

Factor hipotalámico inhibidor de la secreción de hormona luteinizante: Relación con fragmento 1-5 de hormona liberadora de LH*

Hypothalamic Factor inhibitor of LH secretion: Relationship with fragment
1-5 of Gonadotropin releasing Hormone

MANUEL DE LA LASTRA Y JUAN LEAL

Laboratorio de Endocrinología, Departamento de Ciencias Fisiológicas
Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile,
Casilla 114-D, Santiago, Chile

In this paper we review the mechanisms underlying the control of gonadotrophin (Gn) release and present evidences of the existence of a luteinizing hormone release-inhibitory factor. We have extracted and partially characterized this factor from rat hypothalamus and bovine median eminence. Our data indicate that the factor is a peptide that has a common antigenic determinant with GnRH, but is of smaller molecular weight than GnRH (750 daltons approximately).

These facts strongly suggest that it may be a fragment of the GnRH molecule. The synthetic fragment GnRH (1-5) has similar biologic effects and molecular weight to those of the inhibitory factor obtained from the median eminence and hypothalamus. GnRH (1-5) has been shown to be produced *in vitro* by cleavage of GnRH by an hypothalamic endopeptidase.

Based on this evidences, we suggest that the inhibitory peptide found by us is formed *in vivo* by degradation of GnRH. Moreover, we suggest that this factor may play a role on the regulation of LH release induced by GnRH.

La secreción de gonadotropinas (LH y FSH) está sometida a un complejo sistema de control, cuyo componente más importante y mejor conocido es la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Esta es un decapeptido que estimula tanto la síntesis como la liberación de la hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH). Es producida por neuronas ubicadas en el área preóptica del hipotálamo medio ventral y conducida a través de los axones de estas neuronas hacia el infundíbulo y núcleo arcuato, donde se vierte a los capilares de la red primaria del sistema portahipofisario, que la conduce a las células gonadotropas de la adenohipofisis.

La forma de entrega del GnRH hacia la red portahipofisaria es intermitente, con la modalidad de pulsos, cuya frecuencia y magnitud representan un código que determina la cantidad de gonadotropinas liberada y la proporción entre ambas (LH/FSH) (1, 2).

La modalidad secretora del hipotálamo está regulada, a su vez, por estímulos noradrenérgicos (estimulantes) y opioides (inhibidores) (3-5). Además, el ambiente endocrino en que funciona el cerebro y la adenohipofisis modula la frecuencia de los pulsos secretorios de GnRH y la sensibilidad de la pituitaria a esta hormona.

Los esteroides gonadales tienen una acción inhibidora o estimulante sobre la secreción de gonadotropinas, actuando tanto a nivel hipotalámico como hipofisario (1, 6). El tipo de efecto va a depender de las concentraciones sanguíneas de esteroides, de la velocidad con que ocurra el cambio de concentración hormonal y del sexo.

En general, la administración de estrógenos o andrógenos determina una caída de los niveles sanguíneos de LH y de FSH, lo que representa un feedback negativo de estas hormonas. La supresión de este elemento frenador, que ocurre con la cas-

* Investigación financiada por la Dirección de Investigación de la Universidad Católica, DIUC 69/82 y 71/84; y por la Fundación Rockefeller, RF-83016.

Este trabajo corresponde en parte a la investigación realizada por Juan Leal como parte de los requisitos establecidos por la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Católica de Chile para la obtención del grado de Doctor.

tración o el tratamiento con antiestrógenos o antiandrógenos, desencadena una mayor secreción de gonadotropinas y, por lo tanto, una elevación de su nivel sanguíneo. En estas condiciones, la administración de esteroides gonadales produce una disminución de la secreción gonadotrópica.

En ratas hembras normales, la inyección de estrógenos produce inicialmente una disminución de la sensibilidad hipofisaria al GnRH, que después de algunas horas deja lugar a un aumento de la sensibilidad al liberador.

En monos se ha observado este efecto del estradiol sobre la hipófisis cuando la concentración sanguínea de esa hormona sobrepasa los 150 pg/ml durante un período mínimo de 36 horas. En ese momento el feedback negativo se hace positivo y la reactividad al GnRH alcanza un máximo (1).

