

Procesamiento postraduccional de la porción no opioide de la proencefalina (Synencefalina) en el cerebro de la rata

Miguel Asai*
Gilberto Matamoros-Trejo*
Gabriel Linares*
Pablo Agustín*

Summary

Several protein hormones and neuropeptides are derived by enzymatic cleavage from a large and inactive peptide precursor. The enkephalins' precursor, the proenkephalin A (PA) has been deduced by sequencing cloned DNA. The PA contains four copies of Met-Enkephalin and one copy each of Leu-Enkephalin, heptapeptide and octapeptide. Proenkephalin (amino acids 1-70) does not contain any opioid peptide sequence and has been named synenkephalin (Syn). Initial evidences suggested that Syn is produced and secreted as an intact molecule or as part of the precursors in the adult brain and adrenal medulla, respectively. However, under specific physiological conditions, i.e., proliferating immune cells, Syn (8.6 kDa) it is processed to low molecular weight peptides (1.0 kDa). Until now there is no evidence of the production or release of a 1.0 kDa peptide derived from synenkephalin in the adult rat brain. In this work we studied the posttranslational processing of synenkephalin in rat striatum, either in whole tissue or *in vitro* release conditions.

Male Wistar rats were used throughout this experiment. The rats were sacrificed by decapitation and the striatum removed. Samples were divided into three groups: 1) The striatum (n=8) was homogenized and centrifuged; the supernatant was lyophilized and resuspended in 2 ml water. 2) Striatum was dissected and sliced in two directions at 90° at 300 μ m intervals with a tissue chopper. The slices were used for the assessment of the *in vitro* release of synenkephalin and Met-Enkephalin, using potassium as depolarized stimulus. 3) The synaptosomal fraction was obtained from striatum; samples were depolarized with potassium 55 mM, and the perfusates were lyophilized and resuspended in 2 ml water. Samples were individually applied to a Sephadex G-50 column. Eluates were lyophilized and resuspended in RIA buffer. Synenkephalin and Met-Enkephalin were measured by RIA using a C-terminally directed antiserum. Gel filtration chromatography (Sephadex G-50) showed that in the extracts of adult rat brain 45% of the IR-Synenkephalin eluted in the position of the authentic peptide (8.6 kDa), and the rest of the immunoreactivity corresponded to partially processed peptides of 4.8 and 2.5 kDa. After depolarized stimulus the chromatogram showed a differential pattern. In both, slices and synaptosomal samples, synenkephalin was processed to a single peak with a molecu-

lar weight of 1.0 kDa. This last peptide, which was further characterized by HPLC, resembles the same retention time when compared to the standard reagent (YEESHLLA). IR-Met-Enkephalin in whole tissue (analyzed before and after enzymatic digestion with trypsin and carboxypeptidase B) corresponded mainly to non-processed products. These results indicate that the non-opioid portion of proenkephalin (synenkephalin-derived peptides) rather than the opioid portion (Met-Enkephalin-containing peptides) is fully cleaved to the 1.0 kDa peptide in the depolarized samples. These data suggest that Synenkephalin (1-70) is not processed in basal conditions in the adult brain. However, when the neuronal activity is increased, i.e., after depolarized stimulus, synenkephalin is fully processed to a low molecular weight peptide. This last peptide has been related to the physiology of the synenkephalin-derived peptides.

Key words: Striatum, synenkephalin, post-translational processing, release.

Resumen

Los péptidos biológicamente activos se producen por el procesamiento enzimático de un precursor protéico inactivo y de alto peso molecular. El precursor de los péptidos opioides contiene cuatro copias de Met-encefalina, una copia de Leu-encefalina, una copia del heptapéptido y una copia del octapéptido. En su porción amino terminal se encuentra una región de 70 aminoácidos que no contiene ninguna copia de los péptidos opioides, a la que se le ha denominado synencefalina (Syn). Los primeros trabajos demostraron que la secuencia completa de la Syn (8.6 kDa de peso molecular), no sufría cambios postraduccionales en el sistema nervioso de los mamíferos, y se liberaba íntegramente de sus terminales nerviosas. Las evidencias posteriores señalaron que en el sistema inmune, la Syn se podía transformar en un péptido de 1 kDa. A este último péptido se le ha involucrado con los procesos de proliferación celular, y con el sistema nervioso central durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, no hay evidencias experimentales que demuestren que la Syn pueda ser procesada a un péptido de bajo peso molecular en el cerebro de la rata adulta. El propósito del presente trabajo fue el de analizar por medio de métodos bioquímicos si la Syn es capaz de procesarse en el sistema nervioso, así como establecer la identidad bioquímica del material inmunoreactivo a la Syn que se libera a partir de las terminales nerviosas del cuerpo estriado.

Un grupo de ratas macho de la cepa Wistar (230 g) fueron sacrificadas, y se disectó el cuerpo estriado. El tejido se dividió

* Laboratorio de Análisis Químicos. División de Neurociencias. Instituto Mexicano de Psiquiatría. Calz. México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, 14370, México D.F.

