOSIS INDUCIDA POR ETANOL (EFECTO ANALÉPTICO) CUANDO SE MICROINYECTA EN EL COMPLEJO SEPTUM MEDIAL-BANDA DIAGONAL DE BROCA (SM-BDB). SE HA POSTULADO QUE LA LIMITANTE DE LOS EFECTOS BENÉFICOS DEL TRH ES SU RÁPIDA HIDRÓLISIS EN EL ESPACIO EXTRACELULAR POR LA PPII. AUNQUE EXISTE UN CONJUNTO DE EVIDENCIAS BIOQUÍMICAS QUE SUGIEREN QUE MODULA LOS EFECTOS DE LA TRH A TRAVEZ DE SU HIDRÓLISIS, NO EXISTEN ESTUDIOS *IN VIVO* QUE LO CONFIRMEN. EN ESTE TRABAJO, MEDIANTE EL EMPLEO DE INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD DE PPII, Y MEDIANTE UN PARADIGMA DE ANALEPSIA, SE ESTUDIA POR PRIMERA VEZ EL EFECTO *IN VIVO* DE LA INHIBICIÓN DE LA PPII SOBRE LA ACCIÓN DEL TRH. LOS RESULTADOS DEMUESTRAN QUE AL INDUCIR NARCOSIS CON ETANOL EN LA RATA, EL TRH INYECTADO EN EL SEPTUM MEDIAL DISMINUYE SIGNIFICATIVAMENTE ESTA DURACIÓN Y AL COINYECTARSE CON UN INHIBIDOR DE PPII, EL EFECTO ES MAYOR. CONCLUIMOS QUE EN ESTE PARADIGMA EXPERIMENTAL, SE PUEDE POTENCIAR EL EFECTO ANALÉPTICO DE TRH SI SE INHIBE SU HIDRÓLISIS POR LA PPII, LO CUAL MUESTRA POR PRIMERA VEZ QUE EN EL CEREBRO BAJO CONDICIONES *IN VIVO* DICHA ENZIMA REGULA LA VIDA MEDIA DE TRH.

Resumen en ingles (Abstract)

The peptidergic communication it is a kind of intercelular communication that use peptide biomolecules. In general, these peptides are chains of amino acids no more than 40 aminoacids in length, whit particular sequences and modifications that confer it different biological activity. They are sinthesized and releasing by the cells, spread in the extracellular space until reach your target cell, wich have a specific receptor for each peptide, a family member of G protein-coupled receptor. In another hand, enzymes of plasmatic membrane whit your catalytic site toward to extracellular space (ecto-enzymes) hydrolyzing peptides. Thyrotropin releasing hormone (TRH; pGlu-His-ProNH₂) is degraded *in vitro* by pyroglutamyl peptidase II (PPII), a narrow specificity ecto-enzyme with a preferential localization in brain. There is little evidence that PPII activity is critical for TRH communication in the brain *in vivo*. To test this hypothesis, we studied the impact of PPII inhibition on the analeptic effect of TRH. The intraperitoneal, intracerebroventricular or intra medial septum injection of TRH reduced, in a dose dependent manner, the time needed by Wistar rats to recover from ethanol-induced narcosis. The injection of pGlu-Asn-ProMCA, a PPII inhibitor, into the medial septum enhanced the effect of TRH. On the contrary, the injection of pGlu-Asp-ProNH₂, a peptide devoid of PPII inhibitory activity, did not change TRH effect. The injection of a phosphinic TRH analog, a higher affinity inhibitor of PPII, induced recovery from narcosis. We conclude that in the medial septum, PPII activity limits TRH action, presumably by reducing TRH levels on cells co-expressing PPII and TRH-R1.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Generalidades sobre la comunicación peptidérgica; péptidos, receptores y ecto-enzimas

1.1.2.- Biosíntesis de los péptidos mensajeros intercelulares

La comunicación peptidérgica, al igual que muchos procesos biológicos, está finamente regulada. Desde la biosíntesis, varios procesos bioquímicos regulan el índice de transcripción y traducción de los péptidos, lo que repercute en la cantidad del péptido que será liberado al espacio extracelular. En general, los péptidos tienen una ruta de biosíntesis canónica (Zhou et al, 1999, Li, 2000). Primero, las células peptidérgicas producen un RNA primario que es procesado hasta un RNA mensajero (RNAm) en el núcleo. Este RNAm es traducido en el retículo endoplásmico rugoso en el péptido precursor que es biológicamente inactivo. Dicho precursor contiene un péptido señal de alrededor de 20 aminoácidos que lo conduce al lumen del retículo endoplásmico rugoso, donde el péptido señal es removido por una endopeptidasa. Posteriormente este precursor es dirigido al aparato de Golgi. Al final de la red trans-Golgi, la proteína precursora es empacada en gránulos de secreción para su transporte intracelular y posterior liberación al espacio extracelular por exocitosis. Ya que el precursor contiene múltiples copias del mismo o de diferentes péptidos maduros, separados por los aminoácidos básicos Lis-Arg ó Arg-Arg, el precursor es hidrolizado enzimáticamente para generar los péptidos maduros. Tal proceso se lleva a cabo principalmente en los gránulos de secreción por enzimas de la familia tipo subtilisina (subtilisine-like) denominadas convertasas de proproteínas (PCs, por sus siglas en inglés). Estas enzimas cortan al precursor en el extremo C-terminal del par de aminoácidos básicos Lis-Arg ó Arg-Arg. Posteriormente, la carboxipeptidasa E, que también se encuentra en los gránulos de secreción remueve el par de aminoácidos básicos para generar el péptido que es biológicamente activo (figura 1). Otras enzimas pueden catalizar la ciclización de la glutamina N-terminal o la amidación del C-terminal.

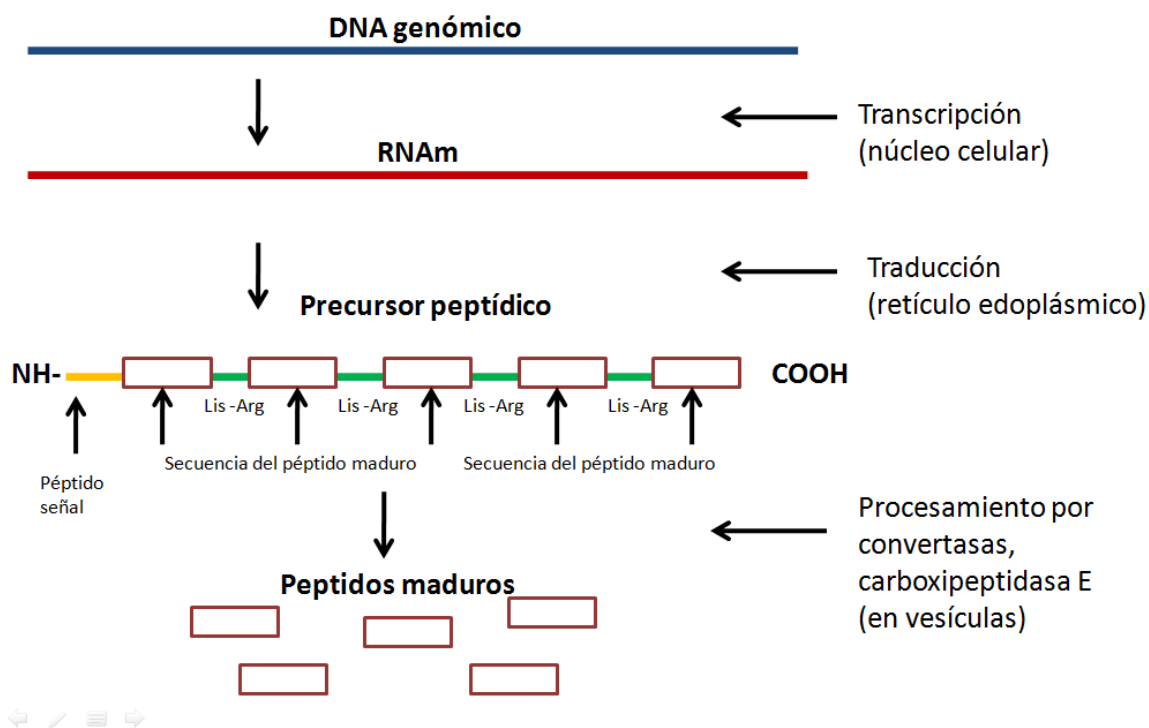


Figura 1.- Representación gráfica de la biosíntesis de los péptidos mensajeros intercelulares.

La biosíntesis de los péptidos inicia en el núcleo celular, donde se sintetiza su RNAm; posteriormente es traducido en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso, generando un precursor inactivo que finalmente es procesado por convertasas y por una carboxipeptidasa para generar los péptidos activos que se almacenan en vesículas de secreción, y posteriormente liberarse al espacio extracelular por exocitosis.

1.1.3.- Unión péptido-receptor

La interacción del péptido con su receptor localizado en la parte externa de la membrana plasmática conduce a que la célula receptora genere una respuesta en su interior. En general, cada péptido tiene un receptor específico, aunque existen péptidos que pueden unirse a otros cuantos receptores. Los receptores peptídicos son receptores acoplados a proteínas G. Consisten de siete dominios transmembranales, un dominio extracelular N-terminal, tres lazos extracelulares y tres lazos intracelulares más un dominio intracelular C-terminal. Los péptidos se unen posiblemente a los dominios transmembranales y a uno de los lazos extracelulares, lo que conlleva a una alteración de la conformación del receptor. Este cambio conformacional permite a los lazos intracelulares activar una proteína G heterotrimérica. La interacción receptor-proteína G causa la disociación del trímero de la proteína G, liberando a la subunidad alfa de las subunidades beta-gamma.

Tanto la subunidad alfa, como el dímero beta-gamma, activan río abajo a proteínas efectoras, lo cual permite que la señal del péptido se interprete dentro de la célula receptora (Ritter y Hall 2009).

1.1.4.- Hidrólisis de los péptidos por peptidasas

Las peptidasas son enzimas con la habilidad de hidrolizar un enlace peptídico. Aunque inicialmente se describieron estas enzimas como participantes en el catabolismo inespecífico de las proteínas que obtenemos en la dieta, así como en la destrucción de tejidos, hoy se sabe que participan en la catálisis de reacciones específicas y que tienen preferencia por sustratos de estructura definida (Neurath, 1999). Una peptidasa localizada en las membranas celulares del riñón capaz de hidrolizar la cadena beta de la insulina fue el primer reporte de una de tales enzimas (Kerr y Kenny, 1974). Posteriormente se fueron descubriendo diferentes enzimas, con diferentes sustratos peptídicos, pero además se ha demostrado que juegan roles esenciales en muchos procesos biológicos, durante la fertilización, el desarrollo, el crecimiento y la muerte celular (Neurath, 1999, Li, 2000, Barret y Rawlings, 2007). Estas peptidasas realizan su hidrólisis mediante un ataque nucleofílico al grupo carbonilo del enlace peptídico, y con esto rompen el enlace de la secuencia peptídica (figura 2). Se pueden clasificar todas las peptidasas en diferentes grupos, de acuerdo a la entidad molecular que realiza la catálisis. Hoy en día se acepta que existen seis tipos de principales de tipos catalíticos (Barret y Rawlings, 2007, Ordóñez et al., 2009). Por ejemplo, si en la peptidasa el aminoácido que hace el ataque nucleofílico es una cisteína, esta enzima pertenecerá a las cisteín-peptidasas; si el ataque nucleofílico lo hace un cofactor metálico, ésta pertenecerá a las metalopeptidasas (tabla 1). A su vez, cada grupo engloba las enzimas en familias, de acuerdo a estructuras tridimensionales parecidas y a los aminoácidos conservados alrededor de su sitio activo.

Gracias a que se cuenta con el genoma completo del humano, la rata y el ratón, mediante el análisis computacional de estas secuencias se ha identificado el degradoma (repertorio de proteasas en un organismo) de estas especies, calculando que existen más de 500 genes que codifican para diferentes peptidasas; esto corresponde a alrededor del 2% de estos genomas (tabla 1) (Puente y Otín, 2004).

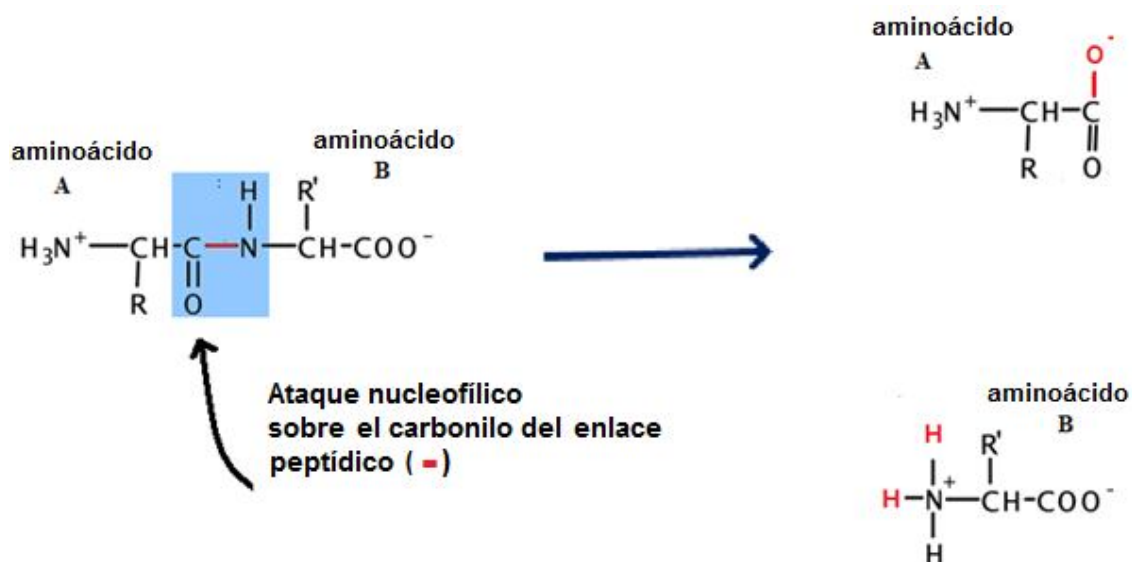


Figura 2.- Representación de la hidrólisis de los péptidos por una peptidasa. La hidrólisis de los péptidos por peptidasas se lleva a cabo cuando la enzima, mediante su sitio catalítico, realiza un ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo del enlace peptídico.

Tabla 1.- Principales clases de peptidasas, de acuerdo a la entidad molecular que realiza la catálisis. Se muestran enlistados el tipo de peptidasa y el número de genes codificantes para cada clase catalítica en 3 especies de mamíferos (tomado y modificado de Puente y Otín, 2004). Nótese que no se han identificado peptidasas de tipo glutamato en estos mamíferos.

Tipo catalítico	Identificadas en humano	Identificadas en rata	Identificadas en ratón
Serin	178	221	227
Treonin	28	29	26
Cistein	148	160	163
Aspartico	21	24	27
Metalo	186	192	198
Glutámico	0	0	0
Total	561	626	641

Las peptidasas unidas a la membrana plasmática de las células son las responsables de controlar la vida media de los péptidos, ya que activan ó degradan péptidos que participan en el intercambio de información entre las células de los organismos multicelulares (Barret y Rawlings, 2007, Li, 2000, Ordóñez et al., 2009, Puente y Otín, 2004). Estas enzimas tienen una topografía común, con el sitio

catalítico del lado extracelular (ectopeptidasas), conformado por el extremo amino (tipo I) ó el extremo carboxilo (tipo II), un dominio intramembranal y un dominio intracelular pequeño. Otras ectopeptidasas no atraviesan la membrana, pero se encuentran ancladas a la membrana mediante un motivo glicosil-fosfatidil inositol (GPI). Finalmente, en algunos casos, modificaciones post-transcripcionales y/o post-traduccionales conducen a que estas enzimas no se anclen a la membrana y que se secreten al espacio extracelular (solubles) (figura 3). Una correcta comunicación peptidérgica permite que se lleven a cabo procesos fisiológicos importantes, tales como el desarrollo, el crecimiento, y otros procesos fisiológicos de los organismos multicelulares, y se ha demostrado que la desregulación de la actividad ó expresión de estas ectopeptidasas puede conllevar a patologías en los organismos (Antczak et al, 2001).