La influencia del sexo se puede apreciar en el fenómeno del feedback negativo de la testosterona en el macho: durante la administración prolongada de esta hormona se produce una caída de la concentración sanguínea de gonadotropinas sin cambios en la sensibilidad hipofisaria al GnRH por lo que el efecto inhibitor debe ocurrir predominantemente a nivel hipotalámico.

Los diversos elementos que controlan la función gonadal se extienden desde el hipotálamo a la adenohipófisis y gónada, tomando la forma que se ha descrito como eje o cascada para graficar el hecho de que los elementos superiores del eje actúan sobre los ubicados inmediatamente en el plano inferior, los cuales, a su vez, pueden influir sobre los superiores a través de fenómenos de feedback o retroalimentación de tipo positivo o negativo. Esta disposición en cascada permite una amplificación de las respuestas secretoras sucesivas: nanogramos de GnRH liberados en el ámbito muy reducido de la circulación portahipofisaria estimulan la secreción de microgramos de gonadotropinas, que a su vez determinan la secreción de miligramos de esteroides gonadales. Estas son cantidades suficientes para dar una concentración en la sangre sistémica capaz de modificar la actividad secretora del hipotálamo y de la

adenohipófisis en el feedback llamado de "asa larga".

También se han descrito fenómenos de feedback de asa corta y ultracorta, a cargo respectivamente de las gonadotropinas y de la hormona liberadora, que actúan frenando a las neuronas productoras de GnRH.

A estos mecanismos se ha agregado otro de tipo humoral, representado por la Foliculostatina ovárica y la Inhibina testicular, aparentemente una misma substancia, producida por las células de la granulosa ovárica y las células de Sertoli del testículo. Este factor actúa como un inhibidor específico de la secreción de FSH, con mínima o nula acción sobre LH (7).

Este doble mecanismo humoral de control de FSH es similar a los existentes para otras hormonas hipofisarias, tales como Prolactina (PRL), Tirotropina (TSH), Somatotropina, Intermedina, sugiriendo que pueda obedecer a un esquema común para las secreciones de la hipófisis. Esta consideración lleva a plantear la posibilidad de que también exista un factor inhibitor de la secreción de LH, sobre cuya existencia se han dado numerosas evidencias de muy diverso valor probatorio, y sobre las cuales volveremos más adelante.

Además de los elementos de control ya mencionados en relación a la secreción de LH y de FSH, ha ido emergiendo últimamente la noción de otro componente regulador representado por los sistemas de enzimas proteolíticas presentes tanto en tejido cerebral como en la hipófisis (8, 9).

Estas enzimas actúan en varios sentidos sobre las secreciones endocrinas:

1. Acción sobre precursores hormonales o pre-hormonas, separando la molécula biológicamente activa, como sucede con la pre-pro-opiomelanocortina y con pro-GnRH.
2. Acción degradadora en el órgano de origen de hormonas producidas en exceso y que no son requeridas en determinado momento funcional.
3. Acción degradadora en el órgano blanco de hormonas que ya ejercieron su efecto biológico o que permanecen en la circulación.

4. Facilitación de la exocitosis de vesículas secretoras.

Como se puede apreciar, las proteasas resultan importantes tanto en la génesis como en la inactivación de la hormona. Pero debemos tener presente que la inactivación enzimática puede significar, y de hecho significa, en varios casos la aparición de sustancias dotadas de actividad biológica diferente de las exhibidas por la hormona nativa. Un hermoso ejemplo de este fenómeno es el que afecta al tripéptido pGlu-His-Pro, liberador de Tirotropina (TRH) (10). Por acción de la enzima pGlutamyl-aminopeptidasa se desprende el aminoácido glutámico y el dipéptido resultante forma espontáneamente la estructura cíclica His-Pro-Diketopiperazina (His-Pro-DKP). Este péptido inhibe a los lactótrofos hipofisarios, cuya secreción es estimulada por el tripéptido original. Vemos así que TRH estimula la secreción de TSH y de PRL y que un producto de su degradación enzimática, que ocurre tanto a nivel hipotalámico como pituitario, inhibe a los lactótrofos. Podemos visualizar en este ejemplo varias posibilidades de regular la secreción de PRL que depende de la relación entre TRH y His-Pro-DKP que llega desde el hipotálamo a la hipófisis, así como de la velocidad con que la enzima pGlutamyl-aminopeptidasa inactiva al TRH nativo a nivel de la adenohipófisis.