Recibido: 16 de diciembre de 1999

Aceptado: 22 de marzo de 2000

en tres grupos: 1) El estriado se homogeneizó y se centrifugó; el sobrenadante se liofilizó y se resuspendió en 2 ml de agua. 2) El cuerpo estriado se sometió al proceso de liberación *in vitro* a partir de las rebanadas del cuerpo estriado (300 mm), utilizando potasio (55 mM) como estímulo despolarizante. El perfusado fue liofilizado y resuspendido en 2 ml de agua. 3) Del cuerpo estriado se obtuvo una fracción enriquecida con terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) y sometidas a la liberación *in vitro*. Los perfusados se liofilizaron y se resuspendieron en 2 ml de agua. Las muestras anteriores se aplicaron por separado a una columna con Sephadex G-50. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Muestra 1. El cromatograma muestra varias proteínas inmunoreactivas a la synencefalina con diversos pesos moleculares, principalmente las fracciones 13.7, 8.1 y 2.5 kDa. El tejido completo no mostró inmunoreactividad en la porción de 1.0 kDa. Muestra 2. El material liberado presentó un perfil cromatográfico distinto toda vez que los precursores presentes en el tejido completo se procesaron completa y rápidamente a un péptido de 1.0 kDa de peso molecular. Muestra 3. La muestra obtenida de los sinaptosomas mostró un comportamiento similar al descrito en el inciso 2, ya que el material liberado es inmunoreactivo a la Syn de 1.0 kDa de peso molecular.

Los datos obtenidos demuestran que en el cuerpo estriado, la inmunoreactividad a la Syn se ubica, principalmente, en 3 proteínas, de las cuales la fracción de 8.6 kDa es la predominante; su peso molecular es semejante al descrito previamente. Sin embargo, cuando el tejido es sometido a un estímulo despolarizante con potasio, los precursores se procesan a un péptido de 1.0 kDa. El análisis de esta última fracción con la técnica de HPLC, demuestra que el tiempo de retención de la muestra coincide con la sustancia patrón utilizada (YESSHLLA), la cual tiene un peso molecular de 1.0 kDa. Los datos obtenidos de las terminales nerviosas aisladas sugieren la presencia de precursores de alto peso molecular. El perfil cromatográfico es similar al observado en las rebanadas del tejido, toda vez que la presencia de potasio induce el procesamiento de los precursores a un péptido de 1.0 kDa.

Las evidencias previas y los resultados del presente trabajo muestran que el cerebro de la rata adulta no procesa a la Syn de 8.6 kDa. Sin embargo, cuando las condiciones fisiológicas implican un incremento en la actividad celular, como: la proliferación celular, la respuesta a un estímulo que produce estrés, la inflamación y el aumento en la frecuencia de despolarización inducida *in vitro*, los precursores presentes en el tejido se procesan en forma rápida y completa a un péptido de bajo peso molecular (1.0 kDa), al cual se le ha involucrado con la fisiología de la porción no opioide de la proencefalina A.

Palabras clave: Estriado, synencefalina, procesamiento postraducciona, liberación.

Introducción

Los péptidos biológicamente activos se producen por el procesamiento enzimático de un precursor proteico, inactivo y de alto peso molecular (5). La estructura primaria del precursor de los péptidos opioides, la proencefalina A (PA), ya se ha descrito (4,7,11). En todas las especies analizadas, la PA contiene cuatro copias de Met-encefalina, una copia de Leu-encefalina, una copia del Heptapéptido (Met-encefalina-Arg⁶-Phe⁷) y una copia del Octapéptido (Met-encefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸). Esta porción se encuentra unida a una región denominada "no opioide" (figura 1) que, como su nombre lo indica, no contiene ninguna copia de las encefalinas, por lo que se le ha denominado synencefalina (Syn). El estudio del sistema de la PA es de un gran interés para la bioquímica debido a que es la fuente principal de los péptidos opioides biológicamente activos, y constituye el modelo de la síntesis, procesamiento y liberación de los neuropéptidos.

A diferencia de las encefalinas, cuya secuencia de aminoácidos se encuentra en los otros dos precursores opioides identificados: la prodinorfina y la proopiome-lanocortina, la synencefalina es exclusiva de la proencefalina A. Por tal motivo, su determinación se ha considerado como un indicador de la actividad de la proencefalina A.

Los informes iniciales sugerían que la Syn no presentaba alteraciones postraduccionales, por lo que esta proteína, de un peso molecular de 8.6 kDa, se podía mantener y liberar intacta del cerebro de la rata (8,9). Nuestro grupo de investigación ha demostrado que, en la rata la Syn posee un ritmo diurno bien establecido: el contenido y la liberación de Syn alcanzan su concentración máxima a las 16:00 h. Sin embargo, la concentración de la Syn en el material liberado fue significativamente mayor que en el tejido completo (1). Si como mencionaba el doctor Liston (8,9), la Syn no se procesa, las cantidades que encontramos deberían ser similares en el tejido y en el material perfusado. Diversas evidencias experimentales han demostrado que la molécula de 8.6 kDa se procesa a un péptido de 1 kDa de peso molecular. A este último péptido se le relaciona con los procesos inflamatorios (19), en la proliferación celular (19) y en la síntesis de las células mononucleares periféricas (12). Recientemente, se ha demostrado en las células del sistema inmune que a consecuencia de un estímulo que produce estrés, el péptido de 1 kDa es capaz de liberarse a partir de las células del bazo (15). Sin embargo, no se han encontrado evidencias experimentales que demuestren que la Syn puede ser transformada en péptidos de menor peso molecular en el Sistema Nervioso Central.