Las ectopeptidasas son blanco de acción farmacológica; la inhibición de su actividad aumenta la vida media de péptidos y esto puede producir efectos terapéuticos benéficos. Como ejemplos de las aplicaciones terapéuticas que se obtienen al inhibir a las ectopeptidasas, se encuentra el empleo de inhibidores contra la enzima Dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV, EC 3.4.14.5), una peptidasa de tipo serino que se expresa en la superficie celular y pertenece a la familia de las prolil-oligopeptidasas. Esta enzima degrada a las incretinas, péptidos que aumentan la secreción de insulina y la proliferación de células beta del páncreas. Inhibidores de la actividad de la DPP-IV aumentan la vida media y los efectos biológicos de las incretinas; en humanos se han encontrado resultados favorables en el tratamiento contra la diabetes tipo II, ya que disminuyen la cantidad de hemoglobina glicosilada (que se encuentra alta en diabéticos) y los niveles postprandiales de glucosa (elevación de la concentración de glucosa en la sangre por el consumo de alimentos) (Barnett, 2006).

Tipo I Tipo II GPI –Ancladas Solubles

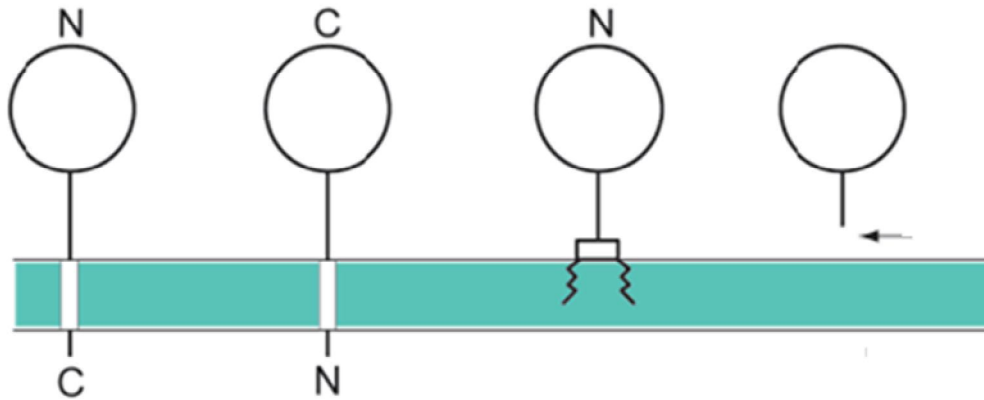


Figura 3. Topología de las ecto-peptidasas. Las ecto-peptidasas unidas a membrana plasmática tienen un dominio intracelular pequeño, un dominio transmembranal y un dominio extracelular grande. Existen peptidasas ancladas a la membrana a través de un motivo GPI, y en algunos casos, las ectopeptidasas no se quedan ancladas en la membrana, sino que por un corte proteolítico o por procesamiento alternativo del RNA primario, éstas se liberan al espacio extracelular.

Otro ejemplo es el captopril, una droga que se puede encontrar en cualquier farmacia y que se usa para tratar la presión alta (hipertensión). Este es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA, 3.4.15.1), una metalopeptidasa que se localiza en la membrana plasmática. El captopril se une al sitio activo de la ectopeptidasa, evitando que hidrolice a su sustrato, la angiotensina I. Si este péptido es hidrolizado por la ECA, se genera la angiotensina II, un péptido con efecto vasoconstrictor. Así, la inhibición de la ECA controla el efecto vasoconstrictor que tiene la angiotensina II en los pacientes con hipertensión (Cushman y Ondetti, 1995). Estos y otros ejemplos muestran claramente que las peptidasas controlan el efecto biológico de los péptidos, y que pueden ser blanco farmacológico para tratar algunas enfermedades (Antczack et al., 2001).

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Comunicación peptidérgica por TRH

2.1.2.- Generalidades

Dentro del sistema nervioso central (SNC) existe también la comunicación peptidérgica. Aquí, los ahora denominados neuropéptidos son secretados al espacio extracelular de una sinapsis para modular la acción postsináptica de un neurotransmisor, pudiendo aumentar o inhibir el efecto del neurotransmisor. La hormona liberadora de tirotropina (TRH) es un tripéptido de secuencia pglu-his-proNH₂ (figura 4) involucrado en la comunicación intercelular en animales. En los mamíferos, TRH es sintetizado en varias regiones del cerebro, incluyendo las neuronas de núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo. Estas neuronas proyectan sus terminaciones nerviosas a la zona externa de la eminencia media, de donde secretan el neuropéptido TRH, el cual viaja a través de un sistema portal hasta la adenohipófisis para inducir la síntesis y liberación de tirotropina y prolactina (Haisenleder, 1992; Squire et al., 2003). Hoy se sabe que el TRH no solo está presente en las neuronas del hipotálamo, sino también en otras regiones del sistema nervioso central tales como el tallo cerebral, el cerebelo, el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, la amígdala, el hipocampo y la zona septal (Jackson, 1983). Además, se expresan en múltiples zonas cerebrales los dos receptores de este péptido, TRH-R1 y TRH-R2, así como una ectopeptidasa que puede reconocer al TRH e inactivarlo (Hinkle et al. 2002, Heuer et al, 1998, Charli et al, 1998). Dicha peptidasa es denominada piroglutamil peptidasa II (PPII). La amplia distribución de los elementos que participan en la comunicación TRHérgica en las células del SNC y los estudios que involucran al TRH en la termorregulación, la memoria, la regulación del dolor, así como en efectos neuroprotectores, antiepilépticos, analépticos y antidepresivos (Horita, 1998, Gary et al., 2003), sugieren un papel neuromodulador de TRH.

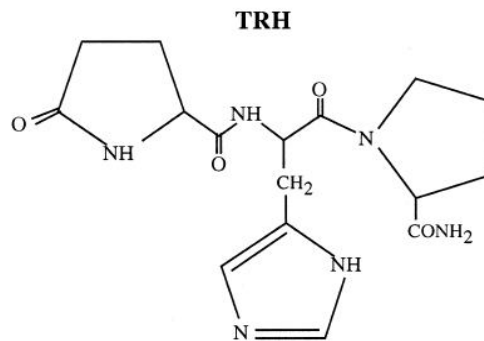


Figura 4.- La hormona liberadora de tirotrópina. TRH es un tripéptido de secuencia piroglutamil-histidil-prolinamida (pGlu-His-ProNH₂). Tomado de Cummins y O'Connor, 1998.

2.2.- Biosíntesis de TRH

Al igual que otros péptidos, el TRH es sintetizado a partir de un precursor que contiene 5 veces repetida la secuencia Gln-His-Pro-Gly en la rata. Mediante el empleo de cultivos primarios hipotalámicos de rata, se ha observado que el procesamiento del precursor de TRH tiene lugar durante el transporte axonal para posteriormente almacenarse 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 las convertasas y la carboxipeptidasa E para generar Gln-His-Pro-Gly; enseguida, la enzima glutaminil ciclasa convierte la Gln a pGlu y finalmente una monooxigenasa alfa-amidante de la peptidoglicina (PAM) forma el extremo NH₂ a partir del Gly (Joseph-Bravo et al., 1998).

2.3.- Receptores de TRH

TRH inicia sus efectos mediante su interacción con receptores membranales. 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 a TRH) y de la adenohipófisis de rata, permitieron mostrar que el receptor de 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 ingles Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor]). Al comparar la secuencia de aminoácidos 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). Adicionalmente, 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 de 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.

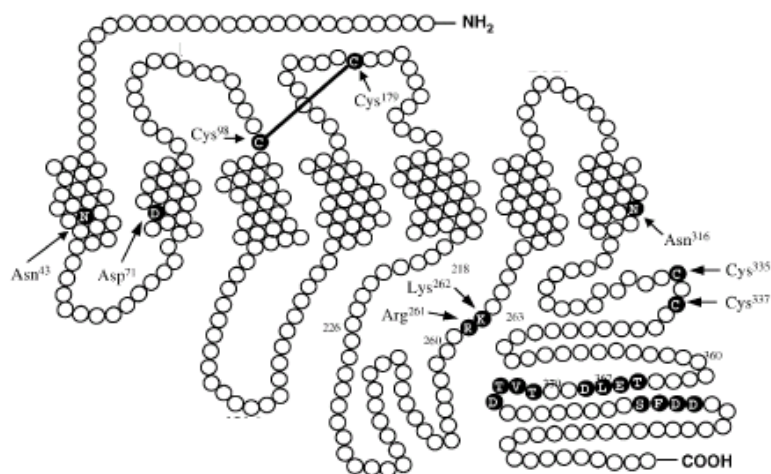


Figura 5.- Representación esquemática del receptor TRH-R1 de rata. El receptor TRH-R1 de rata consta de 411 aminoácidos, algunos de ellos (los señalados) importantes para mantener la función. Tomado y modificado de Pflieger et al., 2004.

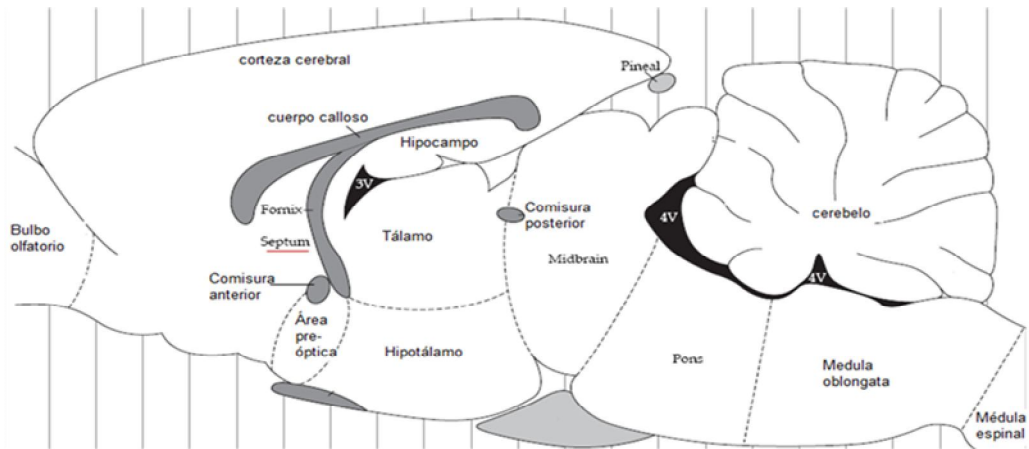
2.4.- Papel de TRH en la analepsia

Hoy se sabe que el tripéptido TRH no solo funciona como una hormona que induce la síntesis y liberación de tirotrópina y prolactina en la adenohipófisis, sino que también es un mediador de otras funciones del SNC (Horita., 1998). Una de las acciones más estudiadas es el efecto analéptico, es decir, la inducción de la salida

de un estado de narcosis. Cuando algunas especies (rata, ratón, hámster, cuyo) son sedadas con etanol ó pentobarbital, la inyección intraperitoneal de TRH disminuye la duración de la narcosis inducida por estas drogas (Breese, et al. 1975 y Cott, et al. 1976). En estas investigaciones también se demostró que el efecto analéptico de TRH se debía a su acción directa sobre el SNC y no a su acción sobre la hipófisis, ya que los ratones a los que se les retira esta glándula siguen respondiendo al efecto analéptico de TRH (Breese, et al. 1975 y Cott, et al. 1976). Más tarde, se demostró que existen varios regiones cerebrales blanco de TRH, ya que la microinyección de TRH en el hipotálamo medial, la sustantia negra y el complejo septum medial-banda diagonal de broca (SM-BDB), antagoniza la narcosis inducida por pentobarbital (Kalivas, 1980). En este estudio, realizado con ratas de la cepa Wistar, la región con mayor sensibilidad al TRH fue el SM-BDB (parte del área septal del cerebro, que se compone principalmente de neuronas colinérgicas), pues se redujo el tiempo de narcosis con dosis desde 5 ng. En general, toda el área septal (que a su vez se divide en SM-BDB y septum lateral, ver figura 6) está involucrada en el control de una variedad de procesos fisiológicos y conductuales relacionados con funciones cognitivas superiores (aprendizaje y memoria), emociones, miedo, agresión, estrés, así como en la regulación autonómica (ingesta de agua/comida, hibernación, osmoregulación, y respuesta inmune humoral) (Paxinos, 1995).

Las lesiones en el septum medial bloquean el efecto analéptico de TRH (Kalivas et al., 1981), lo que corrobora a esta región como su sitio de acción en esta función; la inyección del péptido y la estimulación eléctrica en el septum medial disminuyen el tiempo necesario para el despertar (McCown et al., 1986) y aumenta el contenido de TRH endógeno en el septum medial cuando las ratas se recuperan de una narcosis inducida por etanol (Morzorati y Kubek, 1993). En el septum medial no se sintetiza TRH, por lo que su presencia se asocia a su existencia en terminales nerviosas (Heuer et al., 2000) y en realidad, no se tiene descifrado con certeza de qué regiones proviene. Por otro lado, utilizando técnicas de histoquímica por hibridación *in situ*, se ha encontrado señal positiva contra el ARNm de la PPII en el septum medial; finalmente, mediante autoradiografía y mediante hibridación *in situ*, se han detectado sitios de unión de TRH y señal para los RNAm del TRH-R1 y TRH-R2 en esta región, respectivamente (Manaker et al., 1985, Mitsuma et al., 1999, Heuer et al., 2000).

A



B

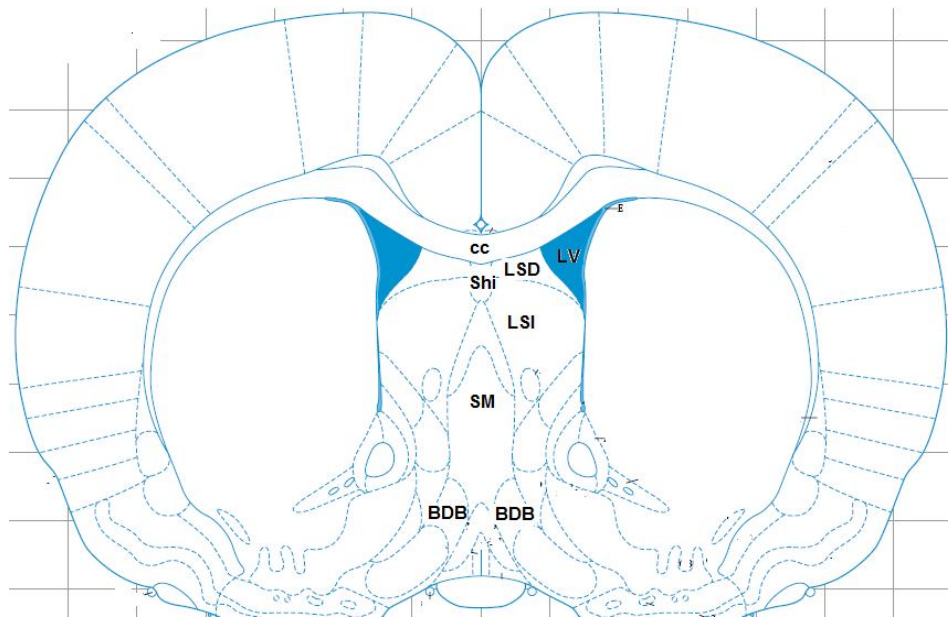


Figura 6.- Ubicación del septum y de las varias regiones septales en el cerebro de rata. A) Vista sagital del cerebro de rata donde se muestra la posición del septum y otras regiones del cerebro. B) Corte coronal del cerebro donde se muestra la posición de las regiones que componen al septum; septum medial (SM), la banda diagonal de Broca (BDB), el septum lateral intermedio (LSI), septum lateral dorsal y el núcleo septohipocampal (Shi). Cc: cuerpo calloso; LV: ventrículo lateral. Tomado y modificado de Paxinos 1995.