Para el caso de GnRH existen varias peptidasas con actividad sobre ella, tanto en la hipófisis como en el hipotálamo; pero las principales dependen de dos enzimas (9): Una endopeptidasa, que también hidroliza a sustancia P, Bradicinina, neurotensina y angiotensina. La otra enzima es la postprolina hidrolizante, con actividad también sobre TRH.

La endopeptidasa actúa sobre la unión entre los aminoácidos Tyr⁵-Gly⁶ lo que da origen a los fragmentos GnRH (1-5) y GnRH (6-10), de los cuales este último es degradado rápidamente (11).

La actividad enzimática hipotalámica experimenta cambios notables en relación a la función reproductiva, de modo que se puede pensar en su posible rol regulador de estas funciones fisiológicas (12, 13, 14, 15). Es así que se ha encontrado en la rata una

disminución de la actividad degradante de GnRH asociada a la descarga preovulatoria de LH en el proestro y a la provocada por la inyección de Progesterona. En la gallina se ha observado su disminución en relación a períodos de inactividad sexual y un aumento en relación a la mayor actividad reproductiva (16).

También se ha mostrado un aumento de la actividad degradante de GnRH bajo el influjo de la Dopamina en hipotálamo *in vitro* de rata hembra, especialmente en proestro, pero no en el de macho (12). La actividad de la enzima postprolina hidrolizante, en cambio, permanece constante en todos los modelos estudiados, lo que sugiere un rol menos importante que el de la endopeptidasa en la regulación de los fenómenos reproductivos. La inespecificidad de las proteasas hipotalámicas da la posibilidad de que varios sustratos compitan entre sí, dando lugar a grados variables de degradación de cada uno, según sea la proporción en que se encuentren presentes.

Es posible que la ubicación topográfica le confiera especificidad, como lo sugiere Advis (17) al demostrar que su presencia ocurre mayoritariamente en las zonas en que hay mayor cantidad de GnRH: Banda diagonal de Broca en su parte media y lateral, área supraóptica media, región supraquiasmática, parte dorsal del núcleo supraóptico, núcleo septal medial, zona infundibular y eminencia media.

La degradación de la hormona liberadora ocurre posiblemente en las vesículas secretoras dentro de las neuronas (18), especialmente en los axones y sus terminaciones, lo que da una buena base para elegir a la eminencia media, rica en estas terminaciones, como fuente para obtener las enzimas y los productos de degradación de GnRH, tema sobre el cual volveremos más adelante.

FACTOR INHIBIDOR DE LA LIBERACIÓN DE LH

La búsqueda de un factor hipotalámico inhibidor de la secreción de LH se ha extendido a lo largo de varios años (19). Entre los primeros indicios confiables sobre su existencia están los aportados por

Hopkins y Pincus (20), quienes obtuvieron con homogenizados de hipotálamos de rata una inhibición de la ovulación inducida con gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) en ratas inmaduras. Resultados similares obtuvimos con homogenizados de hipotálamos humanos (21).

Los intentos de purificación del factor inhibidor se realizaron inicialmente con procedimientos físicos tales como diálisis, centrifugación de homogenizados y posteriormente por fraccionamiento subcelular del tejido hipotalámico (22, 23). Con este procedimiento, Taber y col. obtuvieron del hipotálamo de rata una fracción mitocondrial, que al ser subfraccionada proporcionó un componente estimulante de la secreción *in vitro* de LH y otro que inhibía su liberación, pero no su síntesis (22).

