

## Envejecimiento y actividad aminopeptidásica cerebral

J. M. Gandarias\*, L. Casis, R. Múgica, G. Aréchaga y M. Ramírez

Departamento de Fisiología  
Facultad de Medicina  
Universidad del País Vasco  
48080 Bilbao (España)

(Recibido el 7 de junio de 1988)

J. M. GANDARIAS, L. CASIS, R. MUGICA, G. ARECHAGA and M. RAMIREZ. *Aging and Brain Aminopeptidase Activity*. Rev. esp. Fisiol., 45 (1), 89-94, 1989.

A comparative study of brain aminopeptidase activity between 18 month old male rats and young adults of 3 months has been carried out utilizing the arylamides Leu-, Arg-, Lys-, Tyr- and Asp- $\beta$ -naphthylamide as substrates. Statistical analysis of results showed no significant differences either in areas studied or for enzymatic activities detected when both ages were compared. Two different patterns of regional distribution of enzymatic activity were observed: One came to be as a result of the use of Lys-, Arg-, Leu- or Tyr- $\beta$ -naphthylamide and the other as a result of the use of Asp- $\beta$ -naphthylamide.

Key words: Aging, Aminopeptidase, Brain, Arylamide.

Existen en la literatura pocos trabajos referentes al estudio de los posibles cambios neuroquímicos que acontecen durante el proceso normal de envejecimiento cerebral (1), habiéndose decantado la investigación fundamentalmente hacia el estudio de las modificaciones existentes en determinadas enfermedades íntimamente relacionadas con la edad avanzada. Sobre todo ha sido la enfermedad de Alzheimer la que más interés ha suscitado (3,23). Sin embargo, el establecimiento de posibles patrones bioquímicos de cambio que tengan lugar durante el proceso normal de envejecimiento cerebral, puede ser útil para abordar con éxito la investigación de

las causas de enfermedades supuestamente relacionadas con éste.

En los últimos años se está identificando un número cada vez mayor de péptidos cerebrales de los cuales la mayoría ya habían sido previamente caracterizados en tejidos no neurales, siendo en la actualidad numerosos los investigadores interesados en tales neuropéptidos dadas sus implicaciones en diversos procesos cerebrales.

Se ha propuesto como método para estudiar la funcionalidad de tales péptidos, el análisis del control de su inactivación a través de la acción de exopeptidasas las cuales, al igual que péptidos, hidrolizan sustratos cromogénicos del tipo de las aminocil- $\beta$ -naftilamidas (arilamidas), siendo ésta una de las técnicas más utili-

\* A quien debe dirigirse la correspondencia.

zadas para determinar la actividad de dichos enzimas (12, 16, 19, 22).

A pesar de la amplia literatura concerniente a este tema, no se encontró ningún estudio en torno al efecto del envejecimiento sobre dicha actividad enzimática, aunque sí existen algunos en los que se analiza su evolución durante el desarrollo pre y postnatal (7, 14, 17, 20).

Con objeto de analizar la actividad de aminopeptidasas (AP) cerebrales en edades avanzadas, su distribución regional y una posible modificación con la edad, se planteó un estudio comparativo en ratas viejas de 18 meses frente a la de ratas adultas de 3 meses. Se utilizó la capacidad hidrolítica de estos enzimas sobre los sustratos artificiales: Leu-, Arg-, Lys-, Tyr- y Asp- $\beta$ -naftilamida. Como índice de referencia a la cantidad de estos enzimas se determinó la concentración de proteínas en las muestras de las regiones cerebrales elegidas.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio (9) demostraron que la actividad de algunos de estos enzimas mantenía un nivel basal en las edades de 2 semanas, 3 meses y 6 meses por lo cual se seleccionó la edad de 3 meses como patrón adulto.

### Material y Métodos

Se emplearon ratas macho Sprague-Dawley cuyos pesos oscilaron entre 350-370 g (3 meses,  $n = 18$ ) y 750-900 g (18 meses,  $n = 18$ ). Tras anestesia i.p. con equithensin (0,2 ml/100 g), se les perfundió el cerebro por vía ventricular con solución salina. Posteriormente se extrajeron, e inmediatamente se introdujeron en cámara de congelación con el fin de realzar, una vez alcanzada la consistencia adecuada, la disección de las zonas cerebrales seleccionadas: corteza frontal, parietal y occipital y glándulas hipófisis y pineal.

Con el fin de obtener la fracción solu-

ble, las muestras de tejido, de un peso aproximado de 20 mg, se homogenizaron en 10 volúmenes de tris-ClH (10 mM, pH 7,4) y se ultracentrifugaron ( $100.000 \times g$ , 35 min, 4 °C). Del sobrenadante se recogieron las muestras necesarias para la determinación de proteínas y de la actividad enzimática según GREENBERG (11).