2.5.- Degradación de TRH

Varias evidencias sugieren que la degradación enzimática es un mecanismo responsable de regular la señal de TRH una vez liberado al medio extracelular. A continuación se describen algunas enzimas que son capaces de degradar a este péptido *in vitro*.

2.5.1 Degradación por enzimas citosólicas

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 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, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y TRH (Walter, 1976). Por su parte, la PPI es una enzima de tipo cistein proteasa 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, de la adenohipófisis de bovino y de rata, del hígado de rata, de la corteza cerebral humana y del riñón humano (Cummins y O'Connor, 1998). La PPI hidroliza un amplio espectro de sustratos con residuo pGlu en el extremo amino terminal. Estos sustratos incluyen a TRH, GnRH, 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, pero que no funcionan como enzimas reguladoras de la actividad de TRH u otros péptidos liberados al espacio extracelular.

2.5.2.- 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 de TRH (Bauer y Nowak, 1979). Se encontró que la enzima tiene características bioquímicas muy distintas a las de la enzima citosólica PPI. Esta enzima soluble no es inhibida por agentes bloqueadores de grupos sulfhidrilo, pero es inhibida por quelantes de metal (lo que sugirió que es una metalopeptidasa). Su actividad es óptima a pH neutro y 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 sustratos 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 hipotálamo-hipofisis, en donde el péptido entra en contacto con la sangre posteriormente a su liberación por la eminencia media (Charli et al., 2006).

2.5.3.- Degradación por la Piroglutamil peptidasa II (PPII)

En las membranas sinaptosomales de cerebro de rata existe una actividad enzimática capaz de inactivar al TRH (Joseph-Bravo et al., 1979); ésta corresponde a una hidrolasa que corta el enlace peptídico pGlu-His de 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). 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 médula espinal y varios órganos como la adenohipofisis (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 de PPII. En el cerebro se ha demostrado que algunas de las regiones con mayor densidad de TRH-R contienen altos niveles de actividad de la PPII (Vargas et

al., 1987; Vargas et al., 1992 a). Cabe mencionar que la tiroliberinasa y la PPII son codificadas a partir del mismo gen, pero por mecanismos aun no descritos, una forma se libera al espacio extracelular, mientras la otra se queda embebida en la membrana plasmática (Schmitmeier et al., 2002).

2.6.- Las propiedades bioquímicas de la PPII sugieren que es la enzima responsable de inactivar al TRH

Previo a la obtención de la secuencia primaria de la PPII, ya se suponía que la actividad de PPII dependía de algún metal, ya que la actividad se inhibe cuando se agregan quelantes de metal (Bauer et al., 1981). La secuencia proteica de esta enzima solo ha podido ser deducida a partir del ADNc de la PPII, pero concuerda con el supuesto de que es una ectopeptidasa dependiente de zinc. La PPII muestra además una topología que la sitúa estratégicamente para reconocer al TRH e hidrolizarlo en el espacio extracelular, por ejemplo, en las sinapsis del cerebro donde el TRH ha mostrado múltiples efectos farmacológicos (Gary et al., 2003). 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 una gran región extracelular con la secuencia consenso His-Glu-X-X-His y un segundo Glu separado por 18 aminoácidos característicos de las zinc metalopeptidasas. 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, Chávez-Gutiérrez et al., 2005) (figura 7). La PPII ya ha sido purificada del cerebro de rata y de porcino en donde está presente como un homodímero (Bauer et al., 1994).

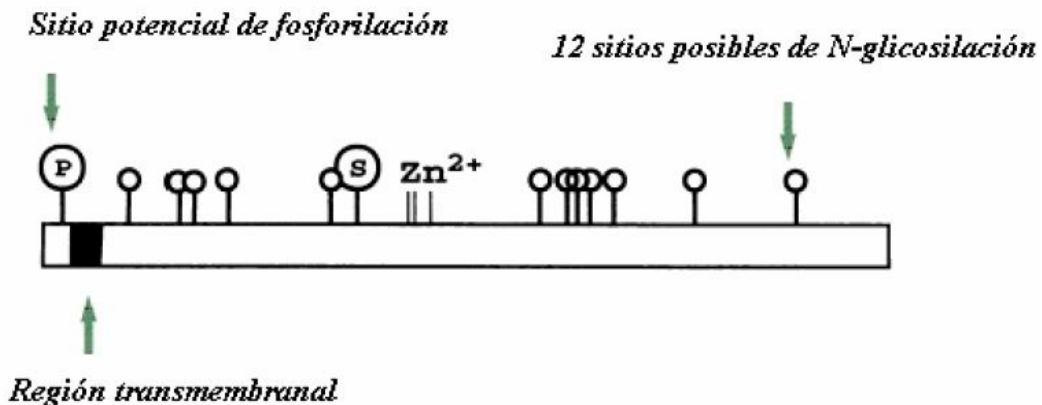


Figura 7.- Topografía de la PPII deducida a partir de la secuencia de un DNAc de la PPII. La enzima tiene una región intracelular N terminal pequeña, una región transmembranal y un dominio C-terminal dirigido hacia el espacio extracelular donde se encuentra su sitio catalítico. S: Sitio posible de sulfatación. Tomado y modificado de Schauder et al., 1994.

Es una enzima de alta especificidad (a diferencia de muchas otras peptidasas); hidroliza péptidos no mayores a 4 aminoácidos y con secuencias muy parecidas a las de 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). Esta enzima, además, tiene actividad óptima a pH neutro.

2.7.- La PPII es un miembro de la familia de metalo peptidasas de tipo 1 (M1)

La familia M1 de zinc metalopeptidasas está caracterizada por contener dos secuencias conservadas en el dominio catalítico, el motivo de unión al zinc (HEXXH-(X18)-E) y el motivo GXMEN de exopeptidasas. En humanos, y roedores, la familia M1 consiste alrededor de 10 enzimas, cinco de las cuales son proteínas transmembranales, incluyendo a la PPII (tabla 2). Son aminopeptidasas ya que cortan el extremo amino de los sustratos a excepción de la PPII que es una omegapeptidasa (enzimas que cortan el residuo pGlu N-terminal del péptido).

Tabla 2.- Ectopeptidasas de la familia Metalo 1 (M1). Se muestran las secuencias de aminoácidos de la región catalítica que son conservados en esta familia (arriba) así como los miembros que son ectopeptidasas y sus sustratos (abajo). En la parte superior, los residuos en negritas son los que unen al zinc. Cinco de las enzimas son ectopeptidasas (las de la tabla), mientras las otras cuatro no. PPII = piroglutamil peptidasa II; APN = aminopeptidasa N; APA = aminopeptidasa A; A-LAP = leucin aminopeptidasa derivada de leucocitos; P-LAP = leucin aminopeptidasa placentar; L-RAP = aminopeptidasa derivada de leucocitos; PSA = Aminopeptidasa sensitiva a puromicina; APB = Aminopeptidasa B; LTA4H = Leucotrieno A4 hidrolasa.

```

PPII  QFSPT--YLLAW--AAMENWGLSIF--VIVHEICHQWFGDLVTPVWVEDVWLKEGF--IAYKKG
APN   QMQAA--YLLAF--GAMENWGLVTY--VIAHELAHQWFGNLVTIEWWNDLWLNEGF--ISYSKG
APA   DHEPT--YLVCF--GAMENWGLVTY--VVAHELVHQWFGNTVTMDWDDDLWLNEGF--ISYSKG
A-LAP QFEPT--YLVAF--GAMENWGLTTY--TVSHELAHQWFGNLVTMEWWDLWLNEGF--VSYEKG
P-LAP QFEPL--YLVAF--GAMENWGLLTF--IIAHELAHQWFGNLVTMKWWDLWLNEGF--LSYFKG
L-RAP DFEPT--YLVAY--GAMENWGLITY--VIAHELAHQWFGNLVTMEWWDIWLNEGF--VSYNKG
PSA   QFEAT--YLVAF--GAMENWGLVTY--VVGHELAHQWFGNLVTMEWWTHLWLNEGF--ISYSKG
APB   QGQAV--YLIAL--GGMENPCLTFV--VIIHEISHSWFGNLVTNANWGFFWLNEGF--TPYEKG
LTA4H QCQAI--YLIAL--GGMENPCLTFV--VIAHEISHSWTGNLVTNKTWDHFWLNEGH--VPYEKG

```

dominio exopeptidasa dominio catalítico

Enzima transmembranal	EC	Ejemplo de sustrato
Piroglutamil peptidasa II (PPII)	3.4.19.6	TRH
Aminopeptidasa N (APN)	3.4.11.2	Angiotensina III, encefalina
Aminopeptidasa A (APA)	3.4.11.7	Angiotensina III, colecistoquinina 8
Leucin aminopeptidasa derivada de adipocitos (A-LAP)	3.4.11.-	Angiotensina II y III, kalidina
Aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP)	3.4.11.3	Vasopresina, oxitocina, encefalinas

En general, las enzimas de esta familia participan en los procesos de señalización intercelular mediante la degradación ó generación de péptidos biológicamente activos (Albiston et al., 2004). Cabe señalar que aunque se conocen muchos de los sustratos de estas enzimas (mediante ensayos *in vitro*), no se ha dilucidado claramente si esto pasa *in vivo*. Finalmente, cabe señalar que algunas de estas enzimas tienen isoformas que son solubles, y que además pueden formar homodímeros (Albiston et al., 2004).

2.8.- Inhibición de la PPII

2.8.1.- Inhibición *in vitro*

La inhibición de peptidasas tiene aplicaciones médicas ya que se puede potenciar el efecto benéfico del péptido. Para cada tipo de proteasa se pueden encontrar inhibidores (naturales ó sintéticos) específicos, que reconocen específicamente algún aspecto particular de la estructura de cada proteasa. 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*. El CPHNA (N-(α -carboxi-2-feniletil)-N^{im}-benzil-histidil- β NA) fue el primer inhibidor sintético de la PPII. La incubación de rebanadas del cerebro de rata en presencia de CPHNA incrementa la cantidad de TRH recuperado, tanto en condiciones basales, como despolarizantes, indicando que los niveles de TRH en el medio extracelular se incrementan debido a la inhibición de la actividad PPII (Charli et al., 1989). Cabe mencionar que este inhibidor es poco potente y que muestra efectos inespecíficos sobre la liberación de neurotransmisores clásicos, lo que dificulta su empleo en el SNC en paradigmas relacionados con la inhibición de la PPII. Mediante estudios cinéticos para determinar la especificidad de la PPII, usando una gama de péptidos en donde se sustituye el residuo de histidina de 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* (definida como la concentración de inhibidor a la cual se inhibe 50% la actividad de la enzima) de 17.5 μ M y 0.97 μ M respectivamente (Kelly et al., 2000). Recientemente, se ha publicado la síntesis de un inhibidor de la PPII de tipo fosfínico (Matziari et al., 2008) y la identificación de la actividad inhibitoria de una entidad molecular aun no caracterizada químicamente en el extracto de un anélido marino denominado HcPI (Pascual et al., 2004). Los inhibidores de tipo fosfínico son muy parecidos a los sustratos de las enzimas, ya que se hace una sustitución del enlace peptídico (CO-NH) por el enlace PO₂-CH₂. Con base en estos antecedentes, se sintetizó el inhibidor TRH-fosfínico, a partir de la estructura de TRH, en donde la única diferencia entre estas dos moléculas radica en la sustitución del enlace peptídico (CO-NH) del pGlu-His de TRH por el enlace (PO₂-CH₂). La *K_i* de este inhibidor es de 70 nM. Mediante el empleo del HcPI y de TRH-fosfínico se ha demostrado que la inhibición de la PPII potencia el efecto que TRH

tiene sobre la secreción de prolactina en cultivos primarios de adenohipófisis (Cruz et al., 2008).

2.8.2.- Inhibición *in vivo*

La relevancia de la PPII *in vivo* solo ha sido probada en el contexto del control de la secreción de tiotropina mediada por TRH. La inyección intraperitoneal de inhibidores de PPII no cambia la liberación basal de TSH, pero incrementa los niveles de TSH sérica inducida por frío o por el TRH inyectado ip (Sanchez et al., 2009, Scalabrino et al., 2007). Debido a que la actividad de PPII es baja en la pituitaria anterior (Vargas et al., 1987), y además que los tiotropos (células de la pituitaria que secretan TSH en respuesta a TRH) no expresan a la PPII (Cruz et al., 2008), esta enzima parece tener un papel menor en esta glándula para el control de la secreción de TRH. Por otro lado, en la eminencia media esta enzima está expresada en los tanicitos, localizada con potencial acción inactivadora de TRH una vez liberado en la proximidad del sistema portal, y su inhibición aumenta la recuperación de TRH liberado *in vitro* (Sanchez et al., 2009). De esta manera, en esta articulación la inactivación de la señal de TRH ocurre preferencialmente en el sitio de liberación y no en el sitio de acción.

La inyección intraperitoneal de un péptido que tiene la propiedad de inhibir a la PPII y de funcionar como agonista del receptor de TRH, mimetiza y aumenta la actividad espontánea inducida por TRH y su administración intravenosa revierte la duración de narcosis inducida por pentobarbital (Scalabrino et al., 2007). Sin embargo estos resultados no clarifican la importancia del papel de la PPII ya que por la acción dual de este péptido no se distingue si los efectos observados se deben a la inhibición de la PPII y/o a la activación del receptor. Así, aparte de los estudios en la eminencia media, el papel de la PPII en la inactivación de TRH en el cerebro *in vivo* no se ha confirmado hasta el momento.

3.- Planteamiento del problema-Hipótesis

La evidencia bioquímica apunta a la PPII como enzima responsable de inactivar al TRH en el espacio extracelular. Sin embargo, esto solo se ha confirmado *in vivo* en el caso de la eminencia media del hipotálamo, en donde se sugiere que el TRH es degradado posteriormente a su liberación y previamente a su entrada a los vasos portales. En el resto del cerebro, en donde la comunicación no es de tipo hormonal, no se conoce la relevancia de la PPII *in vivo*. Para demostrar el papel de la PPII en la regulación de la eficacia de TRH extracelular *in vivo*, usaremos como paradigma experimental el antagonismo que el TRH ejerce sobre la narcosis inducida por etanol en la rata. Se sabe que la microinyección de TRH en zonas particulares del cerebro induce el despertar de un estado de narcosis en ratas, y que el septum medial-BDB, es el sitio del SNC de mayor sensibilidad al TRH para este efecto. En esta región se libera el péptido TRH y se expresan los elementos de la comunicación TRHérgica (receptor y enzima que inactiva al TRH). Si la PPII es la encargada de inactivar a TRH en el espacio extracelular, un inhibidor específico de esta enzima reproducirá los efectos de TRH exógeno sobre el despertar en un sueño narcótico y/o amplificará los efectos de TRH endógeno.