Con el mismo método Forcelledo y De la Lastra (23) obtuvieron del hipotálamo de rata una fracción inhibidora de la ovulación inducida con PMSG en rata inmadura y con LH en rata adulta bloqueada con clorpromazina en el proestro. Esta fracción era predominantemente nuclear y mostró actividad inhibidora sobre la secreción de LH inducida con GnRH en rata macho inmadura. La fracción microsomal estimulaba, en cambio, la secreción de LH y la ovulación inducida con PMSG en ratas inmaduras (23). La fracción inhibidora no mostró relación dosis-respuesta, fenómeno ya descrito con los extractos totales (20). Un hecho digno de destacarse en este trabajo fue el hallazgo de actividad inhibitoria en hipotálamo de ratas hembras inmaduras, pero no en el de ratas adultas de ambos sexos ni en el de machos inmaduros, lo que establece una diferencia sexual y sugiere una posible participación del material inhibidor en el fenómeno de la maduración sexual de la rata. Este hallazgo no se ha confirmado al utilizar un método químico de extracción, por lo que debe corroborarse utilizando técnicas más depuradas para la obtención del factor inhibidor.

La técnica utilizada hasta ese momento para obtener el factor inhibidor hipotalámico no daba un resultado satisfactorio por la permanente contaminación de las fracciones, lo que se traducía en una gran variabilidad de los resultados obtenidos. Esto

nos llevó a abandonar el fraccionamiento subcelular y a intentar un procedimiento químico de extracción.

Iniciamos una etapa experimental usando un método descrito (24) para la obtención de un péptido pineal inhibidor de TRH.

El procedimiento consiste en extraer el tejido homogenizado con una mezcla de proporciones iguales de ácido acético 0.5 M y heptano, 8 ml de cada uno/gr de tejido fresco. Los componentes lipídicos quedan en la fase heptánica, en tanto que las proteínas y péptidos, se disuelven en la fase ácida. Esta es liofilizada y el polvo obtenido es suspendido en metanol, 20 ml/gr original, que precipita las proteínas de alto peso molecular mientras que los péptidos quedan en solución.

El metanol es evaporado y el residuo peptídico fue ensayado sobre la ovulación inducida con 200 ng de GnRH sintético en ratas bloqueadas en la mañana del proestro con clorpromazina (1 mg/100 gr). Este ensayo nos permitió comprobar que la actividad inhibitoria detectada anteriormente en la fracción nuclear estaba presente en el material peptídico y que mostraba la misma peculiaridad de carecer de relación dosis/efecto, ya que la dosis equivalente a 1/4 de hipotálamo (Hipot-Eq) era inhibidora, pero no las dosis de 1/2 Hipot-Eq o de 1 Hipot-Eq (Fig. 1).

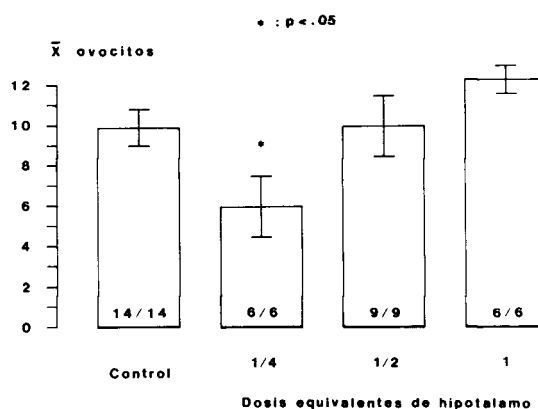


Fig. 1: Efecto de distintas dosis de fracción peptídica de hipotálamo de rata sobre la ovulación inducida con GnRH sintética en ratas bloqueadas con clorpromazina en la mañana del proestro (1 mg/100 gr). A las 13 horas del proestro se inyectó, por vía endovenosa y bajo anestesia etérea, el extracto hipotalámico en dosis equivalentes a 1/4, 1/2 ó 1 hipotálamo, o su solvente, seguido de 200 ng de GnRH sintética. Al día siguiente (estro) se hizo el recuento de ovocitos presentes en los oviductos.

Este hallazgo nos indujo a utilizar en los experimentos siguientes una especie de mayor tamaño que la rata para disponer de mayores cantidades de material. Fue así que iniciamos la recolección de eminencias medias (EM) de bovinos, seleccionando esta zona del hipotálamo por ser la más rica en terminaciones axonales cargadas de péptidos reguladores sobre las funciones hipofisarias. Además, usamos posteriormente como test biológico la secreción de LH y FSH estimulada por 200 ng de GnRH sintético, en ratas machos inmaduros (100-140 gr), a los que se les administraba previamente el extracto peptídico.

