

Distribución regional de aminopeptidasas cerebrales en rata

F. Alba*, J. C. Arenas, C. Iríbar y M. Ramírez

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Medicina
Universidad de Granada
18012 Granada (España).

(Recibido el 9 de abril de 1992)

F. ALBA, J. C. ARENAS, C. IRÍBAR and M. RAMÍREZ. *Aminopeptidasas: Study of their Regional Distribution in Rats*. Rev. esp. Fisiol., 48 (4), 265-270, 1992.

Soluble and membrane-bound aminopeptidase activities in eleven regions of the rat brain were assayed using L-leucine-2-naphthylamide as a substrate. In addition, two metabolic enzymatic activities were compared: lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase. All enzymatic activities showed significant regional differences when the data were analyzed statistically. Soluble aminopeptidase and aspartate aminotransferase activities were significantly lower in cortical than in subcortical areas. Membrane-bound aminopeptidase activity levels were higher in cortical areas. Lactate dehydrogenase activities did not differ between cortical areas and the rest of the zones studied. However, while no wide regional differences were found for the other enzymatic activities, membrane-bound aminopeptidase varied markedly across brain regions: a 5-fold difference was observed between zones. The differential distribution of this enzymatic activity is consistent with the hypothesis that it is responsible for the enzymatic inactivation of some neuroactive peptides.

Key words: Aminopeptidase, Rat, Brain.

Los péptidos cerebrales involucrados en la transmisión sináptica parecen ser enzimáticamente inactivados tras su liberación. Durante los últimos años, gran número de publicaciones han tratado de la identificación, localización e inhibición de las peptidasas responsables de tal inacti-

vación (7, 15). Las aminopeptidasas (APs; EC 3.4.11) podrían regular la actividad de estos neuropéptidos y han sido implicadas en el metabolismo de algunas de estas sustancias (14).

Una estrategia muy utilizada para localizar y aislar aminopeptidasas es el uso de sustratos artificiales, como las L-aminoácil-2-naftilamidas, que liberan productos fácilmente detectables tras su hidrólisis.

* A quien debe dirigirse toda la correspondencia. (Teléf.: 958-24 35 23; Fax: 958-24 35 18).

sis. Un sustrato comúnmente utilizado es la L-leucil-2-naftilamida (Leu-2-NA) (4, 12).

Un modo de dilucidar el papel funcional de la actividad de APs en el SNC puede llevarse a cabo estudiando la distribución de estas sustancias en distintas regiones cerebrales. Sin embargo, aunque se conoce desde hace tiempo la presencia de estas enzimas en el cerebro, los escasos estudios bioquímicos publicados hasta la fecha sobre su distribución regional, ofrecen resultados contradictorios: mientras MALFROY *et al.* (11) y SULLIVAN *et al.* (17) han encontrado una distribución homogénea entre regiones cerebrales de aminopeptidasas unidas a membrana, HERSH (6), ha observado que las purificadas por él, denominadas MI y MII, están desigualmente distribuidas en el cerebro de rata.

Nosotros hemos estudiado la distribución regional de aminopeptidasas solubles (APS) y unidas a membrana (APM) en el cerebro de rata, y las hemos comparado con la de dos enzimas del metabolismo energético: lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27; LDH) y aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1; AAT) medidas simultáneamente en las mismas localizaciones.

Material y Métodos

Se utilizaron ratas Wistar, machos (peso medio: 250 g), que fueron anestesiadas con equitensin (3 mg/kg de peso) y sus cerebros perfundidos con solución salina tamponada a través del ventrículo izquierdo. Los cerebros, incluyendo la médula espinal cervical, fueron rápidamente disecados, enfriados en nieve carbónica, y seccionados en rodajas de 1 mm de espesor. Se seleccionaron muestras de corteza frontal, corteza parieto-temporal, corteza occipital, caudado-putamen, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, puente, cerebelo, hipocampo y médula espinal cervical. Las muestras, (de peso medio de 20 mg), fueron homogeneizadas en 10 volúmenes de

tampón Tris-ClH (pH 7,4) y se centrifugaron (100.000 g) durante 35 min a 4 °C. Los sobrenadantes se usaron como fuente de fracción soluble para medir las actividades enzimáticas (APS, LDH y AAT) y proteínas.

Para obtener la fracción unida a membranas, el precipitado fue rehomogeneizado en el mismo volumen de tampón Tris-ClH, al cual previamente se había añadido Tritón X-100 (Sigma) a una concentración final del 1 % (v/v). Tras una nueva ultracentrifugación en las mismas condiciones, se utilizó el sobrenadante para la determinación de APM y proteínas unidas a membrana.