El propósito del presente trabajo fue analizar, por medio de métodos bioquímicos, si la synencefalina (8.6 kDa) puede procesarse en el tejido nervioso, y establecer la identidad del material inmunoreactivo a la Syn que se libera a partir de las terminales nerviosas del cuerpo estriado

Material y métodos

Obtención del tejido cerebral

Un grupo de ocho ratas macho de la cepa Wistar (250-300 g) se mantuvo en condiciones de temperatura controlada a $22 \pm 1^\circ\text{C}$. El ciclo de luz fue de 12 h: la fase luminosa empezó a las 06:00 h. El agua y el alimento fueron suministrados *ad libitum*. Los animales se sacrificaron por decapitación; el cerebro se disectó y se colocó en una solución salina a 4°C . El cuerpo estriado se obtuvo de acuerdo con la técnica descrita por Glowinski e Iversen (6). El tejido proveniente de 8 estriados fue homogeneizado y centrifugado a $50,000 \times g$ durante 1 h, a 4°C . El sobrenadante obtenido fue liofilizado y resuspendido en 2 ml de agua. Se obtuvo una alícuota para la determinación de proteínas.

Liberación in vitro

Se sacrificó a un grupo de ocho ratas, y se disectó el cuerpo estriado. El tejido se cortó en rebanadas de

300 mm en dos direcciones de 90°, y se incubó en un medio Krebs-bicarbonato pH 7.0 a 37°C, saturado con una mezcla de 95% O₂ - 5% CO₂ con la siguiente composición (mM): NaCl 118, KCl 14.8, CaCl₂ 0.5, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25 y glucosa 10. El estímulo despolarizante se produjo utilizando potasio 55 mM. Para evitar la acción de las endopeptidasas se añadió al medio de incubación el inhibidor Phe-Ala 1mM. La velocidad de flujo fue de 1 ml/min. El material liberado a partir del estímulo despolarizante con potasio fue recolectado durante 10 min; el perfusado fue liofilizado y resuspendido en 2 ml de agua.

Preparación de las terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas)

Se sacrificó a un grupo de 8 ratas, y se disectó el cuerpo estriado. Las muestras de tejido se procesaron para obtener la fracción que contenía las terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas), de acuerdo con la técnica descrita previamente (2). La fracción enriquecida con sinaptosomas se dividió en dos grupos: en el primero, los sinaptosomas completos se homogeneizaron y se centrifugaron a 50,000 ∞ g durante 1 h a 4°C. El sobrenadante fue liofilizado y resuspendido en 2 ml de agua. El segundo grupo lo constituyó una muestra equivalente de los sinaptosomas, que se sometió al proceso de liberación *in vitro*, utilizando un estímulo despolarizante con potasio 55 mM. El material liberado fue liofilizado y resuspendido en 2 ml de agua.

Cromatografía de filtración molecular

Las muestras obtenidas previamente se aplicaron por separado a una columna de vidrio (120 ∞ 2 cm) con Sephadex G-50 fino. La columna se equilibró con ácido acético 1M (pH 1.9 con HCl 55 mM). La elución se llevó a cabo a una velocidad de flujo de 12 ml/h, a tempera-

tura ambiente y se colectaron fracciones de 4 ml. Las muestras fueron liofilizadas y resuspendidas en un amortiguador Tris-HCl, pH 8.4 y 2 mM CaCl₂. La concentración de IR-Syn e IR-Met-enkefalina se determinó antes y después de la digestión enzimática con tripsina y carboxipeptidasa B.

Digestión enzimática

Para liberar a los péptidos de sus precursores, se procedió a digerirlos secuencialmente con la acción de las enzimas que se rompen al nivel de los pares de aminoácidos básicos. Se obtuvieron alícuotas de 500 ml provenientes de las fracciones recolectadas de la columna de Sephadex; se trataron mediante la adición de 200 ml de una solución de N-Tosil-L-fenilalanina-clorometil-cetona-tripsina, con 20 mg/ml de amortiguador Tris-CaCl₂ pH 8.4, para obtener una concentración final de la enzima de 10 mg/ml. Las muestras se incubaron 18-20 h a 37°C. La enzima se inactivó al poner a hervir las muestras a punto de ebullición durante 15 min. Posteriormente, se añadieron 100 ml de carboxipeptidasa B, con 0.5 mg/ml de amortiguador Tris-CaCl₂, para obtener una concentración final de la enzima de 0.1 mg/ml. Las muestras se incubaron durante 1 h a 37°C y se inactivaron por ebullición durante 15 min; posteriormente se centrifugaron a 3,000 rpm durante 2 min. El sobrenadante fue recuperado y congelado a -20°C.

Radioinmunoensayo de Met-enkefalina y Synencefalina

El antisuero utilizado para cuantificar la synencefalina fue donado por el doctor Osvaldo Vindrola. Este anticuerpo reconoce los últimos siete aminoácidos de la porción carboxilo terminal de la synencefalina cuya secuencia es ESSHLLA. El antisuero utilizado para