Debido a la heterogeneidad del material peptídico ensayado, se intentó su fraccionamiento por medio de la cromatografía en columnas de Sephadex G-25, que discrimina péptidos de peso molecular entre 5.000 y 100 daltons.

Este procedimiento permitió obtener 3 picos ópticos, medidos a 230 nm, cuando se usó una columna de 150 x 1.6 cm.

El material correspondiente al peak N° 3 inhibió significativamente la secreción de LH inducida con GnRH, sin afectar significativamente la descarga de FSH (Fig. 2). Posteriormente, empleamos columnas de Sephadex G-25 de mayores dimensiones (200 x 2,0 cm) que proporcionaron una

mejor separación en 4 picos ópticos de la mezcla de péptidos obtenidos por el procedimiento anteriormente descrito.

El material inhibidor de la secreción de LH se ubicó en el pico N° 4. Una calibración previa de la columna con péptidos de varios pesos moleculares, entre ellos 125 I-GnRH permitió comprobar que el factor inhibidor era de menor peso molecular que GnRH, aproximadamente de 750 daltons.

El fenómeno observado de falta de relación dosis-efecto lo habíamos atribuido hasta ese momento a la contaminación del factor inhibidor con otro péptido de acción antagonista, como GnRH.

Teniendo en mente esta posibilidad, decidimos tratar el material del peak inhibidor con un anticuerpo monoclonal anti-GnRH obtenido a través del Profesor Talwar (New Delhi, India).

Con este fin se montó una columna inmunoabsorbente de Sepharosa unida al anticuerpo y a través de ella se pasó el material obtenido del peak inhibidor. Esta columna retenía un 90% del GnRH agregado en cantidad de 200 ug, muy superior a la contenida en el extracto de EM.

Observamos que el material inhibidor era reconocido por el anticuerpo ya que el peak activo al ser pasado por esta columna perdía su actividad inhibidora (Fig. 2). Además, tenemos que el eluido, obtenido tratando a la columna con Glicina 0,1 M, pH 2,5, que desprende al material fijado al anticuerpo, era fuertemente inhibidor de la secreción de LH cuando se administró en una dosis equivalente a 0,4 eminencia media (EM-Eq); pero no en dosis de 1,2 EM-Eq (Fig. 3). Con esto concluimos que el factor inhibidor tiene un determinante antigénico común con GnRH.

Por estas consideraciones estimamos probable que el inhibidor fuese un fragmento de la molécula de GnRH producido por la acción de proteasas hipotalámicas (9), especialmente la endopeptidasa, de cuya acción resultan los fragmentos GnRH (1-5) y GnRH (6-10). Otros autores han planteado que la escisión ocurriría entre Gly⁶-Leu⁷, lo que nos llevó a ensayar el efecto sobre la secreción de LH estimulada por GnRH de varios fragmentos

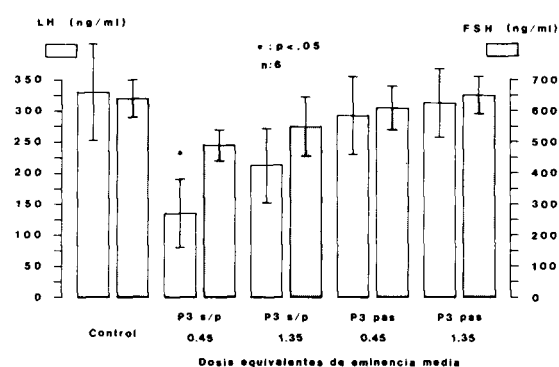


Fig. 2: Efecto de la fracción inhibidora obtenida de eminencia media de vacas por cromatografía en Sephadex G-25 (160 x 1,6 cm) sobre la secreción de LH y FSH inducida por 200 ng de GnRH sintética en ratas machos inmaduras. La fracción inhibidora se ensayó en dosis equivalentes a 0,45 y 1,35 eminencias medias, diferenciando el material pasado (pas) y sin pasar (s/p) por la columna inmunoabsorbente anti-GnRH. El material se inyectó por vía intraperitoneal 15 min antes de la dosis de 200 ng de GnRH, administrada por la misma vía. 30 min después de ésta se obtuvo la muestra de sangre por decapitación, procediendo a determinar los niveles de gonadotropinas plasmáticas por radioinmunoanálisis.