4.- Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es analizar las consecuencias fisiológicas de la inhibición de la PPII del septum medial en un paradigma de analepsia.

4.1.- Objetivos particulares

- Optimizar un paradigma de analepsia en ratas (cepa Wistar), evidenciando el efecto de una inyección de TRH en el SM sobre el acortamiento de la duración de la narcosis inducida por etanol.
- Determinar el efecto de la microinyección de TRH, inhibidor de PPII y TRH en conjunto con un inhibidor de la PPII, sobre la duración de narcosis inducida por etanol

5.- Estrategia experimental

Para comprobar nuestra hipótesis, utilizamos a la rata (*Rattus norvegicus*), en particular porque la mayoría de los estudios relacionados con la comunicación TRHérgica han sido realizados en este modelo, y además porque es todavía el modelo de mamífero más estudiado en neurociencias para el cual existen muchos antecedentes. Las drogas de interés se probaron en la cepa Wistar, porque es la cepa que está en el bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para determinar el efecto analéptico de TRH se utilizaron 3 modelos experimentales: ratas **intactas** (que permanecieron en su jaula en grupo y solo se manipularon días antes del experimento de sedación), ratas con cánulas implantadas una semana antes del experimento en un ventrículo lateral (**intra-cerebroventricular; icv**) y ratas con cánulas implantadas en el septum medio (**intra-septal**). En los primeros dos modelos se verificó que nuestra cepa de ratas respondiera al efecto analéptico de TRH vía intraperitoneal (ip), o directamente sobre el SNC (icv), ante una sedación por etanol. En las ratas con implantación intra-septal, se estudió el efecto analéptico de TRH solo y en presencia de un inhibidor de la PPII, inyectados directamente en el SM.

6.- Metodología

6.1.- Material biológico

En todos los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (270-350 g), las cuales se mantuvieron en condiciones controladas de luz-oscuridad (ciclo de 12 h, con luz de 7AM a 7 PM), con acceso a agua y alimentos *ad libitum*. Estos animales fueron proporcionados por el Bioterio del Instituto de Biotecnología, UNAM, y colocados en un cuarto cercano al cuarto experimental en jaulas de 3 a 4 animales. Los animales se manipularon tres días antes de los experimentos para disminuir el estrés por manipulación el día del experimento.

6.2.- Drogas

El etanol utilizado para inducir sedación en los animales fue de la marca Merck, grado análisis. Los péptidos utilizados (pGlu-His-ProNH₂ (TRH), pGlu-Asn-ProMCA (inhibidor PPII), pGlu-Asp-ProNH₂) se obtuvieron de las casas comerciales "Bachem" y "Peptides International". El inhibidor TRH-fosfínico fue donado por el Dr. Athanasios Yotakis, Laboratorio de Química Organica, Departamento de Química, Universidad de Athenas, Grecia. Todos los péptidos fueron sometidos a un análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para corroborar su integridad.

6.3.- Narcosis inducida por etanol

Para inducir una narcosis mediante una inyección intraperitoneal (ip) de etanol en nuestra cepa de ratas, los animales fueron administrados con dosis de etanol que se reportan efectivas para inducir sedación (las ratas no se pueden detener sobre sus cuatro patas si la sedación es efectiva) (Morzorati y Kubek, 1992, McCown et al., 1986). Dependiendo de la condición del animal en nuestros experimentos (intacto, implantado intracerebroventricularmente ó intra septal), se estandarizaron dosis que anestesiaran a los animales un tiempo suficiente para que se pudiesen observar diferencias en los tiempos de narcosis entre los diferentes grupos (narcosis de 100-130 minutos de duración para los controles). Para los animales intactos, fue suficiente anestesiarlos con 2 g/kg de etanol. Para los que tenían una cánula icv se necesitaron 3 g/Kg y para los implantados intra-septal, 2.7 g/kg de etanol. En todos los casos la inyección ip se realizó a una velocidad aproximada de 8 mL/minuto con

el etanol disuelto al 12% en solución salina al 0.9% (PISA), para disminuir la irritación producida por el etanol. El final de la inyección se consideró como el tiempo cero y una vez terminada ésta, cada rata se colocó en una caja individual y se midió en minutos la duración de la narcosis. Se consideró como recuperación de la narcosis cuando las ratas se mantuvieron firmes sobre sus patas por un lapso mayor a 15 segundos.

6.4.- Implantación de una cánula

La realización de nuestros objetivos pasa por un estudio directo sobre el SNC; para ello, las ratas fueron implantadas con una cánula guía de acero inoxidable en dos regiones diferentes del cerebro: en el ventrículo lateral derecho (intra-cerebroventricular) y sobre el septum medial (intra-septal). La implantación de una cánula guía permite microinyectar moléculas de interés en diferentes regiones del cerebro y estudiar su efecto sobre algún comportamiento de los animales *in vivo*.

Para ello, las ratas se anestesiaron utilizando ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) vía intramuscular (sobre el músculo de la parte superior de la pata derecha del animal). Posteriormente la cabeza de cada animal se fijó en un aparato estereotáxico (KOPF instruments) introduciendo en ángulo recto una barra en cada uno de los canales auditivos y fijando en el mismo plano los dientes a un soporte para los incisivos. Posteriormente se realizó un corte de piel a lo largo de la cabeza (1.5 a 2 cm) para dejar al descubierto el cráneo. Con espátulas de acero inoxidable y la ayuda de antiséptico en spray (digluconato de clorhexamida) e hisopos estériles, se eliminó el tejido presente sobre el cráneo (periosteo) y se limpió para localizar la línea interaural y el bregma, con respecto al cual fue localizada la región del septum medial o el ventrículo lateral de acuerdo a un atlas (Paxinos y Watson, 1986). Utilizando un taladro se realizaron tres orificios, uno de ellos para introducir la cánula guía (22 g, 6 mm largo), de 1.5 mm de diámetro y otros dos de 1 mm de diámetro aproximadamente (para introducir minitornillos); se limpiaron los restos del cráneo con el antibiótico y mediante el aparato estereotáxico se introdujo la cánula a una velocidad aproximada de 0.3 mm por segundo. La cánula se fijó al cráneo con la inserción de los dos minitornillos y cemento dental. La cánula fue temporalmente ocluida con una tapa (dummy cánula). Después de la cirugía los animales se

mantuvieron en cajas individuales entre seis y siete días hasta el día del experimento.

En el caso de la implantación icv, se utilizaron como referencia las coordenadas: +9.2 mm en el eje anterior-posterior, -1.1 mm en el eje medial-lateral, y -3.6 mm en el eje dorso-ventral con respecto al Bregma.

En el caso de la implantación intra-septal, se utilizaron inicialmente como referencia las coordenadas: +9.2 mm antero-posterior, 0.0 mm medial-lateral y -6.0 mm dorsoventral respecto al Bregma. La coordenada 0.0 mm medial-lateral se escogió, ya que el septum medial está localizado medialmente, justo en el centro del hemisferio izquierdo y el derecho. Se hace entonces un orificio justo en la línea imaginaria que parte al cráneo en ambos hemisferios para introducir la cánula (26 g, 7 mm largo). Con este procedimiento, la cánula guía y el microinyector (una pequeña jeringa que se introduce a través de la cánula guía) fueron introducidos -6 mm en el eje dorso-ventral para llegar al septum medial. Esto daña el núcleo septohipocampal. Se ha demostrado que las lesiones en el núcleo septohipocampal abaten el efecto analéptico de TRH (Kalivas et al., 1981). Por ello, es importante mantener lo más intacto posible este núcleo, evitando interferir con nuestros propósitos experimentales. En nuestras manos, cuando se implantó la cánula guía de esta manera se dañó el núcleo septohipocampal y las ratas no respondieron al efecto de TRH (datos no mostrados). Por lo tanto la cánula guía tuvo que ser introducida a +9.2 mm en el eje antero-posterior, a 1.7 mm de distancia (lado izquierdo) de esta línea imaginaria (en el eje medio-lateral), con una inclinación de 14° sobre el eje vertical y a -2.7 mm en el eje dorso-ventral (figura 8). Con esto, la punta de la cánula queda a 3 mm de distancia del septum medial, lo que reduce el daño en la zona septal pero principalmente en el núcleo septohipocampal. No obstante que la punta de la cánula queda lejos del septum medial, el microinyector es 3 mm más largo que la punta de la cánula, y permite inyectar las drogas en el momento del experimento justo arriba del septum medial, lesionando el área septal y el núcleo septohipocampal al mínimo y solo hasta el momento de la microinyección.

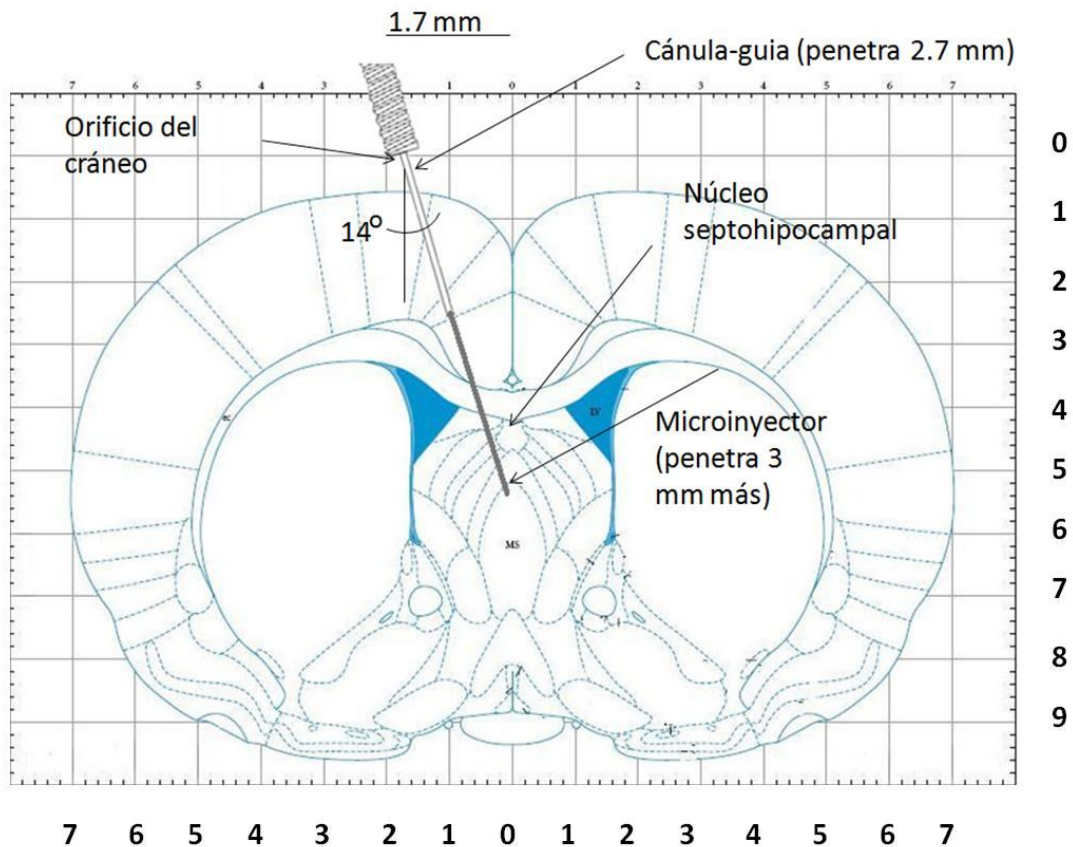


Figura 8.- Estrategia de implantación para la microinyección intra-septal. Se muestra cómo se implantó la cánula guía en los animales para evitar dañar el núcleo septohipocampal. El daño de este núcleo abate el efecto analéptico de TRH. Los números del marco representan distancia en milímetros.

6.5.- Protocolo de analepsia

El protocolo de analepsia consiste en inducir una sedación, en este caso con etanol, y minutos más tarde administrar el analéptico, TRH (u otra droga), para determinar el efecto que tiene sobre la duración de la narcosis. El protocolo tuvo ligeras variaciones en cuanto a la dosis de etanol y al tiempo previo a la administración de las drogas de interés, dependiendo de si se practicó a animales intactos, implantados con una cánula-guía icv o intra-septal (figura 9). Dichas variaciones se detallan a continuación.

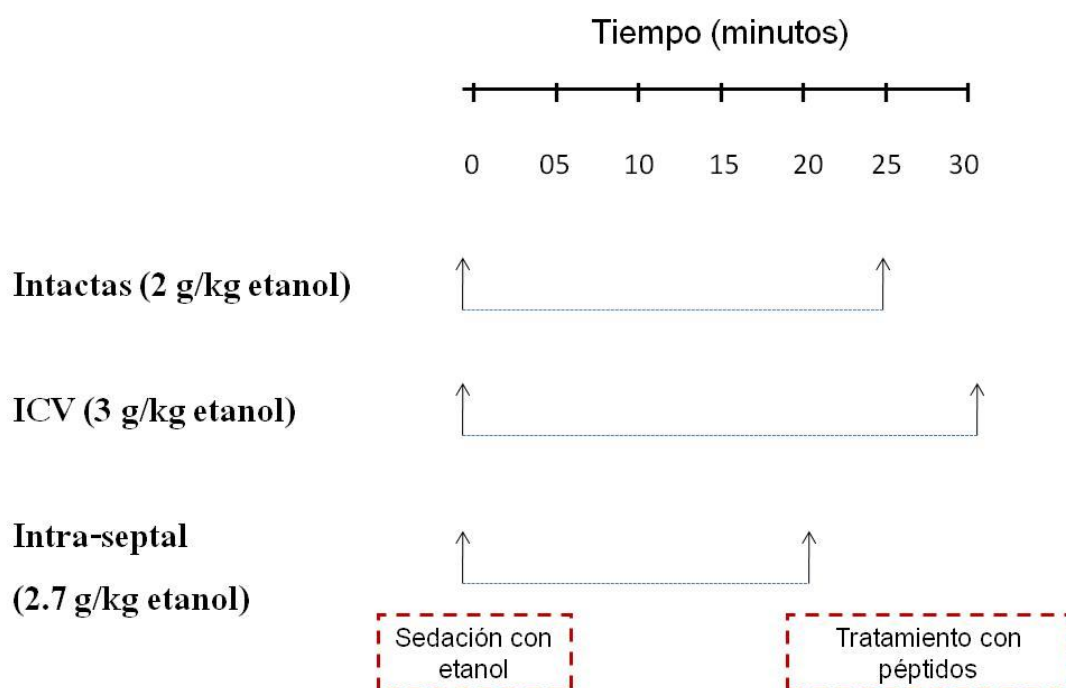


Figura 9.- Variaciones en el protocolo de analessia, de acuerdo al sitio de inyección de los péptidos. En general, todos los grupos fueron administrados con una dosis de etanol suficiente para que no se pudieran sostener sobre sus cuatro patas y minutos más tarde se administro TRH y/o las drogas de interés.

6.5.1 Efecto ip de TRH

Para determinar el efecto de TRH exógeno administrado ip, sobre la duración de la narcosis, ratas intactas fueron anestesiadas con etanol (2 g/Kg de peso) vía ip. Veinticinco minutos después se practicó una segunda inyección (ip); al grupo control se le administró el vehículo (solución salina al 0.9 %), al segundo, tercero y cuarto grupo se les inyectó TRH en dosis de 3, 10 y 30 mg/kg respectivamente. Se colocaron en cajas individuales y se midió el tiempo requerido para la salida de la narcosis.