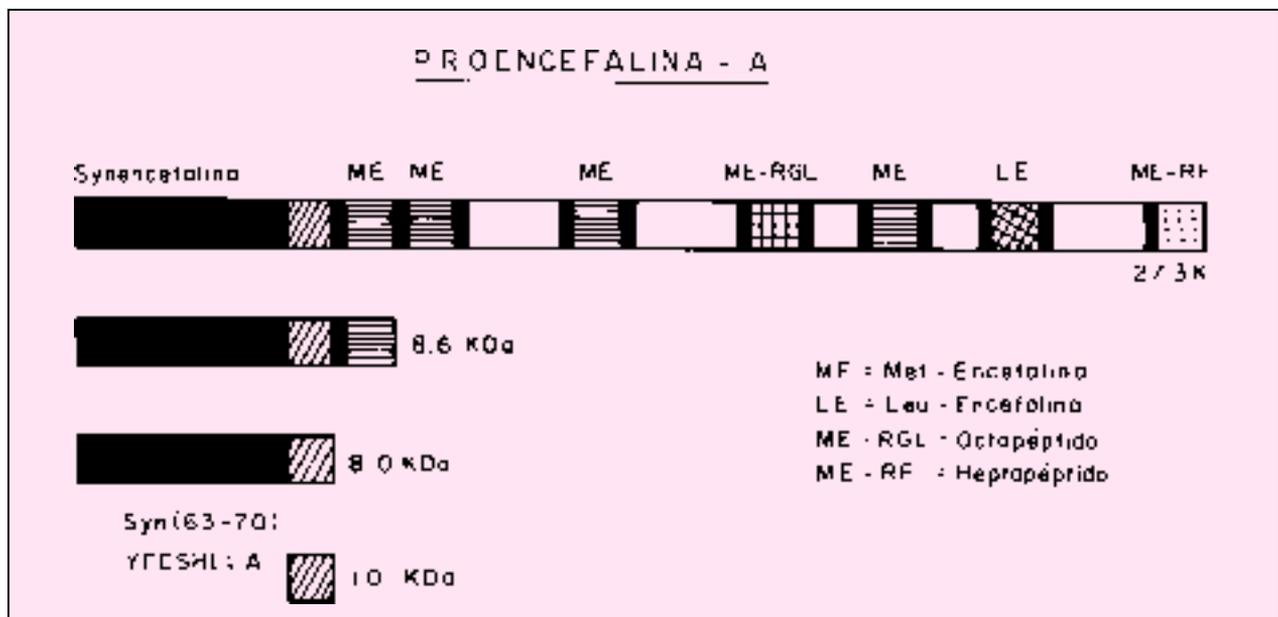


Figura 1. Esquema representativo del precursor de las encefalinas, la proencefalina A.

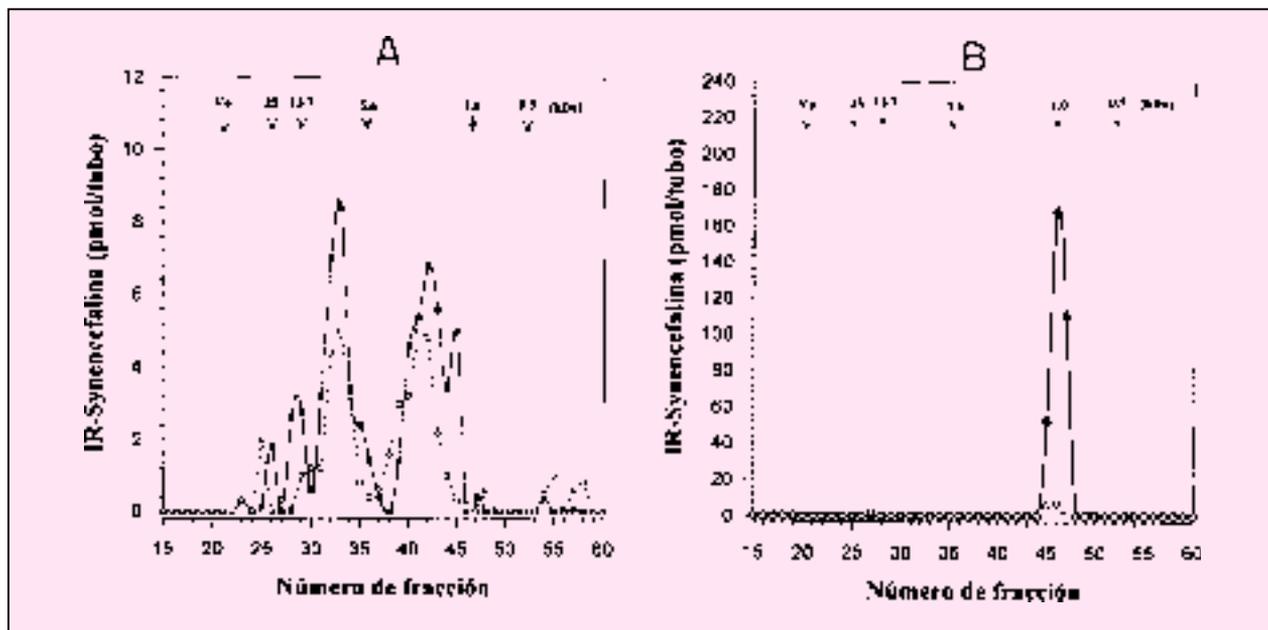


Figura 2. Perfil cromatográfico en Sephadex G-50 de un extracto del cuerpo estriado. Una muestra concentrada del cuerpo estriado ($n=8$), fue añadida a una columna de vidrio (120 x 2 cm) con Sephadex G-50 fino. La columna se equilibró con ácido acético IM (pH 1.9 con ácido clorhídrico). La velocidad de flujo fue de 12 ml/h y se colectaron fracciones de 4 ml, las cuales fueron liofilizadas y resuspendidas en un amortiguador Tris-HCl pH 8.4 y CaCl_2 (2 mM). La determinación de synencefalina se hizo antes (\bullet) y después (\circ) de la digestión enzimática con tripsina y carboxipeptidasa B. La elución de los marcadores de peso molecular fue la siguiente (kDa): Vo azul Dextran (2,000), quimi tripsinógeno 25.0, ribonucleasa A 13.7, insulina 5.6 [Tyr⁶³]-syn-63-70) 1.0, Met-encefalina 0.5.

determinar la Met-encefalina, fue producido en nuestro laboratorio. Las características y los cruzamientos de los antisueros ya fueron descritos previamente (1,19). Los resultados se expresan en inmunoreactividad (IR)-synencefalina o IR-Met-encefalina pmol/tubo.