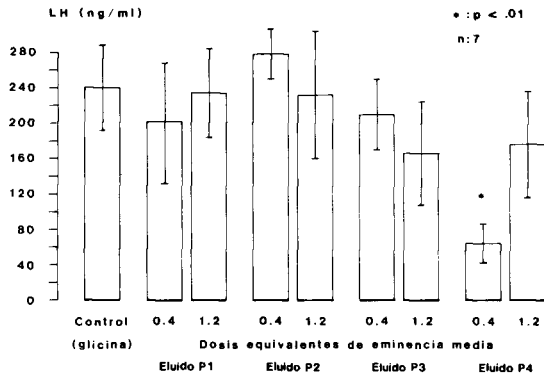


Fig. 3: Efecto sobre la secreción de LH, estimulada por GnRH, del material de eminencia media de vaca retenida por la columna inmunoabsorbente (anti-GnRH). Las cuatro fracciones obtenidas por cromatografía en Sephadex G-25 (200 x 2 cm) fueron pasadas por la columna de inmunoabsorción y el material de cada fracción que permaneció retenido en ésta fue eluido con Glicina 0,1 M, pH: 2,5. Este material, previamente neutralizado, se ensayó en dosis equivalentes a 0,4 y 1,2 eminencias medias en el test descrito en la figura 2.

sintéticos: GnRH (1-5), GnRH (5-10) y GnRH (1-6); encontrándose que GnRH (1-5) ejerce una actividad inhibitoria sobre la liberación de LH, pero no sobre la de FSH. La inhibición se observó sólo con la dosis de 50 ng; pero no con 200, 800 ni 3.200 ng (Fig. 4). La dosis inhibitoria de

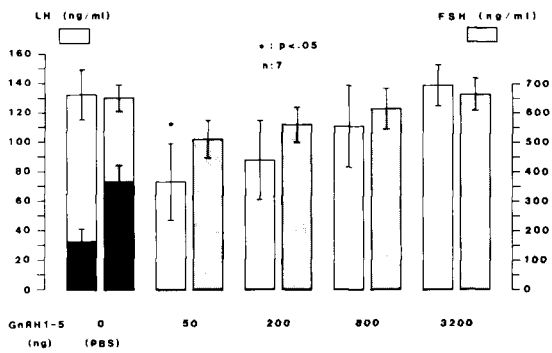


Fig. 4: Efecto de varias dosis del fragmento GnRH (1-5) sobre la secreción de LH y FSH, estimulada por GnRH sintética. El fragmento o su solvente se ensayó de acuerdo al test descrito en la figura 2. La zona oscura de las barras del grupo control representan la concentración basal de gonadotropinas, es decir ratas no tratadas con GnRH.

GnRH (1-5) se ensayó luego en el test de ovulación, donde produjo también una inhibición significativa cuando ésta era inducida con GnRH, pero no cuando ésta se hacía en ratas hipofisectomizadas, inyectadas iv con 3 ug de LH en la tarde del proestro, después del fragmento (Fig. 5).

Los efectos descritos del fragmento GnRH (1-5) reproducen los observados con

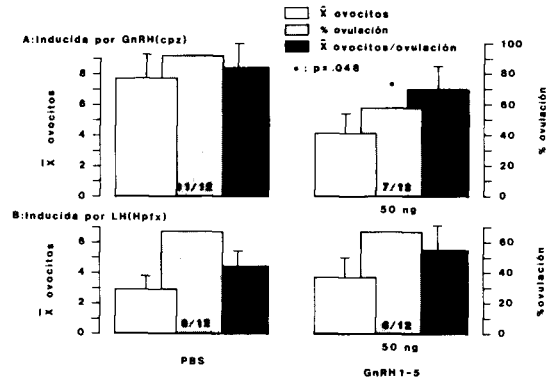


Fig. 5: Efecto del fragmento GnRH (1-5) sobre la ovulación.