6.5.2.- Efecto de TRH y de otras drogas sobre el SNC

Todos los péptidos fueron disueltos en un vehículo conformado por solución salina al 0.9% libre de pirógenos (Sigma), excepto cuando se realizaron experimentos donde se empleó el inhibidor de la PPII "TRH-fosfínico", en donde el vehículo empleado para disolver las drogas fue líquido cerebroespinal (LCF; 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl,

1.25 mM NaH₂ PO₄, 7 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 25 mM glucosa).

6.5.3.- Efecto de TRH icv e intra-septal.

Cuando se determinó el efecto de la microinyección icv de TRH sobre la duración de narcosis, las ratas fueron anestesiadas ip con etanol (3 g/kg). 30 minutos después los animales recibieron una microinyección de solución salina ó 5 ug de TRH en solución salina. En el caso de la administración de péptidos intra-septal la sedación con etanol adecuada se logró con 2.7 g/kg, y la administración de TRH y otras drogas (pGlu-Asn-ProMCA, TRH-fosfínico, pGlu-Asp-ProNH₂) se realizó 20 minutos después. En ambos protocolos, una vez hechas las inyecciones de etanol, se retiró de la caja a cada animal para realizar las microinyecciones. Para esto se retiró la tapa de la cánula, e inmediatamente se colocó un microinyector de acero inoxidable dentro de la cánula-guía (28 g, 7 mm largo ara la icv y 33 g 10 mm largo). Las drogas se administraron en un volumen final de 1 µL icv y 2 µL intra-septal y se inyectaron activamente mediante el empleo de una jeringa Hamilton de 20 µL conectada a un minitubo de polietileno de aproximadamente 15 cm que a su vez se conectó al extremo inicial del microinyector. Se retiraron las tapas de oclusión y se introdujo el microinyector en la cánula-guía. La difusión del vehículo conteniendo los péptidos se logró gracias a una bomba de infusión (Bioanalytical Systems Inc., MD-1001) y un minitubo que microinyectó a una velocidad de 0.5 µL/min. Además dentro del minitubo se introdujo una pequeña burbuja de aire para tener una indicación visual del movimiento del vehículo. Una vez transcurrido el tiempo de la microinyección, se apagó la bomba y el microinyector se dejó en el lugar por 30 segundos para permitir la difusión de la solución del sitio de la microinyección; finalmente, se retiró el microinyector y las ratas se regresaron a las cajas. Se registró en video el transcurso del experimento y se analizaron los tiempos de anestesia considerándose la recuperación de la anestesia cuando los animales se mantuvieron firmes sobre sus patas por un lapso de 15 segundos. Después los animales se sacrificaron por decapitación, se obtuvieron los cerebros que se congelaron a -70° C. Posteriormente se confirmó la posición de la cánula guía mediante la disección de los cerebros en un criostato (rebanadas de 20-25 µM) y comparando con las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson, 1986.

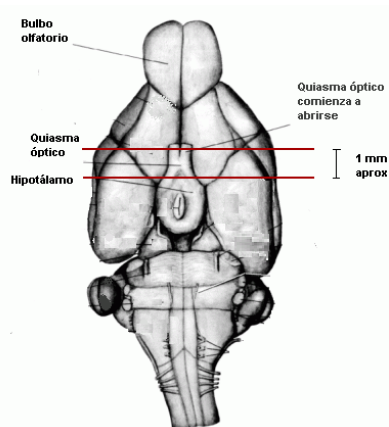
6.6.- Efecto de la microinyección *in vivo* del inhibidor de PPII pGlu-Asn-PromCA sobre la actividad específica de PPII.

Los animales previamente implantados con una cánula intra-septal, y manipulados tres días antes del experimento, fueron sometidos a una microinyección, sin anestesia previa con etanol. Los animales recibieron una microinyección de solución salina al 0.9 % ó 5 µg del inhibidor pGlu-Asn-PromCA en 2 µL. 5 y 15 minutos después se sacrificaron por decapitación todos los animales, extrayéndose el cerebro que se congeló a -70 °C.

6.7.- Extracción del septum medial a partir del cerebro de los animales.

Sobre una caja de Petri se colocó el cerebro congelado con la vista dorsal hacia arriba, se dejó reposar un minuto aproximadamente para que se descongelara un poco y con una navaja de un solo filo se realizó un primer corte transversal donde los nervios ópticos comienzan a abrirse. Luego se realizó un segundo corte aproximadamente 1 mm posterior al primer corte (figura 10). En esta rebanada, se disecó el septum medial mediante un microsacabocados de 0.5 mm de diámetro interno. Los tejidos fueron homogenizados con ultrasonido en 200 µL de buffer fosfatos de sodio 50 mM y centrifugados a 1 000 g. Se desechó la pastilla y el sobrenadante se utilizó inmediatamente para la cuantificación de proteína y la medida de la actividad específica de la PPII (pmol de producto/mg de proteína).

A



B

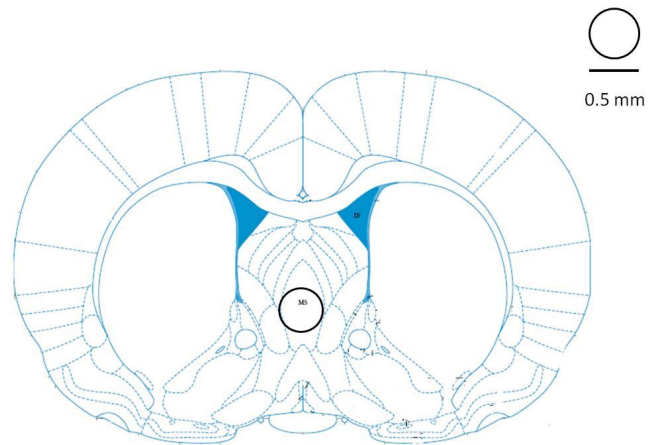


Figura 10.- Representación gráfica de la manipulación del cerebro de ratona para obtener el septum medial. A.- Vista ventral del cerebro de ratona donde se representan estructuras visibles como el quiasma óptico y el hipotálamo; se muestra en rojo la posición de los cortes realizados para obtener una rebanada de aproximadamente 1 - 0.8 mm de grosor aproximadamente. B.- Esquema de las estructuras presentes en la rebanada de cerebro obtenida que indica el sitio donde se hizo la disección (todo el interior del círculo negro) para obtener el septum medial.

6.8.- Cuantificación de proteína total.

Para conocer la cantidad de proteína presente en el extracto del septum se siguió el método descrito (Bradford, 1976). Brevemente, se realizó una curva estándar para cada ensayo con concentraciones crecientes conocidas de albúmina sérica bovina (BSA; Sigma) a partir de una solución stock de 0.2 $\mu\text{g}/\text{uL}$ con un volumen constante de reactivo de ensayo de proteína (Reactivo de Bradford; BioRad Labs.) y completando con agua bidestilada para un volumen final de 1 mL (tabla 3). Las mezclas conteniendo las muestras experimentales se prepararon con 20 uL por duplicado de extracto de septum mencionado anteriormente (para esto se diluyó 1:10 en buffer fosfatos), 200 uL de reactivo de Bradford y 780 uL de agua bidestilada. Tanto las muestras experimentales como las mezclas para la curva estándar se prepararon por duplicado, se agitaron en vórtex y se incubaron a temperatura ambiente por lo menos 5 minutos previos a la lectura de su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU-650).

Tabla 3. Preparación de la curva estándar para la determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford. Cada una de las mezclas se preparó por duplicado. Las mezclas se agitaron en vortex y se incubaron por cinco minutos previamente a su lectura en un espectrofotómetro.

Volumen de agua (µL)	Volumen de solución de BSA 0.2 ug/uL (µL)	Volumen de reactivo de Bradford (µL)	Concentración final de BSA (µg/mL)
797.5	2.5	200	0.5
795	5	200	1
790	10	200	2
780	20	200	4
770	30	200	6
760	40	200	8
750	50	200	10
740	60	200	12
730	70	200	14
720	80	200	16
710	90	200	18
700	100	200	20

6.9.- Medida de la actividad enzimática de la PPII

Se determinó la actividad enzimática de la PPII a partir de tejido previamente extraído por fluorimetría que consiste en utilizar al sustrato fluorogénico TRH-MCA (pGlu-His-ProMetilcuomarina), así como un exceso de la enzima DPP IV (Kelly et al., 1999). El fundamento de este ensayo es el siguiente: la PPII hidroliza el enlace peptídico pGlu-His de TRH, lo que genera el producto pGlu más el His-Pro-MCA. Posteriormente el enlace Pro-MCA del His-Pro-MCA es hidrolizado por la enzima

DAP IV. 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 fosfatos fue la siguiente:

-20 μg de una preparación de proteínas de membranas

-20 μL de DPP 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) en producto por minuto.

- 5 μL de bacitracina (Sigma) y N-etilmaleimida (Sigma) conteniendo 1 mM de cada una (20 μM final). La bacitracina y la N-etilmaleimida son inhibidores de la enzima Prolin endopeptidasa y la enzima Piroglutamil peptidasa I respectivamente, enzimas citosólicas que pueden degradar al TRH *in vitro*. Se completó el volumen a 240 μL con buffer fosfatos 50 mM, pH 7.5. Esta mezcla se preincubó durante 10 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$, se adicionaron 10 μL de sustrato (TRH-MCA, 40 μM final) y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos para determinar la cinética de la reacción. 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 3 minutos (para precipitar componentes que puedan interferir con la lectura de fluorescencia). El sobrenadante se utilizó para medir la fluorescencia en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS 508 Shelton, con los parámetros: 370 nm de excitación y 440 nm de emisión. Para realizar las lecturas de fluorescencia fue necesario preparar una curva estándar de concentraciones conocidas de MCA para calibrar el espectrofluorómetro. Se preparó el blanco que contenía solo buffer fosfatos y metanol en una relación 1:1 así como concentraciones de 50, 100 y 200 picomoles de MCA.

6.10.- Estadística

Los datos representan la media \pm el valor de error estándar (ES). Se determinó la significancia estadística usando el análisis de varianza ANOVA, seguido de una prueba de Fisher. Cuando se compararon las diferencias entre los promedios de dos grupos, se empleó una prueba de "t". Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P < 0.05$.

7.- RESULTADOS

7.1.- Efecto de la inyección ip de TRH sobre la duración de la narcosis inducida por etanol.

Como primer paso, se determinó el efecto de la administración ip aguda de dosis de etanol que permiten sedar a las ratas (de manera que no se pueden detener sobre sus cuatro patas) durante alrededor de una a dos horas. Necesitamos que los animales pudieran ser sedados un tiempo tal que se pudiesen ver fácilmente la disminución del tiempo de narcosis por la administración de TRH. La figura 11a muestra que de manera similar a lo reportado, estas dosis de etanol fueron suficientes para generar en los animales narcosis, caracterizada por la pérdida del reflejo de mantenerse sobre sus 4 patas (McCown et al., 1986, Correa et al., 2001). Para determinar que el TRH puede antagonizar el efecto analéptico del etanol, de manera inicial se probó que esto se lograra mediante una inyección ip de TRH algunos minutos después de la inyección de una dosis de etanol. En concordancia con estudios previos que indican que la administración ip de TRH antagoniza la narcosis inducida por etanol (Cott et al. 1975), se observó una disminución en el tiempo de la narcosis en los tres grupos tratados con TRH de una manera dosis dependiente (figura 11b).

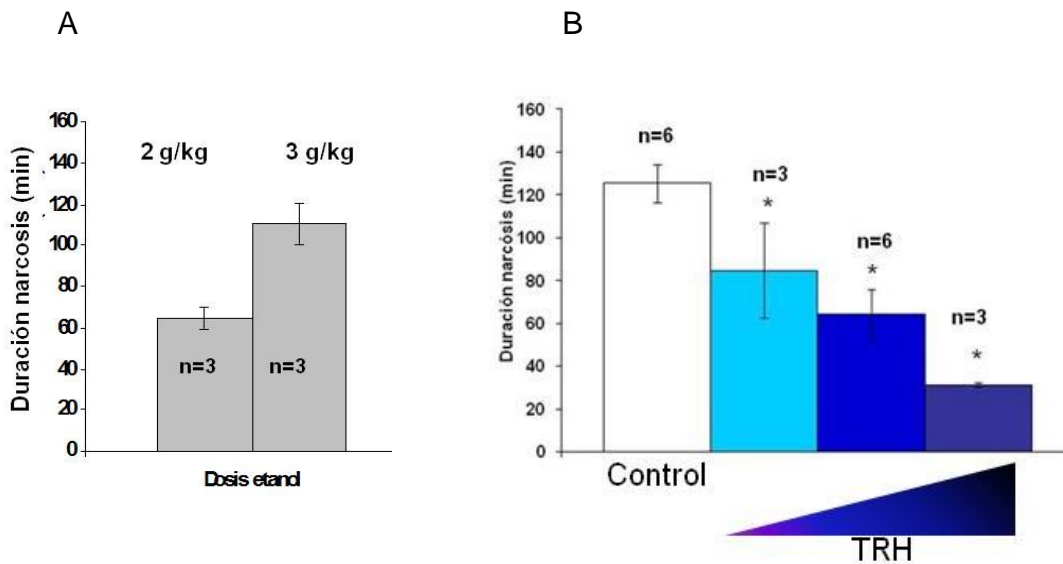


Figura 11.- Efecto de la inyección ip de etanol y TRH sobre la duración de la narcosis en ratas.

A.- Las ratas fueron inyectadas ip con etanol (2 y 3 g/kg de peso) y se cuantificó la duración de narcosis. B.- Efecto de la administración ip de TRH sobre la duración de la narcosis inducida por etanol. Las ratas fueron administradas con una dosis de etanol (2 g/kg de peso) y 25 minutos más tarde fueron administradas con solución salina (barra blanca), TRH 3 mg/kg de peso (barra azul claro), TRH 10 mg/kg de peso (barra azul) y TRH 30 mg/kg de peso (barra azul oscuro). En ambas figuras las barras muestran el promedio \pm el error estándar. (*) Indica que existe diferencia significativa con el grupo control.

7.2.- Efecto analéptico de TRH inyectado en el SNC

Para asegurarnos que el efecto analéptico de TRH se debía a su acción directa sobre el SNC, se determinó el efecto analéptico de TRH administrado via icv en el mismo paradigma. La microinyección icv de TRH disminuyó la duración de la narcosis (figura 12a). Además, cuando TRH se administró directamente sobre el septum medial, la región más sensible al efecto analéptico de TRH, disminuyendo la duración de la narcosis de manera dosis dependiente (figura 12b). Este resultado además muestra que en la cepa Wistar el septum medial es sensible al efecto analéptico de TRH, contrario a lo que reportó Yamamura en 1990, quien no pudo antagonizar el efecto de otro narcótico, el pentobarbital; esta diferencia se pudiera explicar por la dosis de TRH utilizada, ya que Yamamura microinyectó ng de TRH y nosotros tuvimos que inyectar 1 μ g o más para observar un efecto analéptico claro. Se observa que el efecto de TRH es dosis dependiente, y seleccionamos la dosis de

efecto intermedio para los subsecuentes experimentos para así poder observar si este efecto intermedio se puede potenciar mediante la coinyección de un inhibidor de la enzima PPII. En la figura 13 se muestra la localización de los sitios de inyección en el septum; se observa que esta localización es reproducible y restringida a una pequeña zona dorsal del septum medio. Se observa que los sitios de inyección están localizados de manera homogénea en el eje antero-posterior entre las coordenadas 9.2 y 9.7, y que para cada dosis de TRH hay sitios de inyección en varios niveles antero-posteriores. En general, se obtuvo un patrón de distribución similar en los experimentos de implantación posteriores (no se muestra).