Cromatografía líquido de alta presión (HPLC)

Las muestras se colocaron en una columna de fase reversa (microbondapak C₁₈ 4 mm, 4 ∞ 250 mm; Waters Instruments). La columna se equilibró con acetonitrilo 10% en 0.1% de TFA (ácido trifluoroacético). La elución se llevó a cabo con un gradiente discontinuo (10-90%). La velocidad de flujo fue de 1 ml/min, y los tubos se colectaron con un volumen de 1 ml. Las alícuotas se liofilizaron y se resuspendieron en un amortiguador para el radioinmunoensayo.

Determinación de proteínas

La cantidad de proteína presente en las muestras se determinó con la técnica de Lowry (10), utilizando albúmina sérica bovina como sustancia patrón. El límite de sensibilidad de la prueba fue de 2.5 mg.

Resultados

En la figura 2A se muestra la distribución de las proteínas de los diferentes pesos moleculares que están presentes en el tejido completo del cuerpo estriado. En esta figura observamos, principalmente, tres proteínas

de 13.7, 8.1, y 2.5 kDa de peso molecular, en las cuales se ubica la mayor concentración de la IR-Syn. En particular, el tubo 33 contiene una proteína de 7.8 kDa, similar a la indicada por el doctor Liston (9). En la porción correspondiente a 1 kDa, la concentración de IR-Syn es insignificante (tubo 46). Los resultados obtenidos después de someter las muestras a la digestión enzimática, mostraron un perfil similar pero con menor concentración de synencefalina.

En la figura 2B se muestra el perfil cromatográfico del material liberado a partir de las rebanadas del cuerpo estriado. Estos resultados muestran un cambio dramático en comparación con los obtenidos en el tejido completo. Por un lado, desaparecen todos los precursores de alto peso molecular para dar lugar a un solo péptido de 1.0 kDa de peso molecular (tubos 45-47). Por el otro, es significativo el aumento en la cantidad de material inmunoreactivo, ya que el tubo 46 mostró un incremento de concentración de 1,800% con respecto al tejido completo. Después del proceso de liberación, la acción enzimática no produjo cambios. La distribución de IR-Met-encefalina (figura 3) mostró un pico de máxima concentración en los tubos 51-52, los cuales corresponden al peso molecular de la sustancia patrón (Met-encefalina, sintética). En contra de lo observado en la synencefalina, el efecto de la digestión enzimática produjo un aumento significativo en la concentración de IR-Met-encefalina (tubos 45-55). El cromatograma no mostró que la Met-encefalina estuviera presente en un precursor de alto peso molecular.

El perfil cromatográfico del material de los sinaptosomas es más complejo. En la figura 4A se muestra una mayor cantidad de proteínas que contienen IR-Syn

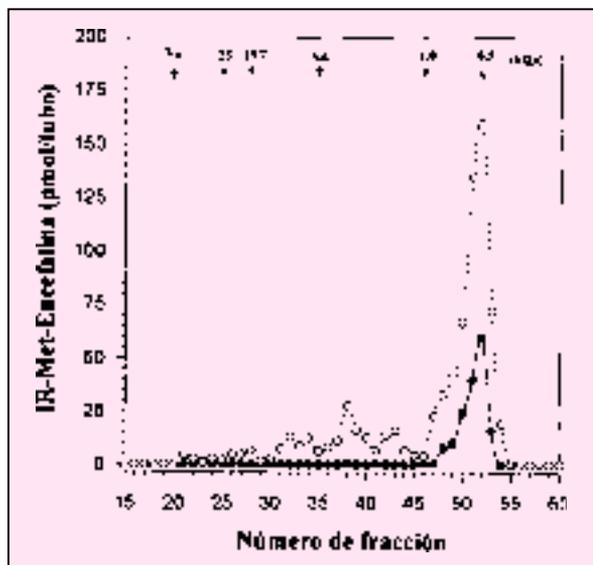


Figura 3. Cromatografía de filtración molecular con Sephadex G-50. En esta figura se muestra el perfil cromatográfico del material inmunoreactivo de la IR-synencefalina y de la IR-Met-enkefalina. La muestra aplicada corresponde a los perfusados de la liberación *in vitro* provocada con alto potasio (55 mM) (n = 8). Las fracciones fueron liofilizadas y resuspendidas en un amortiguador Tris-HCl pH 8.4 y CaCl₂ (2mM). La determinación de synencefalina (A) y de IR-met-enkefalina (B) se hizo antes (•) y después (°) de la digestión enzimática con tripsina y carboxipeptidasa B. La calibración de la columna y la de sus marcadores es igual a la descrita en la figura 1.

en su estructura, principalmente aquéllas cuyos pesos moleculares son del orden de los 13.7, 8.1, 2.5 y 2.0 kDa. En esta figura es importante notar que los tubos 24-27 corresponden a un peso molecular de 25 kDa, que es similar al peso de la proencefalina A (27 kDa).