A: Ovulación inducida con 200 ng de GnRH en ratas inyectadas en la mañana del proestro con clorpromazina. B: Ovulación inducida con LH (3 ug/100 g) en ratas hipofisectomizadas en la mañana del proestro. Al día siguiente (estro) se hizo el recuento de ovocitos presentes en el oviducto. Los resultados se expresan como promedio (\bar{x}) de ovocitos en las ratas del grupo. Para un mejor análisis, se incluyen en forma separada el porcentaje de ratas que ovuló y el promedio de ovocitos por rata que ovuló. La comparación estadística se hizo con el test de *Kruskal-Wallis*, que considera ambos parámetros.

el factor inhibitor obtenido de hipotálamo de rata y de eminencia media de vacuno, incluso su peculiaridad de carecer de relación dosis-efecto. El hecho de que el factor natural posea un determinante antigénico común con el decapeptido y un peso molecular inferior a éste, sugiere fuertemente que ambos, el péptido sintético y el factor hipotalámico, correspondan a una misma entidad química.

El principal apoyo a esta idea lo constituye el hecho de que GnRH (1-5) sea uno de los fragmentos que se originan naturalmente por la actividad endopeptidásica reconocida en adenohipofisis, hipotálamo y otras regiones del sistema nervioso. La confirmación de esta hipótesis se lograría con el aislamiento y caracterización del péptido natural, lo que puede lograrse a través de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), proceso en el cual estamos trabajando en la actualidad.

Las evidencias halladas sugieren un posible esquema de regulación gonadotrópica en que a los factores reconocidos hasta ahora debe agregarse la actividad inhibitoria sobre LH de uno de los fragmentos resultantes de la hidrólisis de GnRH por la endopeptidasa existente en hipotálamo e hipofisis, GnRH (1-5) (Fig. 6).

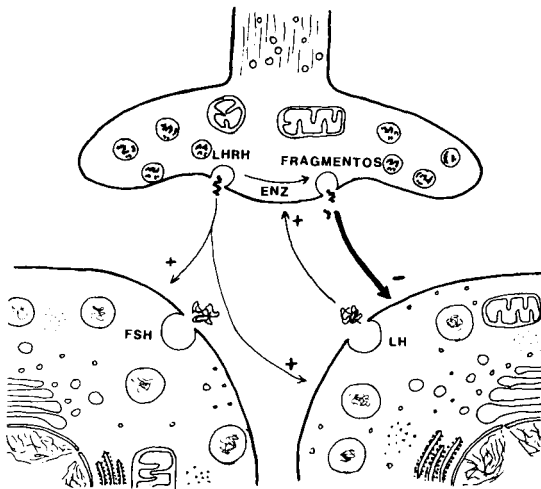


Fig. 6: Esquema propuesto sobre la intervención de fragmentos de GnRH en la regulación secretora de LH. Se representa un terminal peptidérgico de la eminencia media que libera GnRH o fragmentos originados por la acción de enzimas proteolíticas. Mientras GnRH estimula la secreción de LH y de FSH por los gonadotropos, a su vez, LH activa la enzima hipotalámica degradadora de GnRH, con lo que disminuye la cantidad de esta hormona disponible para ser liberada y genera un antagonista a su acción sobre los gonadotropos.