La actividad aminopeptidásica se determinó fluorimétricamente, por triplicado, utilizando Leu-2-NA (Sigma) como sustrato, según el método de GREENBERG (4) modificado como sigue: se incubaron 10 µl de la muestra durante 30 min con 1 ml de solución de sustrato (1 mg/100 ml de Leu-2-NA, 10 mg/100 ml de albúmina bovina, 10 mg/100 ml de DTT (Sigma), en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4) a 25 °C. La reacción enzimática fue detenida mediante la adición de 1 ml de tampón acetato 0,1 M (pH 4,2). La intensidad de fluorescencia de la 2-naftilamina liberada se midió a 345 nm de excitación y 412 nm de emisión. Los resultados se expresan como nmoles de 2-naftilamina liberada por minuto por miligramo de proteínas (nmol/min/mg). Las actividades de LDH y AAT se determinaron espectrofotométricamente, por triplicado (1, 8). Los resultados se expresaron como miliunidades de actividad enzimática por mg de proteínas (mU/mg). La concentración de proteínas se determinó por triplicado (2), utilizando albúmina bovina como estándar.

Para la detección de diferencias significativas entre zonas cerebrales se llevó a cabo el análisis de la varianza de una vía. Las diferencias entre las actividades enzimáticas corticales y subcorticales, consideradas en su conjunto, se determinaron mediante el test de la «t» de Student.

Tabla I. Niveles de actividad de aminopeptidasas solubles (APS) y unidas a membrana (APM), de lactato deshidrogenasa (LDH) y de aspartato aminotransferasa (AAT) en regiones de cerebro de rata.

Cada valor representa la media $\pm$ EEM de 18-20 experimentos.

Zona	APS (nmol/min/mg)	APM (nmol/min/mg)	LDH (mU/mg)	AAT (mU/mg)
Corteza frontal	21,1 $\pm$ 1,2	0,76 $\pm$ 0,06	3,20 $\pm$ 0,23	0,84 $\pm$ 0,03
Corteza parietotemporal	21,8 $\pm$ 0,9	0,90 $\pm$ 0,07	3,29 $\pm$ 0,19	1,06 $\pm$ 0,03
Corteza occipital	23,6 $\pm$ 1,1	0,77 $\pm$ 0,12	3,27 $\pm$ 0,25	0,89 $\pm$ 0,03
Caudado-putamen	25,1 $\pm$ 0,4	0,65 $\pm$ 0,06	3,19 $\pm$ 0,17	1,09 $\pm$ 0,03
Tálamo	24,3 $\pm$ 1,1	0,51 $\pm$ 0,05	3,65 $\pm$ 0,24	1,16 $\pm$ 0,03
Hipotálamo	23,6 $\pm$ 1,4	0,24 $\pm$ 0,06	2,65 $\pm$ 0,21	0,93 $\pm$ 0,05
Mesencéfalo	25,1 $\pm$ 1,3	0,43 $\pm$ 0,09	3,25 $\pm$ 0,25	1,20 $\pm$ 0,04
Bulbo	24,0 $\pm$ 1,6	0,17 $\pm$ 0,04	3,91 $\pm$ 0,35	1,21 $\pm$ 0,03
Cerebelo	24,0 $\pm$ 1,3	0,69 $\pm$ 0,08	4,19 $\pm$ 0,29	1,29 $\pm$ 0,04
Hipocampo	26,5 $\pm$ 1,5	0,73 $\pm$ 0,09	3,03 $\pm$ 0,21	0,83 $\pm$ 0,03
Médula cervical	21,2 $\pm$ 0,9	0,47 $\pm$ 0,14	3,11 $\pm$ 0,18	0,91 $\pm$ 0,02

Resultados

Las actividades específicas de APS, APM, LDH y AAT en las once zonas cerebrales estudiadas, se muestran en la tabla I. El análisis de la varianza indica que existen diferencias significativas entre regiones para todas las actividades enzimáticas estudiadas.

La actividad de APS muestra sus más altos niveles en el hipocampo y los más bajos en la corteza frontal, aunque la variabilidad entre las dos regiones es sólo del 25 %. El análisis de la varianza detecta di-

ferencias significativas entre zonas, siendo las regiones corticales las que muestran una actividad de APS significativamente menor que las subcorticales (fig. 1, APS).