En forma similar a lo que ocurre en el tejido completo, en la región de 1 kDa la cantidad de IR-Syn es muy baja. La digestión enzimática mostró un perfil similar pero de menor concentración. La figura 4B corresponde al perfil de elución del material liberado por la acción del potasio, en el que los precursores desaparecen nuevamente para dar lugar a un péptido de 1 kDa (tubo 46). En esta figura observamos que la digestión enzimática no produjo efectos sobre la concentración de IR-Syn. Con el propósito de caracterizar el péptido de 1 kDa obtenido durante la liberación *in vitro* (figura 2), se colectaron los tubos 45-47 de las muestras de la liberación de rebanadas (figura 2B). Las muestras fueron liofilizadas y resuspendidas en 0.1% TFA y aplicadas a una columna de HPLC de fase reversa. El resultado muestra que el tiempo de retención de la sustancia liberada del cuerpo estriado, es igual al de la sustancia patrón utilizada [Tyr⁶³]-syn-63-70) cuyo peso molecular es de 1.086 kDa.

Discusión

Los resultados del presente trabajo demuestran que en el cuerpo estriado, más del 98% del contenido total de IR-Syn forma parte de los precursores de alto peso molecular; en particular en una proteína de 8.6 kDa. Estos datos son similares a los indicados previamente por el doctor Liston y col. (9,10). Los autores mencionan que la molécula completa de synencefalina no sufre modificaciones postraduccionales, por lo que sugieren que se conserva y se libera intacta del tejido nervioso. Sin embargo, varias evidencias experimentales demuestran que la synencefalina sí puede ser procesada y se encuentra sujeta a diversos cambios fisiológicos. Durante el desarrollo embrionario (las ratas de 18 días

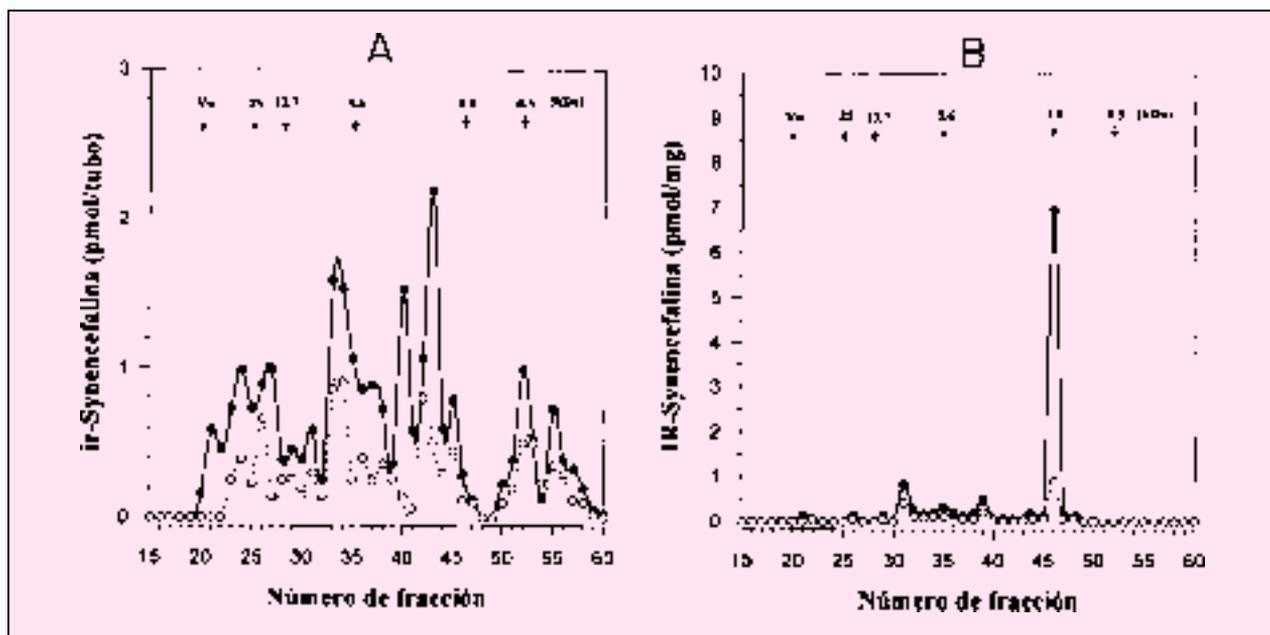


Figura 4. Cromatografía de filtración molecular con Sephadex G-50. La cantidad de sinaptosomas obtenidos del cuerpo estriado (n=8) fueron homogeneizados y centrifugados a 50,000 x g durante 1 h a 4°C. Los sobrenadantes fueron concentrados y aplicados a la columna con Sephadex G-50 (A). Una muestra concentrada de los perfusados provenientes de la liberación *in vitro* de synencefalina a partir de las terminales nerviosas aisladas (B). Las fracciones fueron liofilizadas y resuspendidas en amortiguador Tris-HCl pH 8.4 y CaCl₂ (2mM). La determinación de IR-synencefalina se hizo antes (•) y después (°) de la digestión enzimática con tripsina y carboxipeptidasa B. La calibración de la columna y la de sus marcadores es igual a la descrita en la figura 1.