BIBLIOGRAFIA

1. E. KNOBIL (1980) The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Rec. Prog. Horm. Res.* 36: 53-88.
2. L. WILDT, A. HAUSLER, G. MARSHALL, J.S. HUTCHINSON, T.M. PLANT, P.E. BELCHETZ, E. KNOBIL (1981) Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the Rhesus monkey. *Endocrinology* 109: 376-385.
3. S.M. McCANN, R.L. MOSS (1975) Putative neurotransmitters involved in discharging gonadotropin-releasing neurohormones and the action of LH-releasing hormone on the CNS. *Life Sci.* 16: 833-852.
4. J.F. BRUNI, D.A. VAN VUGT, S. MARSHALL, J. MEITES (1977) Effects of naloxone, morphine and methionine enkephaline on serum prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, thyroid stimulating hormone and growth hormone. *Life Sci.* 21: 461-466.
5. D.A. VAN VUGT, J. MEITES (1980) Influence of endogenous opiates on anterior pituitary function. *Federation Proc.* 39: 2533-2538.
6. G. FINK (1979) Feedback action of target hormones on hypothalamus and pituitary with special reference to gonadal steroids. *Ann. Rev. Physiol.* 41: 571-585.
7. M.L. MARDER, C.P. CHANNING, N.B. SCHWARTZ (1977) Suppression of serum follicle stimulating hormone in intact and acutely ovariectomized rats by porcine follicular fluid. *Endocrinology* 101: 1639-1642.
8. B.J. CHERTOW (1981) The role of lysosomes and proteases in hormone secretion and degradation. *Endocrine Rev.* 2: 137-173.
9. J.F. KELVY (1983) Enzymatic degradation of brain peptides. In: *Brain Peptides*. D.T. Krieger, M. Brownstein, Editors. John Wiley and Sons Inc. (Publisher) Chapt. 4 pp: 117-133.
10. K. BAUER, K.J. GRAF, A. FAIVRE-BAUMAN, S. BEIER, A. TIXIER-VIDAL, H. KLEINKAUF (1978) Inhibition of prolactin secretion by histidyl-proline-diketopiperazine. *Nature* 274: 174-175.
11. J.R. McDERMONTT, A.I. SMITH, P.R. DODD, J.A. HARDY, J.A. EDWARDS (1983) Mechanism of degradation of LH-RH and neurotensin by synaptosomal peptidases. *Peptides* 4: 25-30.
12. D. MARCANO de COTTE, C.E.L. DE MENEZES, G.W. BENNETT, J.A. EDWARDS (1980) Dopamine stimulates the degradation of gonadotropin-releasing hormone by rat synaptosomes. *Nature* 283: 487-489.
13. H. KUHL, C. ROSNIATOWSKI, H.D. TAUBERT (1978) The activity of an LHRH degrading enzyme in the anterior pituitary during the rat estrous cycle and its alteration by injections of sex hormones. *Acta Endocrinol.* 87: 476-484.
14. H. KUHL, C. ROSNIATOWSKI, H.D. TAUBERT (1979) Effect of sex steroids on LHRH degrading activity during the estrous cycle in adult female rats. *Endocrinol. Exp.* 13: 29-38.
15. H. KUHL, J. SANDOW, B. KRAUSS, H.D. TAUBERT (1979) Enzyme kinetics studies and inhibition by oligopeptides of LH-RH degradation in rat hypothalamus and pituitary. *Neuroendocrinol.* 28: 339-348.
16. J.P. ADVIS, A.M. CONTIJOCH, A.L. JOHNSON (1985) Discrete hypothalamic distribution of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) content and of LHRH-degrading activity (LHRH-DA) in laying and non laying hens. *Biol. Reprod.* 32: 820-827.
17. J.P. ADVIS, R.O. KULJIS, G. DEY (1985) Distribution of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) content and total LHRH-degrading activity (LH-RH-DA) in the hypothalamus of the ewe. *Endocrinology* 116: 2410-2418.
18. H. GAINER, Y.Z. RUSSELL, Y. PENG LOH (1985) The enzymology and intracellular organization of peptide precursor processing: The secretory vesicle hypothesis. *Neuroendocrinology* 40: 171-184.
19. M. DE LA LASTRA (1971) Sustancias inhibitorias de las gonadotropinas. *Medicina (Bs. Aires)* 31: 455-461.
20. T.F. HOPKINS, G. PINCUS (1965) Effects of rat hypothalamic and cerebral tissue on PMS-induced ovulation. *Endocrinology* 76: 1177-1183.
21. M. DE LA LASTRA, J. ARRAU (1970) Inhibitory action of extracts of human hypothalamic extracts on ovulation in the rat. *Acta Physiol. Lat. Amer.* 20: 58-65.
22. C.A. TABER, H.J. KARAVOLA (1975) Subcellular localization of LH releasing activity in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 96: 446-452.
23. M.L. FORCELLEDO, M. DE LA LASTRA (1977) Subcellular hypothalamic fractions active on ovulation and luteinizing hormone release in the rat. *Neuroendocrinology* 24: 45-54.
24. J. VRIEND, P.M. HINKLE, K.M. KNIGGE (1980) Evidence for a thyrotropin-releasing hormone inhibitor in the pineal gland. *Endocrinology* 107: 1791-1797.