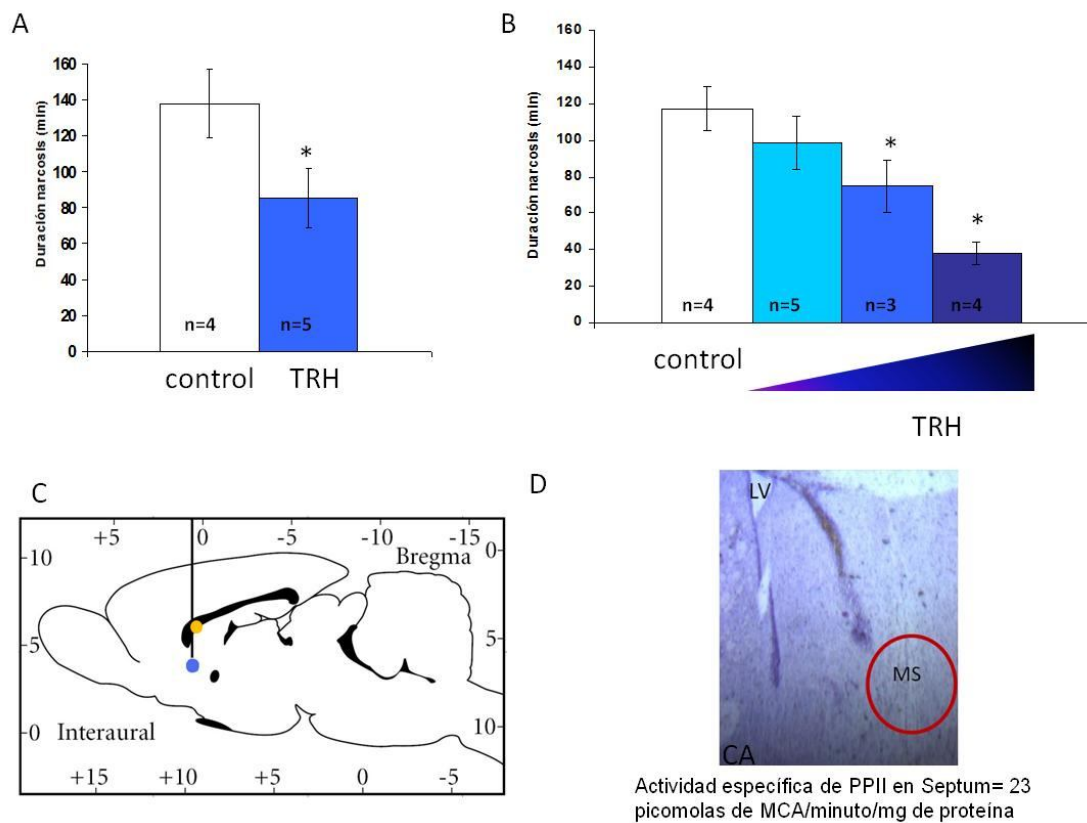


Figura 12. Efecto de la administración de TRH en el SNC sobre la duración de narcosis inducida por etanol. A.- Muestra el promedio de la duración de narcosis de ratas anestesiadas con etanol y microinyectadas 30 minutos más tarde con solución salina 0.9 (barra blanca) y TRH (barra azul) en ratas previamente implantadas con una cánula guía en el ventrículo lateral. B.- Muestra el promedio de la duración de narcosis en ratas anestesiadas con etanol y microinyectadas 20 minutos más tarde con solución salina 0.9 (barra blanca), 1 µg de TRH (barra azul claro), 5 µg de TRH (barra azul) y 25 µg de TRH (barra azul oscuro) en ratas previamente implantadas con una cánula guía en el septum medial. Tanto en la figura A y B se muestran el promedio + el error estándar. (*) Indica que existe diferencia significativa entre al grupo control. C.- Vista sagital del cerebro de rata donde se muestra los sitios de microinyección, el ventrículo lateral (amarillo) y el septum medial (azul). D.- Corte sagital de cerebro donde se muestra la lesión por la microinyección localizada arriba del septum medial.

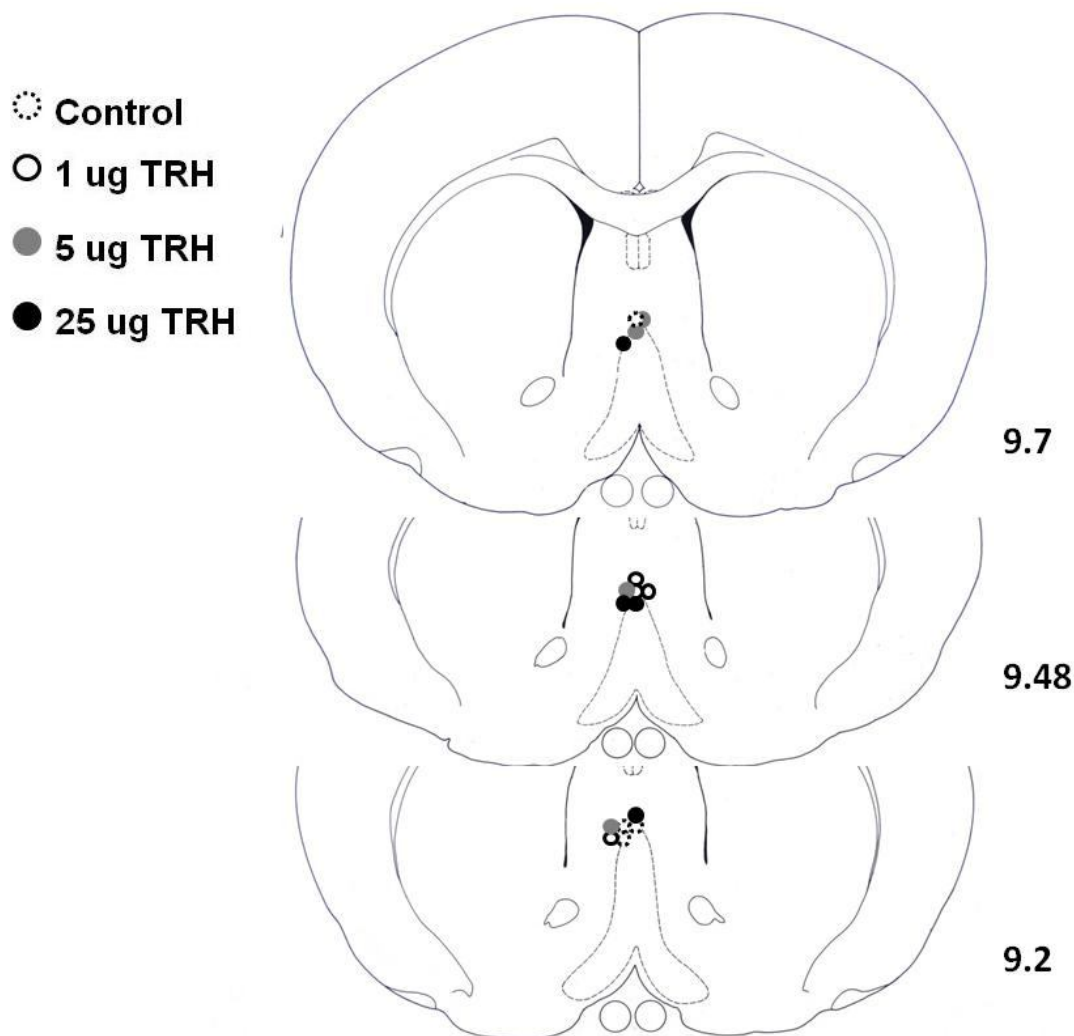


Figura 13. Localización histológica de los sitios de inyección en el septum medial, de acuerdo al Atlas de Paxinos y Watson (1982). Muestra la posición de la punta de la cánula guía de la figura 12 B. En general, se obtuvo un patrón similar de distribución en los posteriores experimentos de implantación.

7.3.- Efecto de la coinyección de TRH y péptidos en el paradigma de analepsia.

7.3.1.- Coinyección de TRH y el inhibidor pGlu-Asn-PromCA

Una vez que se optimizó el paradigma de analepsia en el que los animales responden a la administración de TRH en el septum medial, se decidió probar el efecto analéptico de TRH en conjunto con un inhibidor de la PPII (el pGlu-Asn-PromCA). Este inhibidor reportado en el año 2000 por el grupo de Kelly y colaboradores, cuenta con una K_i de $0.97 \mu\text{M}$ frente a la PPII. Se determinó

si el inhibidor podía tener efecto analéptico por sí solo, sin la administración conjunta de TRH. Si esto sucediera, indicaría que se puede potenciar no solo el efecto de la administración de TRH exógeno, sino también la del endógeno. Sin embargo, ninguna de las dosis administradas fue capaz de reducir la duración de la narcosis en los animales (figura 14a). En otro experimento se determinó si la coinyección de TRH más el inhibidor potencia el efecto analéptico en el septum medial. Como se observa en la figura 14 b, los grupos microinyectados con el vehículo y con el inhibidor muestran un comportamiento similar en la duración de narcosis, y como se esperaba, la microinyección de TRH disminuye la duración de la narcosis de manera significativa. De manera interesante, la microinyección conjunta de TRH y el inhibidor de la PPII disminuyó de manera dramática la duración de narcosis de los animales, reduciendo la duración de la narcosis hasta en un 50% respecto al grupo control y 40% respecto a las ratas microinyectadas sólo con TRH.

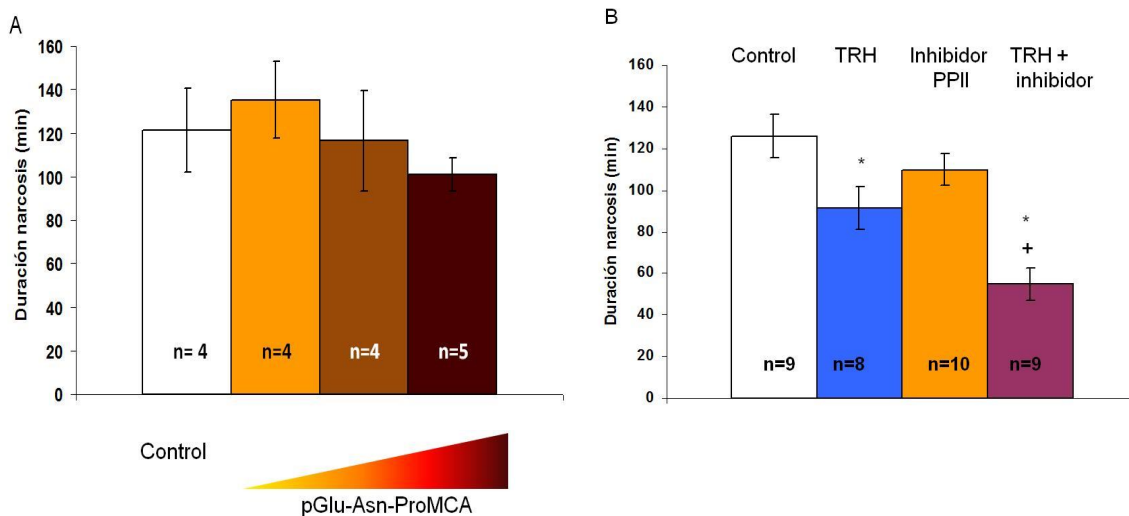


Figura 14. Efecto de la administración de TRH y pGlu-Asn-ProMCA en el septum medial. A.- Muestra el promedio de la duración de narcosis de ratas anestesiadas con etanol y microinyectadas 20 minutos más tarde con solución salina 0.9% (barra blanca), 5 µg (barra amarillo canario), 25 µg (barra café claro) y 45 µg de pGlu-Asn-ProMCA en ratas previamente implantadas con una cánula guía en el septum medial. B.- Muestra el promedio de la duración de narcosis de ratas anestesiadas con etanol y microinyectadas minutos más tarde con solución salina 0.9 % (barra blanca), 5 µg de TRH (barra azul claro), 5 µg de pGlu-Asn-ProMCA (barra amarillo canario), y TRH más el inhibidor (barra rosa) en ratas previamente implantadas con una cánula guía en el septum medial.

Intentamos determinar si al microinyectar el pGlu-Asn-ProMCA directamente al septum medial se podría encontrar la actividad de la enzima inhibida después de esta microinyección. Para ello se microinyectaron en el septum medial 5 ug de este inhibidor ó solo el vehículo, sin la administración de etanol (no se hizo el paradigma de analepsia) y se sacrificaron las ratas 5 y 15 minutos después. Posteriormente se extrajo el septum medial, y se determinó la actividad específica de la enzima PPII (picomolas de MCA/minuto/mg de proteína). Como muestra la figura 15, no encontramos diferencia significativa en la actividad específica de PPII del septum en presencia ó ausencia del inhibidor.

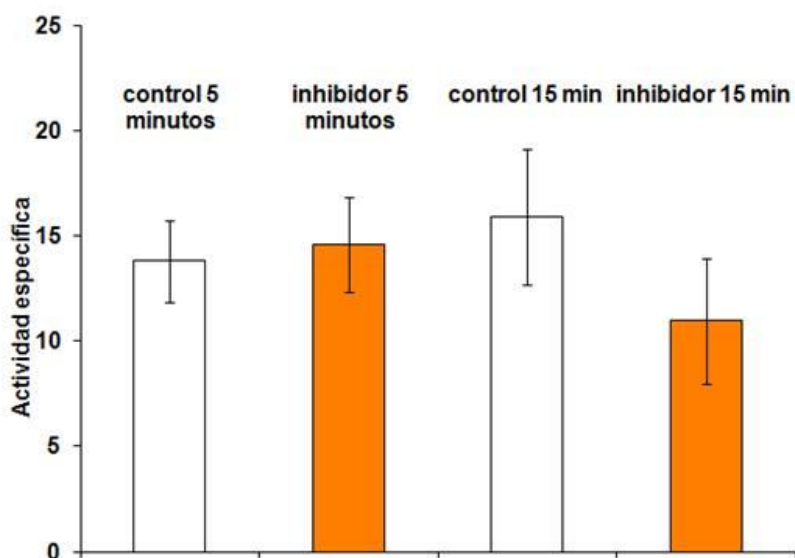


Figura 15.- Actividad específica de PPII en el septum medial de ratas microinyectadas con pGlu-Asn-ProMCA. Efecto de la microinyección de solución salina 0.9% (barra blanca) ó del inhibidor pGlu-Asn-ProMCA (5 µg) sobre la actividad específica de PPII, en ratas sacrificadas 5 y 15 minutos después de la microinyección. Se muestra el promedio de la actividad específica de PPII (picomolas de MCA/minuto/mg de proteína) ± el error estándar.

7.3.2.- Coinyección de TRH y un péptido sin actividad inhibitoria de PPII

Para demostrar que la potenciación de los efectos de TRH por el pGlu-Asn-ProMCA en el paradigma de analepsia se debe exclusivamente a la inhibición de la PPII, inyectamos en conjunto con TRH, un tripéptido de estructura similar, que se utilizó como control negativo. El péptido pGlu-Asp-ProNH₂ no inhibe, ni es hidrolizado por la PPII (Kelly et al., 2000). Como muestra la figura 16, el TRH mostró efecto

analéptico como era esperado, mientras que la coinyección de TRH y pGlu-Asp-ProNH₂ no potencia el efecto de TRH. Esto indica que el efecto analéptico de TRH se potencia específicamente cuando se inhibe la PPII, ya que la coinyección de TRH y de un péptido similar que no inhibe a la enzima, no potencia este efecto.