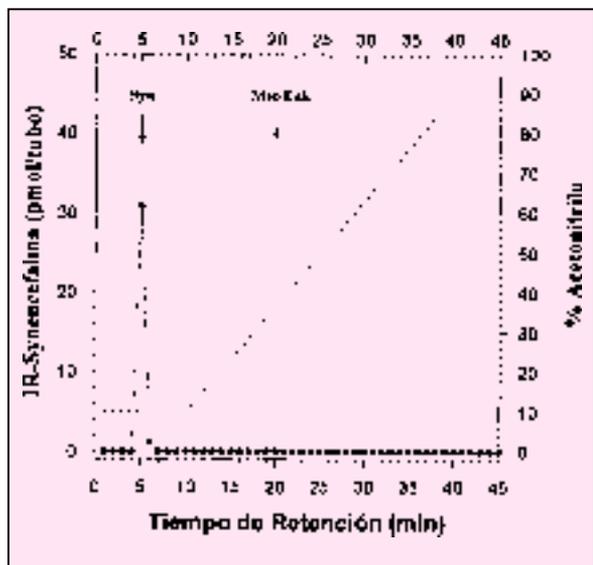


Figura 5. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Las fracciones correspondientes a los tubos 45-48 de la columna con Sephadex G-50, descrita en la figura 2 fueron concentradas y aplicadas a una columna de HPLC de fase reversa m -Bondapak C_{18} de Waters Instruments. La elución de las muestras se llevó a cabo con un gradiente discontinuo con acetonitrilo (10-90%). La velocidad de flujo fue de 1 ml/min y se colectaron fracciones de 1 ml. Las fracciones fueron liofilizadas y resuspendidas en un amortiguador para radioinmunoensayo. Las flechas indican la posición de las sustancias patrón 1: [Tyr⁶³]-Syn (63-70). 2: Met-enkefalina.

de nacidas), la proteína de 8.6 kDa se procesa a un péptido de 1 kDa de peso molecular, mientras que en la rata adulta, la molécula de 8.6 kDa ya no se procesa (14). Saravia y col. (16) demostraron que el péptido de 1 kDa es liberado de las células del sistema inmune a consecuencia de un estímulo que produce estrés.

Bajo los criterios de identificación bioquímica, como la cromatografía de filtración molecular, de afinidad y HPLC, el doctor Vindrola y col. (14) caracterizaron parcialmente a este nuevo péptido de 1 kDa. La secuencia probable es Tyr-Glu-Glu-Ser-His-Leu-Leu-Ala, (YEESHLLA). El aminoácido tirosina se incluye para poder marcar con el radioisótopo ¹²⁵I. Los autores le atribuyen a este péptido la actividad biológica de la synencefalina.

Los resultados encontrados demuestran que el efecto despolarizante inducido por el potasio da lugar al

procesamiento de la synencefalina. Los datos de la figura 2B muestran que todos los precursores de alto peso molecular: 13.7, 8.1, y 2.5 kDa, son completamente procesados a un péptido de 1 kDa. Este procesamiento puede llevarse a cabo por la acción de las enzimas monobásicas (3,13,17). La caracterización por medio de HPLC, indica que la fracción de 1 kDa tiene el mismo tiempo de retención que la sustancia patrón utilizada, la cual corresponde a la secuencia YEESHLLA de 1.086 kDa.

Los resultados del procesamiento de la Syn pueden tener implicaciones para entender el ritmo diurno de los opioides. La concentración y la liberación diurna de las encefalinas es bifásica; el aumento se inicia a las 20:00 h y encuentra su valor más alto a las 24 horas. Por su parte, el incremento en la liberación de IR-synencefalina solamente se manifiesta a las 16 h (dos horas antes de que se inicie la fase de oscuridad) (1). Por lo tanto, los resultados del presente trabajo nos permiten sugerir que la determinación de la IR-Syn de 1 kDa de peso molecular es un indicador directo del procesamiento de la proencefalina A.

Hasta donde sabemos, ésta es la primera evidencia que demuestra que la synencefalina no sólo es capaz de procesarse a un péptido de bajo peso molecular, sino que es el único péptido detectado después del estímulo despolarizante producido por el potasio. Los resultados de las preparaciones de los sinaptosomas (figuras 3 A y B) sugieren que la PA y los subproductos de menor peso molecular no solamente se localizan en el tejido completo, sino que pueden estar presentes en las terminales nerviosas y son capaces de procesarse rápidamente para dar lugar a la synencefalina.

En resumen, nuestros datos demuestran que la synencefalina es capaz de procesarse a un péptido de 1 kDa de peso molecular. Este efecto se produce por un estímulo despolarizante inducido por el potasio, y la determinación de la synencefalina de 1 kDa puede ser un indicador directo del procesamiento del precursor de los péptidos opioides.

Agradecimientos

Los autores agradecen la ayuda técnica de la señora Carmen Navarro y del señor Raúl Cardoso por las ilustraciones. Este trabajo se hizo con el apoyo parcial del CONACyT al proyecto 3236P-M9607 de Miguel Asai.

REFERENCIAS

1. ASAI M, ZUBIETA M, MATAMOROS-TREJO G, LINARES G, AGUSTIN P: Diurnal variations of opioid peptides and synkephalin *in vitro* release in the amygdala of kindled rats. *Neuropeptides*, 32(3):293-299, 1998.
2. ASAI M, AGUSTIN P, BENITEZ-KING G: Estudio de la liberación *in vitro* de péptidos opioides en terminales nerviosas aisladas. *Anales*, 7-14, del Instituto Mexicano de Psiquiatría. X Reunión de Investigación y Enseñanza, 1995.
3. BENOIT R, LING N, ESCH F: A new prosomatostatin-derived reveals a pattern for prohormone cleavage at monobasic sites. *Nature*, 238:1126-1129, 1987
4. COMB M, SEEBURG PH, ADELMAN J, EIDEN L, HEBERT E: Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature*, 295:663-666, 1982.
5. DOUGLAS J, CIVELLI O, HEBERT E: Polyprotein gene expression: generation of diversity of neuroendocrine peptides. *Annu Rev Biochem*, 53:665-715, 1984.
6. GLOWINSKI J, IVERSEN LL: Regional studies of catecholamines in rat brain. *J Neurochem*, 13:655-669, 1966.
7. GUBLER U, SEEBURG P, HOFFMAN BJ, GAGE LP, UDENFRIEND S: Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin containing peptides. *Nature*, 295:206-208, 1982.
8. LISTON DR, VANDERHAEGHEN JJ, ROSSIER J: Presence in brain of synkephalin, a proenkephalin-immunoreactive protein which does not contain enkephalin. *Nature*, 302:62-65, 1983.
9. LISTON DR, ROSSIER J: Synkephalin is coreleased with Met-enkephalin from neuronal terminal *in vitro*. *Neurosci Lett*, 48:211-216, 1984.