La máxima actividad de LDH se encuentra en el cerebelo y la mínima en el hipotálamo (58 % de variación), no detectándose diferencias significativas entre los niveles corticales y subcorticales. Para la actividad de AAT se encuentra una variación del 55 % entre el cerebelo y el hipocampo, regiones de menor y mayor actividad, respectivamente. Además, las áreas corticales poseen una actividad de

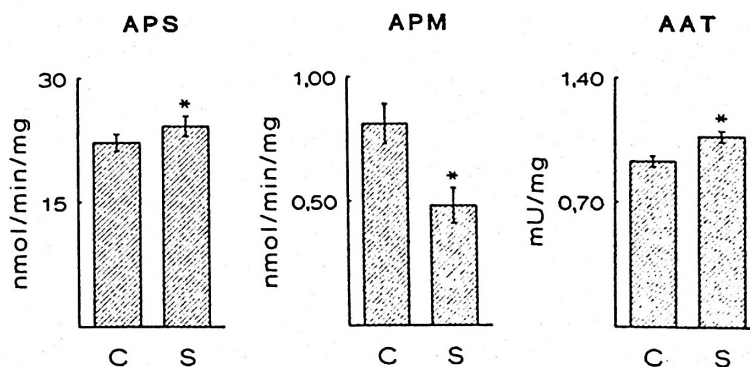


Fig. 1. Comparación entre los niveles corticales (C) y subcorticales (S) de las actividades de aminopeptidasas solubles (APS), unidas a membrana (APM) y aspartato aminotransferasa (AAT).

* $p < 0,05$.

AAT significativamente menor que las subcorticales (fig. 1 AAT).

La distribución regional de APM varía ampliamente entre las regiones cerebrales. La actividad en la corteza parietotemporal (zona de mayor actividad) es aproximadamente 5,3 veces mayor que la del puente (zona de menor actividad). Además, los niveles corticales de APM son significativamente mayores que los niveles subcorticales (fig. 1 APM).

Discusión

Los presentes resultados muestran que en el cerebro de rata adulta existen diferencias regionales para los niveles de LDH, AAT, APS y APM. La desigual distribución de LDH y AAT en cerebro ha sido previamente descrita (3, 9, 10, 18) y los resultados pueden considerarse similares a los nuestros en el sentido de que no se observaron grandes variaciones de actividad entre las distintas regiones cerebrales.

Sin embargo, existen pocos estudios bioquímicos donde se realice un análisis de las diferencias regionales de APs en el SNC que afecte a un número amplio de regiones. Sólo SHAW y COOK (16), utilizando un método histoquímico, analizaron las diferencias en intensidad de tinción de APs en numerosas regiones del cerebro de ratón. Sus resultados son similares a los encontrados por nosotros en cerebro de rata para la actividad de APS, detectando la más alta actividad en el hipocampo y la más baja en la corteza. Por otro lado, nuestra distribución de APM no es estrictamente paralela a la de la aminopeptidasa M II solubilizada por HERSH (6) a partir de membranas de cerebro de rata, existiendo discrepancias en los niveles encontrados en hipotálamo e hipocampo. Sin embargo, como en nuestros resultados, este autor encontró mayor actividad de M II en el estriado y corteza que en el tallo cerebral, aunque sólo examinó esta actividad enzimática en seis regiones.

Nuestros hallazgos difieren de los de Malfroy *et al.* (11) y Sullivan *et al.* (17), quienes encontraron una distribución regional homogénea de APM entre distintas regiones cerebrales de rata y ratón, respectivamente. La principal diferencia en la metodología empleada estriba en que estos autores midieron la actividad de APs utilizando encefalina como sustrato, mientras en nuestro trabajo, como en los de Hersh (6), se utilizan sustratos sintéticos derivados de la 2-naftilamida.

Aunque la distribución regional de APS en nuestros experimentos no sea homogénea, y puedan demostrarse diferencias estadísticamente significativas entre las regiones cerebrales, la proporción entre la zona de más baja actividad y la de más alta actividad en cerebro (0,79) es similar a la proporción observada para LDH (0,63) y para AAT (0,69), dos enzimas del metabolismo energético ampliamente distribuidas por todos los tejidos. Sin embargo, esta proporción es 0,18 para APM, sugiriendo que esta actividad enzimática se distribuye de una manera muy heterogénea entre las distintas regiones cerebrales. Tal desigual distribución implicaría que: 1) el enzima está localizado en las membranas de poblaciones restringidas de neuronas; 2) la actividad de APM parece ser más específica que la de APS; y 3) las dos actividades aminopeptidásicas pueden tener diferentes funciones.

Las aminopeptidasas APM y APS difieren notablemente en su distribución regional cerebral encontrándose sus niveles corticales inversamente relacionados con los encontrados en las restantes regiones del cerebro. La forma soluble del enzima se encuentra distribuida por todo el cerebro con sólo pequeñas diferencias entre las distintas regiones examinadas. Sin embargo, la mayoría de los neuropéptidos se concentran sólo en unas pocas regiones cerebrales. Parece, pues, improbable, que el papel de APS sea preferentemente la inactivación de los péptidos neuroactivos, siendo más probable que sea la APM la

que forme parte del mecanismo de degradación de estas sustancias; su localización y su desigual distribución así lo sugieren.