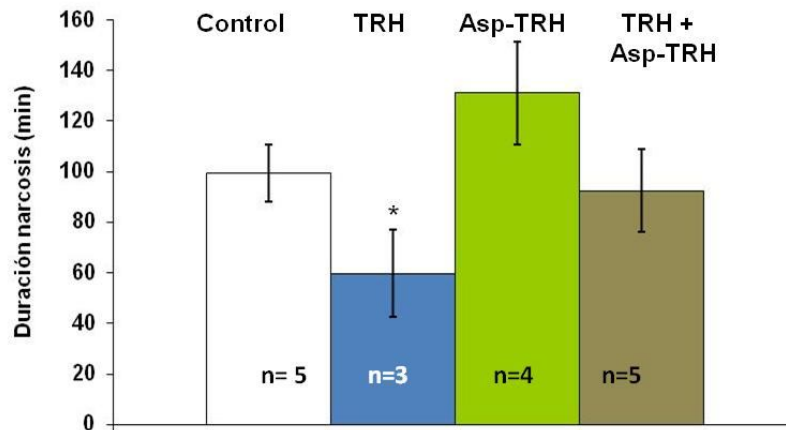


Figura 16.- Efecto de la coinyección de TRH y de un péptido que carece de actividad inhibitoria de PPII, en el paradigma de analepsia. La figura muestra el promedio \pm el error estándar de la duración de narcosis de ratas anestesiadas con etanol y microinyectadas 20 minutos más tarde con solución salina 0.9 % (barra blanca), 5 μ g de TRH (barra azul), 5 μ g de pGlu-Asp-ProNH₂ (barra verde) y TRH más pGlu-Asp-ProNH₂, en ratas previamente implantadas con una cánula guía en el septum medial. (*) Diferencia significativa respecto al grupo control. (+) Diferencia significativa respecto al grupo TRH. La diferencia se consideró significativa cuando $p < 0.05$.

7.3.3.- Coinyección de TRH y TRH fosfínico.

Para confirmar nuestros resultados, decidimos probar otro inhibidor de la PPII en paradigma de analepsia. El TRH-fosfínico tiene la ventaja de ser un inhibidor de mayor afinidad para la enzima (K_i de 70 nM contra K_i de 1 μ M con el anterior inhibidor). Revisando la estructura de TRH fosfínico (figura 17a) se muestra que en el enlace fosfínico se encuentra un grupo OH que puede ser liberado cuando se mezcla con el vehículo (solución salina al 0.9%) y cambiar el pH de la solución. Para descartar esta posibilidad se repitió el paradigma de analepsia pero esta vez en un vehículo que contiene un amortiguador, líquido cerebroespinal artificial (LCE). Como muestra la figura 17b, el TRH revierte la duración de la narcosis, y el TRH-fosfínico mostró un también efecto analéptico. La coinyección de TRH y TRH fosfínico muestra la misma tendencia a tener la duración de narcosis más baja. Es interesante

que el inhibidor mostró un efecto analéptico. En un experimento de analepsia con resultados similares (no mostrados) los animales se sacrificaron 160 minutos después de la inyección de etanol (cuando ya todas las ratas se habían recuperado del efecto narcótico) y se extrajo el septum medial para ver si se podría encontrar la actividad de esta enzima inhibida. Nuevamente no se encontraron diferencias significativas entre la actividad específica de PPII en ninguno de los grupos; sin embargo se mostró una tendencia a bajar la actividad específica en las ratas inyectadas solo con el inhibidor y en conjunto con TRH (figura 17c). Nuevamente la manipulación del tejido para medir la actividad de PPII pudiera disminuir la interacción de la enzima con el inhibidor. Además, el tiempo transcurrido entre la microinyección del inhibidor y el sacrificio es de 140 minutos, por lo que queda la posibilidad de que la inhibición de la actividad de la enzima se haya revertido.

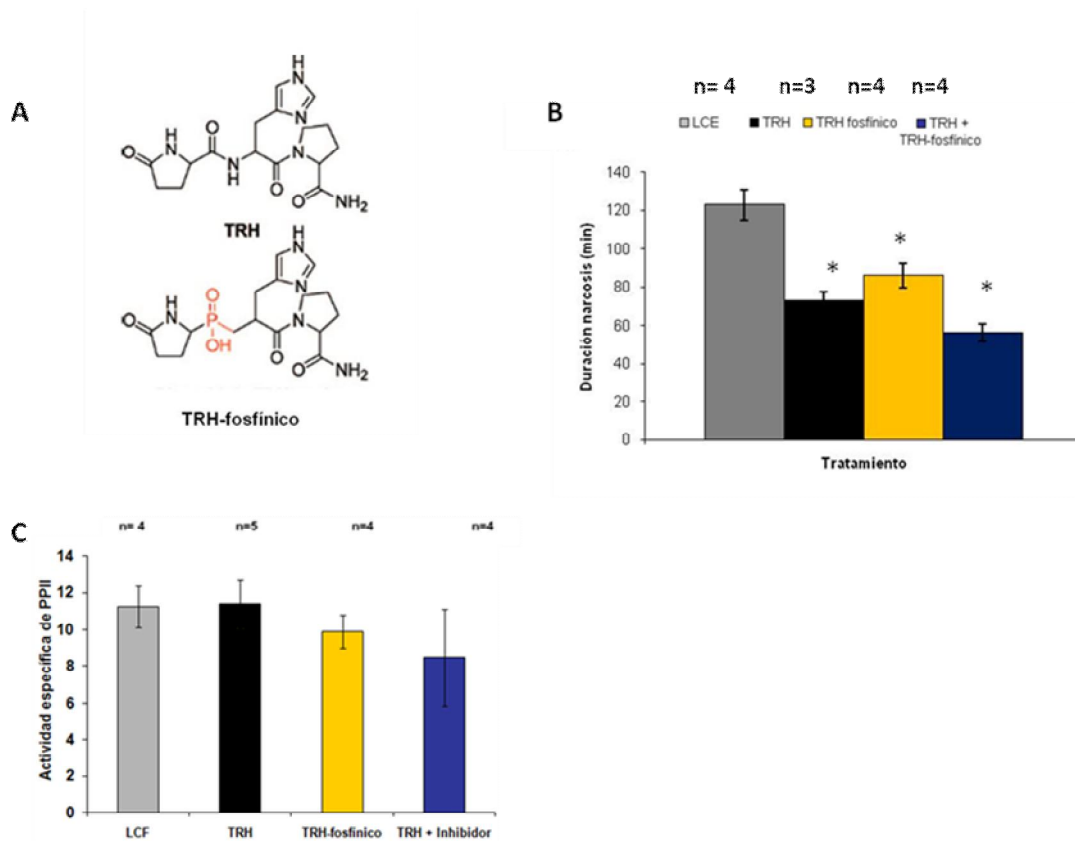


Figura 17.- Efecto de la microinyección de TRH-fofosínico, inhibidor de la PPII, solo y en conjunto con TRH en el septum medial, en el paradigma de analesia y sobre la actividad específica de PPII. A.- Se compara la estructura de TRH (arriba) y de TRH-fofosínico (abajo). La única diferencia entre estas moléculas es la unión peptídica y la unión fosfínica (marcada en rojo) entre el pGlu y el His de TRH y el inhibidor, respectivamente. **B.-** Promedio de la duración de la narcosis inducida por etanol \pm error estándar de la microinyección de TRH sólo y en conjunto con el TRH fosfínico, pero utilizando como vehículo LCE. **C).-** Actividad específica de PPII. Los animales que fueron sometidos al paradigma de analesia fueron sacrificados 140 minutos después de la microinyección de los péptidos (160 minutos después de la inyección de etanol) para obtener el cerebro e intentar observar algún efecto en la actividad de la enzima en el tejido septum medial en los tratamientos. Se muestran el promedio \pm el error estándar. (*) Diferencia significativa respecto al grupo control. La diferencia se consideró significativa cuando $p < 0.05$.

8.- Discusión y conclusión

8.1.- Efecto analéptico de TRH

En los organismos multicelulares los péptidos son utilizados como biomoléculas de señalización entre las partes que componen al organismo. Ya es bien aceptado que un mismo péptido puede funcionar como hormona, como factor parácrino, como neurotransmisor y neuromodulador en el mismo organismo. Inclusive es posible que aún se desconozcan todas las funciones que un mismo péptido puede tener en el mismo organismo. Se conoce bien el papel de TRH como la principal neuro-hormona que regula la secreción de tirotropina (Haisenleder et al., 1992). Sin embargo se sabe además que tiene células blanco en el SNC, en donde se encuentran los receptores y la actividad y expresión de la PPII, lo que indica que los estudios farmacológicos donde el TRH muestra efectos homeostáticos (Gary et al, 2003., Horita, 1998.) se deben a la acción directa en las células que tienen los receptores. En nuestras manos, también corroboramos que el TRH funciona como analéptico, ya que cuando indujimos una sedación con etanol, la posterior microinyección de TRH ip, icv e intraseptal disminuyó la duración de la narcosis respecto a los animales a los que se les inyectó vehículo. Sabemos que la analepsia se debe a la acción del tripéptido sobre el septum medial, así como en otras regiones del SNC sensibles a este efecto (Kalivas y Horita, 1981), pero no al efecto sobre la glándula pituitaria, pues esta glándula no está implicada en el efecto analéptico (Cott et al., 1975).

Aunque aún no está establecido con precisión cómo ocurre este antagonismo, se pueden establecer algunas hipótesis con base en lo reportado. Por ejemplo, se sabe que con las dosis utilizadas de etanol en nuestros experimentos se produce sedación y sueño, por tanto se disminuye la locomoción, se genera pérdida del reflejo de sostenerse sobre sus 4 patas e hipnotismo (Sun et al., 2010). De los tantos efectos que tiene el etanol sobre el cerebro (Deitrich et al., 1989), destaca el efecto que tiene sobre la transmisión colinérgica, y dicha transmisión está directamente implicada en la vigilia y en aspectos como la sedación por alcohol y otros sedantes (Sun et al., 2010). Se sabe que la sedación por etanol u otros sedantes disminuye la liberación de acetilcolina en regiones del cerebro tales como el hipocampo y la corteza cerebral (Jamal et al., 2007) y se ha postulado que este efecto puede ser revertido por la administración de TRH en el septum (Kalivas y Horita, 1980, Breese et al., 1975). Ya que al parecer los efectos de TRH en el SNC son excitadores

(Lechan y Fekete, 2006), es probable que el antagonismo que ejerce el TRH a la narcosis ocurre mediante la activación de las neuronas colinérgicas. De hecho, se sabe que el septum medial y la banda diagonal de Broca, contienen principalmente neuronas colinérgicas. *In vivo*, la administración de TRH en el septum medial aumenta la liberación de acetilcolina en el hipocampo, región relacionada con aspectos de la vigilia (Itoh et al., 1994). Otra región del cerebro relacionada con los aspectos de sueño/despertar es el hipotálamo lateral, región que sintetiza los péptidos orexinas (Sakurai et al., 2005). En el septum medial y la banda diagonal de Broca existen proyecciones de tipo colinérgico hacia el hipotálamo lateral (Sakurai et al., 2005). Es probable que el antagonismo de TRH a los efectos del etanol, tales como la pérdida de reflejo e hipnotismo se deban al efecto excitador del péptido TRH sobre las neuronas colinérgicas, cuya función se altera cuando el etanol alcanza el SNC, y que regresa a la normalidad tras la administración de TRH. Así, las neuronas colinérgicas activadas por el TRH pudieran iniciar de nuevo el envío de señales hacia regiones que controlan aspectos como la vigilia (figura 18a).

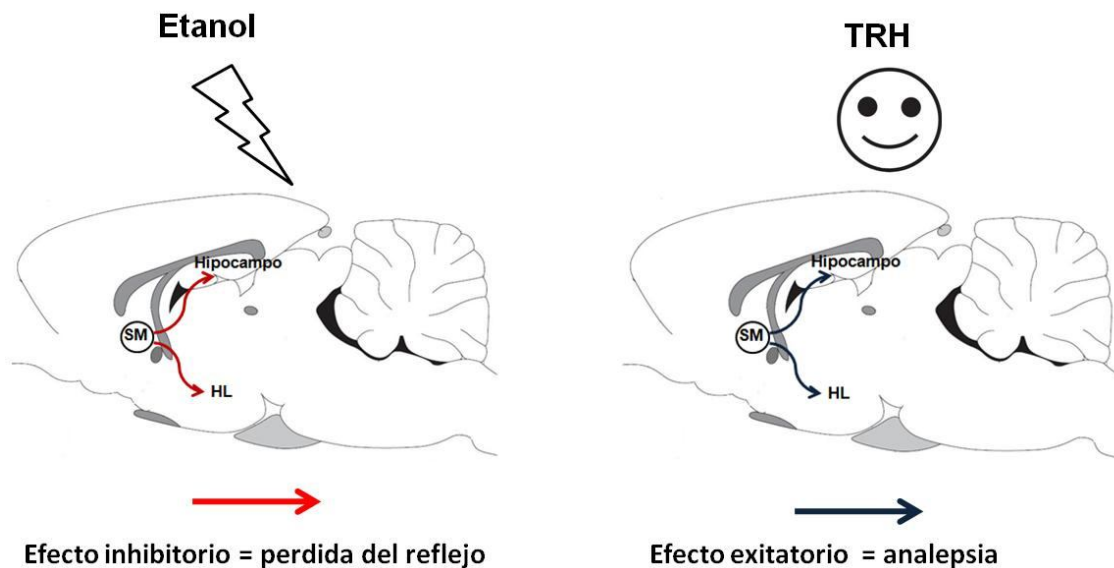


Figura 18.- Esquema que muestra las eferencias del septum medial que son afectadas por el etanol. La figura izquierda muestra que, de los tantos efectos que tiene el etanol sobre el SNC, se afectan la actividad de proyecciones colinérgicas del septum medial que van hacia el hipotálamo lateral (HL), específicamente donde se sintetizan las orexinas y hacia el hipocampo; ambas regiones participan en procesos fisiológicos relacionados con el sueño/despertar. En la figura derecha se representa que la administración de TRH antagoniza la sedación por etanol, probablemente al activar las neuronas colinérgicas del septum medial.