10. LOWRY OH, ROSEBROUGH J, FARRAL, RANDALL RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275, 1951.
11. NODA M, FURUTANI Y, TAKAHASHI H, TOYOSATO M, HIROSE T, INAYAMA S, NAKANISHI S: Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal prepro-enkephalin. *Nature*, 295:202-206, 1982.
12. PADROS MR, SARAVIA F, VINDROLA O: Antibodies against the aminoterminal portion of pro-enkephalin inhibits DNA synthesis in human peripheral mononuclear cells. *J Neuroimmunology*, 61:79-83, 1995.
13. PEACH RJ, BRENNAN SO: Identification of a calcium-dependent microsomal proteinase responsible for monobasic cleavage of chicken proalbumin. *Biochim Biophys Acta*, 990(3):276-279, 1989.
14. RODRIGUEZ-VIDA MI, KLEID MC, ASE A, FINKELMAN S, NAHMOD VE, VINDROLA O: Synenkephalin processing in embryonic rat brain. *Develop Brain Res*, 77:151-156, 1994.
15. SARAVIA F, ASE A, VINDROLA O: Diferential protranslational processing of proenkephalin in rat bone marrow and spleen mononuclear cells: evidence for synenkephalin cleavage. *Endocrinology*, 132:1431-1437, 1993.
16. SARAVIA F, PADROS MR, ASE A, ALOYZ R, DURAN S, VINDROLA O: Differential response to a stress stimulus of proenkephalin peptide content in immune cells of naive and chronically stressed rats. *Neuropeptides*, 32(4):351-359, 1998.
17. SCHWARTZ TW: The processing of peptide precursors. Proline-directed arginyl cleavage and other monobasic processing mechanisms. *FEBS Lett*, 5(1):1-10, 1986.
18. STELL WK, CHAMINADE M, METTERS KM, ROUGEOT C, DRAY F, ROSSIER J: Detection of synenkephalin, the amino-terminal portion of proenkephalin, by antisera directed against its carboxyl terminus. *J Neurochem*, 54(2):434-443, 1990.
19. VINDROLA O, PADROS MR, STERIN-PRYNC A, ASE A, FINKIELMAN S, NAHMOD V. Proenkephalin system in human polymorphonuclear cells. Production and release of a novel 1.0 kD peptide derived from synenkephalin. *J Clin Invest*, 86:531-537, 1990.



**CENTRO DE INFORMACION Y DOCUMENTACION
DIVISION DE ENSEÑANZA**

Servicios bibliográficos especializados para los profesionales de la salud mental

El Centro de Información y Documentación del Instituto Mexicano de Psiquiatría proporciona los siguientes servicios:

- **Investigaciones bibliográficas** mediante la consulta en línea a los sistemas mundiales de información MEDLARS [Medical Literature Analysis and Retrieval System] y DIALOG [Dialog Information Services, Inc.].
- **Investigaciones bibliográficas** mediante la consulta directa a diferentes bases de datos en CD-ROM's [compact disc-read only memory] y en DISKETTE.
- **Citas bibliográficas** a un autor determinado mediante la consulta en línea al Science Citation Index.
- **Localización y obtención de artículos** de revistas disponibles en otras unidades de información nacionales y del extranjero.
- **Perfiles de actualización mensual** sobre lo último publicado en un tema específico.
- **Biblioteca**, préstamo de libros y obras de consulta para uso en sala de lectura.
- **Hemeroteca**, préstamo de publicaciones periódicas para uso en sala de lectura.
- **Fotocopiado** de documentos prestados por el mismo centro.
- **Préstamo interbibliotecario** mediante el establecimiento de convenios institucionales.
- **Videoteca**, préstamo institucional de material audiovisual.
- **Venta de libros** editados por el Fondo de Cultura Económica con descuento de un 25% sobre el precio de lista.

Horario de servicio: lunes a viernes de 8:30 a 15:00 hrs.

Mayor información: Instituto Mexicano de Psiquiatría/Centro de Información y Documentación. Calz. México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco. Deleg. Tlalpan, 14370 México, D.F. Tel. 655-28-11/Fax 655-42-92.

DIRECTORIO DEL INSTITUTO MEXICANO DE PSIQUIATRIA

- Dr. Ramón de la Fuente
Director Emérito
- Dr. Gerardo Heinze Martín
Director General
- Dr. Humberto Nicolini S.
Jefe de la División de Investigaciones Clínicas
- Dr. Augusto Fernández-Guardiola
Jefe de la División de Investigaciones en Neurociencias
- Dra. Ma. Elena Medina-Mora
Jefe de la División de Investigaciones Epidemiológicas y Sociales
- Dr. José García Marín
Jefe de la División de Servicios Clínicos
- Dra. Blanca E. Vargas
Jefe de la División de Enseñanza