En el cerebro de rata se han caracterizado al menos tres aminopeptidasas unidas a membrana. Mientras que la M I hidroliza sólo las naftilamidas de arginina y lisina, las M II y M exhiben amplia especificidad con respecto a distintas aminoácil-2-naftilamidas, incluyendo Leu-2-NA (5, 6). Puesto que la aminopeptidasa M comprende aproximadamente el 5 % de la actividad total de aminopeptidasas de membrana (5), la mayor parte de esta actividad medida con Leu-2-NA como sustrato correspondería a la aminopeptidasa M II caracterizada por HERSH (6). Nuestros resultados proporcionan apoyo adicional a la sugerencia de MARKS *et al.* (13) de que las aminopeptidasas unidas a membranas pudieran estar involucradas en la inactivación enzimática de algunos neuropéptidos.

Resumen

Se determinan las actividades de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en once regiones del cerebro de rata utilizando como sustrato la L-leucina-2-naftilamida. Dichas actividades se comparan con la distribución de dos enzimas del metabolismo energético general: lactato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa. Todas las actividades enzimáticas demuestran diferencias regionales significativas tras el análisis estadístico de los resultados. Cuando se compara los niveles de actividad enzimática entre zonas corticales y subcorticales, ambas tomadas en conjunto, las actividades de aminopeptidasas solubles y de aspartato aminotransferasa son significativamente menores en las áreas corticales que en las subcorticales; la actividad de aminopeptidasas unidas a membrana es superior en las áreas corticales y la actividad de lactato deshidrogenasa no difiere significativamente entre estas zonas. Además, mientras no existen grandes diferencias porcentuales para las otras actividades en-

zimáticas, la de aminopeptidasas unidas a membrana varía considerablemente entre regiones cerebrales: una diferencia superior al 500 % se observa entre zonas. La desigual distribución de esta actividad enzimática en el cerebro es consistente con la hipótesis de que pudiera ser responsable de la inactivación enzimática de algunos neuropéptidos.

Palabras clave: Aminopeptidasa, Cerebro, Rata.

Bibliografía

1. Bergmeyer, H. U. y Bernt, E.: *Methods of enzymatic analysis*. (Bergmeyer, H. U. ed.). Academic Press, Nueva York. 1974, Vol 2, pp. 574-582.
2. Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
3. Godfrey, D. A., Bowers, M., Johnson, B. A. y Ross, C. D.: *J. Neurochem.*, 42, 1450-1456, 1984.
4. Greenberg, L. J.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 9, 430-435, 1962.
5. Gros, C., Giros, B. y Schwartz, J. C.: *Biochemistry*, 24, 2179-2185, 1985.
6. Hersh, L. B.: *J. Neurochem.*, 44, 1427-1435, 1985.
7. Hui, K. S. y Lajtha, A.: En *Neuromethods*, (Buolton, A. A., Baker, G. B. and Yu, P. H. eds.), Humana Press, Clifton, N. J., 1985, Vol. 5 pp. 421-450.
8. Karmen, A.: *J. Clin. Invest.*, 34, 131-133, 1955.
9. Kihara, M. y Kubo, T.: *J. Neurochem.*, 52, 1127-1134, 1989.
10. Leong, S. F., Lai, C. K., Lim, L. y Clark, J. B.: *J. Neurochem.*, 37, 1548-1556, 1981.
11. Malfroy, B., Swerts, J. P., Llorens, C. y Schwartz, J. C.: *Neurosci. Lett.*, 11, 329-334, 1979.
12. Marks, N.: En *Peptides in Neurobiology*. (Gainer, H. ed.), Plenum Press, Nueva York, 1977, pp. 221-250.
13. Marks, N., Datta, R. K. y Lajtha, A.: En *Macromolecules and the function of the neurone*. (Lodin, Z. ed.), Excerpta Medica, Amsterdam, 1968, pp. 220-231.
14. McDonald, J. K. y Barret, A. J.: *Mammalian proteases: A glossary and bibliography*. Vol. 2. Academic Press. Londres. 1986.

15. Pope, A. y Nixon, R. A.: *Neurochem. Res.*, 9, 291-323, 1984.
16. Shaw, S. G. y Cook, W. F.: *Histochemistry*, 63, 145-154, 1979.
17. Sullivan, S., Akel, H. y Barchas, J. D.: *Commun. Psychopharmacol.*, 2, 525-531, 1978.
18. Zivkovic, R. V. y Djuricic, B. M.: *Experientia*, 31, 1258-1260, 1975.