8.2.- Efecto de la coinyección de TRH y péptidos

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. 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 tiroliberinasa (Charl \acute{a} et al., 1998). Para observar el efecto de la inhibición de la PPII sobre las acciones de TRH directamente sobre el septum medial, decidimos emplear inhibidores de la actividad enzimática, pues a diferencia de otras metodologías, permiten estudiar el efecto de la inhibición a corto plazo, se pueden obtener efectos potentes y generalmente son específicos y rápidos. El empleo de pGlu-Asn-PromCA en conjunto con TRH muestra claramente que se potencia el efecto analéptico cuando se administra en el septum medial, y este efecto no se debe a la suma de TRH más el efecto analéptico del inhibidor, ya que el inhibidor pGlu-Asn-PromCA no tiene efecto analéptico por sí solo. Esta potenciación no ocurre cuando se coinyecta TRH más un péptido que no inhibe la PPII (pGlu-Asp-PromCA), lo que indica que la potenciación se debe a la inhibición de la PPII y no a algún efecto inespecífico. En los experimentos de analepsia donde se decidió probar el efecto de TRH y un inhibidor de PPII más potente (TRH-fosfínico) el inhibidor mostró efecto analéptico por sí solo, a diferencia del inhibidor pGlu-Asn-PromCA, aunque no podemos determinar si se debe a un incremento en la vida media de TRH endógeno ya que teniendo mayor afinidad hacia la enzima PPII es posible que sea más fácil ver el efecto de TRH endógeno con este inhibidor, ó a un efecto directo sobre los receptores de TRH, ya que el TRH y el inhibidor tienen estructuras muy parecidas. Si el efecto analéptico en este grupo se debe a la protección de TRH endógeno, ó a un efecto agonista sobre el receptor de TRH, no es claro por el momento. Con ambos inhibidores fue difícil comprobar que la enzima estaba inhibida cuando se extrajo del septum medial de ratas tratadas con los inhibidores. Es posible que en el caso de la administración del inhibidor pGlu-Asn-PromCA, la unión con la PPII si haya ocurrido *in vivo*, pero que se haya perdido durante la manipulación del septum medial para medir la actividad de PPII. Para el caso del inhibidor TRH-fosfínico, que es de mayor afinidad hacia la PPII, no realizamos un experimento en el

que luego de la microinyección sacrificamos minutos después a los animales, sino que al final de un experimento de analepsia se sacrificaron y se midió la actividad inhibitoria de la PPII. En este caso, tenemos dos problemas; nuevamente la manipulación del tejido pudiera haber revertido la interacción enzima inhibidor previo a los ensayos enzimáticos; además, el tiempo transcurrido entre la microinyección del inhibidor y el sacrificio (al menos dos horas) es un tiempo prolongado que pudiera haber facilitado la pérdida de unión del inhibidor a la PPII.

Por otro lado, los datos de analepsia obtenidos con la coinyección de TRH y los inhibidores claramente corroboraron la hipótesis de este trabajo. Los datos bioquímicos previos apuntaban a que la PPII tiene un papel importante en la degradación de TRH; de estos datos destacan su localización casi exclusiva en neuronas, su sitio catalítico dirigido hacia el espacio extracelular, su estrecha especificidad y la mayor recuperación de TRH en rebanadas de cerebro en presencia de un inhibidor de esta enzima (Charli et al, 1998). En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado, mediante la técnica de hibridación *in situ*, que el mRNA de la enzima colocaliza con el mRNA del TRH-R1 en las mismas células en varias zonas del septum, incluyendo el septum medio (Martínez, 2009). Aunque no se ha podido demostrar la presencia de ambas proteínas, debido a la carencia de anticuerpos específicos útiles para la inmunohistoquímica, en este trabajo se muestra que en el septum medio existe actividad específica de PPII, lo que confirma la presencia de la proteína en esta región. Se puede concluir, que cuando se coinyecta TRH con el inhibidor pGlu-Asn-ProMCA, se potencian los efectos del TRH en el paradigma de analepsia debido a la protección del TRH que actúa a proximidad de sus células blanco en el septum medial; esto debe prolongar su vida media y producir una activación sostenida de sus receptores, posiblemente los receptores de tipo TRH-R1 (figura 19). Esto es de particular interés ya que el TRH tiene varios efectos homeostáticos dentro del SNC. Este trabajo muestra por primera vez que uno de estos efectos puede potenciarse si se inhibe a la PPII, mostrando la relevancia fisiológica de esta enzima en la inactivación del TRH en el SNC *in vivo*. Se había postulado que los efectos rápidos del TRH se debían a su hidrólisis por la PPII. Este trabajo demuestra este supuesto, y es un ejemplo más de que las ectopeptidasas regulan la acción de péptidos biológicamente activos, y que la inhibición

de las enzimas puede potenciar los efectos benéficos de los péptidos en el organismo. También se abre la puerta a tratar de estudiar a la enzima como blanco farmacológico para potenciar los efectos homeostáticos del TRH.

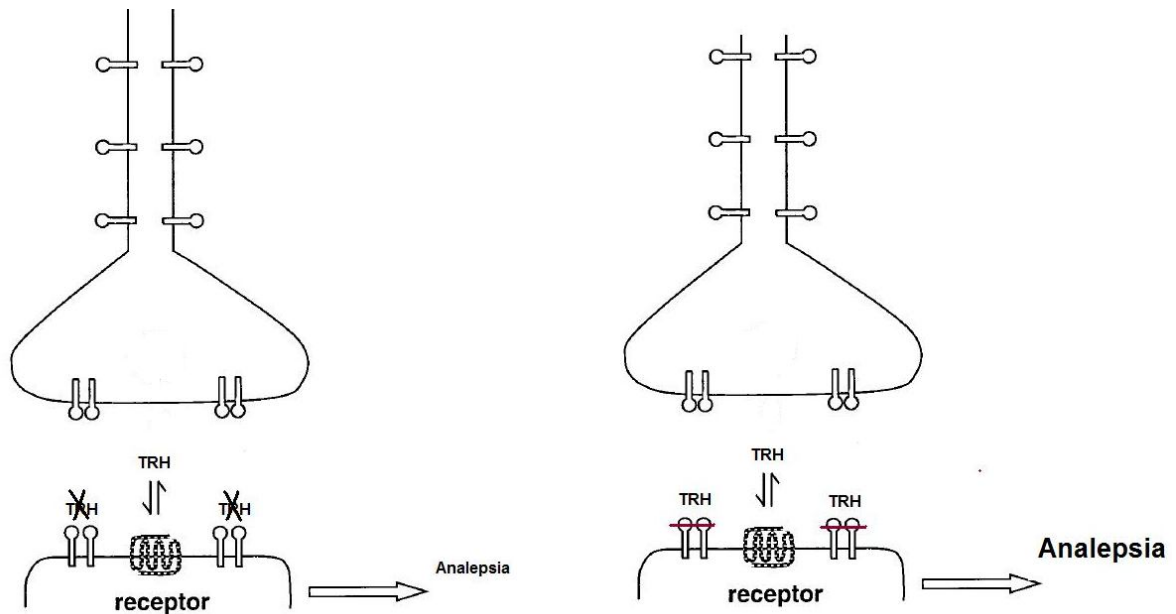


Figura 19.- Papel de la PPII en la degradación de TRH en la sinapsis. La figura representa una sinapsis en donde el TRH puede activar a la célula blanco que tiene su receptor. Del lado izquierdo se muestra que la acción del péptido está limitada por la PPII presente en el lado post-sináptico y que la administración de inhibidores de su actividad hidrolítica (línea roja, imagen derecha) aumenta la vida media de TRH así como su acción sobre la neurona postsináptica, reflejada en un aumento del efecto analéptico. (Figura tomada y modificada de Turner et al, 2001).

9.- PERSPECTIVAS

Demostrar que la vida media del TRH endógeno y/o exógeno aumenta cuando se inyecta un inhibidor de la PPII *in vivo*, mediante la técnica de microdiálisis.

Investigar cómo se modula la síntesis y expresión del TRH, receptores y la PPII durante la entrada y salida de la narcosis inducida por etanol.

Investigar si se puede potenciar el efecto del TRH al inhibir a la PPII en otro paradigma, donde el TRH ha mostrado algún efecto; por ejemplo, en modelos de epilepsia.

10.- BIBLIOGRAFIA

ANTCZAK, C., De Meester I, Bauvois B (2001) Ectopeptidases in pathophysiology. Bioessays. 23:251–260.

ALBISTON, A. L., Ye, Siying and Chai, S. T. Membrane bound members of the M1 family: More than aminopeptidases. (2004). Protein and Peptide letters. 11. No 8. 491-500.

BARNETT, A. (2006). DPP-4 inhibitors and their potential role in the management of type 2 diabetes. International Journal of Clinical Practice. 60:1454-1470.

BARRET, A. J. and Rawlings, N. D. (2007). Proteases. Encyclopedia Of Life Sciences. www.els.net.

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

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

BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 7: 248-254.

BREESE, G.R., Cott, J.M., Cooper, B.R., Orange, A.J., Lipton, M.A., and Plotnikoff, N.P. (1975). Effects of thyrotropin-releasing hormone (TRH) on the actions of pentobarbital and other centrally acting drugs. Pharmacology and Experimental Therapeutics. 193: 11-22.

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., 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.

CHÁVEZ-GUTIÉRREZ, L., Matta-Camacho, E., Osuna, J., Horjales, E., Joseph-Bravo, P., Maigret, B. and Charli, J. L. Homology modeling and site-directed mutagenesis of pyroglutamyl peptidase II. Insights into omega-versus aminopeptidase specificity in the M1 family. The Journal of Biological Chemistry. 7:18581185-90.

CORREA, M., Sanchis-Segura, C. and Aragon, C. M. (2001). Influence of brain catalase on ethanol-induced loss of righting reflex in mice. *Drug and alcohol dependence*. 1:9-15.

COTT, J.M., Breese, G.R., Coope,r B.R., Barlow, S. and Prange, A.J. (1976). Investigations into the mechanism of reduction of ethanol sleep by thyrotropin-releasing hormone (TRH). *Pharmacology and Experimental Therapeutics* 196: 594-604.

CRUZ,R. Vargas,M. A. Uribe, R. M. Pascual, I. Lazcano,I. Yiotakis,A. Matziari,M. Joseph-Bravo,P. Charli,J.L. (2008). Anterior pituitary pyroglutamyl peptidase II activity controls TRH-induced prolactin release. *Peptides*, 29, 1953-1964.

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.

DEITRICH, R. A., Dunwiddie, T. V., Harris, R. A. and Erwin VG. (2010). Mechanism of action of ethanol: initial central nervous system actions. *Pharmacological reviews*. 41: 489-537.

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.

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.

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.

GARY, K. A., Sevarino, K. A., Yarbrough, G.G., Prange JR, A. J., and Winokur A. The Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) hypothesis of homeostatic regulation: implications for TRH-based therapeutics. (2003). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 305: 410-416.

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

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.

HEUER, H., Schäfer, M.K., O'Donnell, D., Walker, .P and Bauer, K. (2000). Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *The Journal of Comparative neurology*. 11:319-36.

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. (1998). An update on the CNS actions of TRH and its analogs. *Life Science*. 32: 1443-1448.

ITOH, Y., Ogasawara, T., Mushiroi, T., Yamazaki, A., Ukai, Y. and Kimura K. (1994). Effect of NS-3, a thyrotropin-releasing hormone analog, on in vivo acetylcholine release in rat brain: regional differences and its sites of action. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 271: 884-890.

JAMAL, M., Ameno, K., Ameno, S., Morishita, J., Wang, W., Kumihashi, M., Ikuo, U., Miki, T. and Ijiri, I. (2005). Changes in cholinergic function in the frontal cortex and hippocampus of rat exposed to ethanol and acetaldehyde. *Neuroscience*. 5: 232-138.

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.

KALIVAS, P. W., and Horita, A. (1980). Thyrotropin-releasing hormone: neurogenesis of actions in the pentobarbital narcotized rat. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 212: 203-210.

KALIVAS, P.W., Simasko, S.M., Horita, A. (1981). Effect of septohippocampal lesions on thyrotropin-releasing hormone antagonism of pentobarbital narcosis. *Brain Research*. 222:253-265.

KELLY, J. A., Slator, G., R., Tipton, K. F., Williams, C. H. and Bauer K. (1999). Development of a continuous, fluorometric coupled enzyme assay for thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme. Analytical Biochemistry. 15:195-202.

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.

KERR, M. A and Kenny A. J. (1974). The purification and specificities of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. Biochemistry Journal. 137: 477-488.

LECHAN, R. M. and Fekete, C. (2006) The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. Progress in Brain Research. 153:209 –235.

LI, K. W. 2001. Peptide Neurotransmitters and Hormones. Encyclopedia Of Life Sciences. www.els.net

MANAKER, S., Winokur, A., Rostene W. H., and Rainbow, T.C. (1985). Autoradiographic localization of Thyrotropin-Releasing-Hormone receptors in the rat central nervous system. The Journal of Neurosciences. 5: 167-174.

MARTINEZ Chávez Erick Ariel. 2009. Localización de los ARNm del receptor tipo 1 de TRH y de la piroglutamil peptidasa II en el septum de la rata. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

MATZIARI, M., Bauer, K., Dive, V. and Yiotakis, A. (2008). Synthesis of the phosphinic analogue of thyrotropin releasing hormone. The Journal of Organic Chemistry. 7:8591-8593.

McCOWN, T. J., Moray, L.J, Kizer J. S., Breese G.,R. (1986). Interactions between TRH and ethanol in the medial septum. Pharmacology and Experimental Therapeutics. Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 24: 1269-1274.

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.

MITSUMA, T., Rhue, N., Kayama, M., Mori, Y., Yokoi, Y., Adachi, K., Ikai, R., Nakamura, A., Nakayashiki, A., Nogimori, T., Sakai, J., Hirooka, Y. (1999). Distribution of thyrotropin releasing hormone receptor type 2 in rats: an immunohistochemical study. Endocrine Regulations. 33; 135-139.

MORZORATI, S. and Kubec, M.J. (1993). Septal TRH in alcohol-naive P and NP rats and following alcohol challenge. *Brain Research Bulletin*. 31 :301-304.

NEURATH, H. (1999). Proteolytic enzymes, past and future. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 28:10962-10963.

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.

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

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.

ORDOÑEZ, G. R., Puente, X. S., Quesada, V., and López-Otín. C. (2009). Proteolytic systems: constructing degradomes. *Methods in Molecular Biology*. 539:33-47.

PASCUAL, I., Gil-Parrado, S, Cisneros., M., Joseph-Bravo, P., Díaz, J., Possani, L. D., Charli, J. L. and Chávez, 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 & Cell Biology*. 2004 36:138-52.

PAXINOS G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Second Edition. New York: Academic Press, 1986.

PAXINOS G. 1995. *The rat nervous system*. Second edition. Academic press. USA.

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.

PUENTE, X. S., and López-Otín, C. (2004). A Genomic Analysis of Rat Proteases and Protease Inhibitors. *Genome Research*. 14: 609-622.

RITTER, S. L., and Hall R.A.- 2009. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 10:819-30.

SAKURAI T, Nagata R, Yamanaka A, Kawamura H, Tsujino N, Muraki Y, Kageyama H, Kunita S, Takahashi S, Goto K, Koyama Y, Shioda S, Yanagisawa M. (2005). Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. *Neuron*. 21:297-308.

SCALABRINO, G. A., Hogan, N., O'Boyle, K. M., Slator, G. R., Gregg, D. J., Fitchett, C. M., Draper, S. M., Bennett, G. W., Hinkle, P. M., Bauer, K., Williams, C. H., Tipton, K. F. and Kelly J. A. (2007). Discovery of a dual action first-in-class peptide that mimics and enhances CNS-mediated actions of thyrotropin-releasing hormone. *Neuropharmacology*. 52:147214-81.

SÁNCHEZ, E., Vargas, M. A., Singru, P. S., Pascual, I., Romero, F., Fekete, C., Charli, J. L. and Lechan R. M.(2009). Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology*. 150:2283-2291.

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.

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.

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.

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

SUN, Y. P., Liu, Q., Luo, J., Guo, P., Chen, F., Lawrence, A. J. and Liang, J. H. (2009). Systemic administration of arecoline reduces ethanol-induced sleeping through activation of central muscarinic receptor in mice. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 34: 150-157.

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.

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.

YAMAMURA, M., Kinoshita¹, K., Nakagawa, H., and Ishida, R. (1991). Pharmacological Study of TA-0910, a New Thyrotropin- Releasing Hormone (TRH) Analog (III): Inhibition of Pentobarbital Anesthesia. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 53:451-461.

ZHOU, A., Webb, G., Zhu, X. and Steiner, F. (1999). Proteolytic processing in the secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry* 274: 20745–20748.