Este método se adaptó con las siguientes características específicas según el sustrato utilizado: Para la detección de la actividad resultante de la utilización de Leu-, Arg-, Lys- y Tyr- $\beta$ -naftilamida, se incubaron 10  $\mu$ l de sobrenadante en 1 ml de solución de sustrato que contenía 1 mg/100 ml de la naftilamida correspondiente, 10 mg/100 ml de albúmina bovina y 10 mg/100 ml de ditiotreitol en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4. Pasados 30 min, la reacción se detuvo por adición de 1 ml de tampón acetato 0,1 M, pH 4,2. La actividad resultante de la utilización de Asp- $\beta$ -naftilamida como sustrato se determinó incubando 10  $\mu$ l de muestra durante 18 h en 1 ml de solución integrada por 1 mg/100 ml de Asp- $\beta$ -naftilamida, 10 mg/100 ml de albúmina bovina y 10 mg/100 ml de  $Cl_2Mn$  en Tris ClH 50 mM, pH 7,4. Transcurrido el tiempo de incubación la reacción se detuvo igualmente por adición de 1 ml de tampón acetato 0,1 M, pH 4,2. En todos los casos, la  $\beta$ -naftilamina, liberada por hidrólisis, se determinó fluorimétricamente a 412 nm con una excitación de 345 nm de longitud de onda, frente a un blanco compuesto por 1 ml de la solución de sustrato correspondiente, más 1 ml de tampón acetato 0,1 M, pH 4,2, sin añadirle la muestra.

Los valores obtenidos se transformaron en picomoles de  $\beta$ -naftilamina liberada, por extrapolación a una recta obtenida tras la determinación fluorimétrica de concentraciones decrecientes de  $\beta$ -naftilamina en un medio de disolución igual al de la solución de sustrato (1 ml), más 1 ml de tampón acetato 0,1 M, pH 4,2. Los resultados se expresan como unidades de AP/mg de proteína (UAP/mg prot). Se define una

unidad de AP como la cantidad de enzima que hidroliza un pmol de sustrato por minuto (o por 18 h en el caso de la hidrólisis de Asp- $\beta$ -naftilamina). Las proteínas se midieron según el método descrito por BRADFORD (5).

El análisis estadístico de los resultados se realizó aplicando el test de la *t* de Student para muestras no apareadas y la comparación entre grupos, mediante el análisis de la varianza. Se consideran como significativos los valores de *p* iguales o inferiores a 0,05. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar.

### Resultados

La valoración estadística de los resultados demostró la no existencia de diferencias significativas, en ninguna de las zonas estudiadas y para ninguna de las actividades enzimáticas detectadas, al comparar las ratas de 3 meses con las de 18 meses de edad (fig. 1).

Se obtuvieron diferentes niveles de actividad según los sustratos utilizados. En orden decreciente de actividad fueron los siguientes: Lys-, Arg-, Leu-, Tyr- y Asp- $\beta$ -naftilamida.

La actividad obtenida mediante la utilización de los sustratos Lys-, Arg-, Leu- y Tyr- $\beta$ -naftilamida presentó un patrón similar de distribución regional. Es decir, no hubo diferencias significativas entre las zonas corticales entre sí, ni entre las glándulas hipófisis y pineal. Sin embargo, la corteza presentó significativamente ( $p < 0,005$ ) mayor actividad que las glándulas.

Con la utilización de Asp- $\beta$ -naftilamida como sustrato, el comportamiento regional enzimático varió notablemente en relación a los anteriores. Así, la actividad a nivel de la glándula hipófisis fue significativamente superior ( $p < 0,005$ ) a la corteza, cuyas zonas fueron similares entre sí. Además, al comparar las glándulas entre sí, la actividad fue significativamente su-

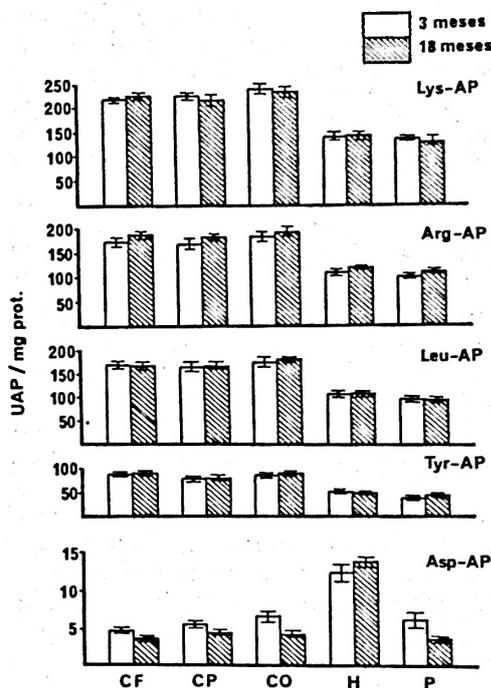


Fig. 1. Niveles de actividad de Lys-, Arg-, Leu-, Tyr- y Asp- aminopeptidasa (UAP/mg prot.) obtenidos a partir de la fracción soluble de la corteza frontal (CF), parietal (CP), occipital (CO), hipófisis (H) y pineal (P), a los 3 y 18 meses de edad. Cada barra representa la media de 18 valores. Las líneas verticales muestran el error estándar.

perior ( $p < 0,005$ ) en la hipófisis. Sin embargo, glándula pineal y corteza mostraron niveles similares de actividad.

El patrón regional de actividad, obtenido con cualquiera de los sustratos, no se modificó con la edad y las diferencias observadas a los 3 meses, se mantuvieron constantes a los 18 meses.

### Discusión

Los sustratos cromogénicos (arilamidas) se introdujeron por GOMORI (10) con el fin de detectar la clásica Leu-aminopeptidasa. Sin embargo, pronto se demostró

que la actividad resultante de la actuación sobre sustratos naturales o artificiales, se correspondía con enzimas de propiedades diferentes (19). Posteriormente se ha sugerido en diversos trabajos la posibilidad de que una misma actividad incluya la actuación de diversos isoenzimas (4,13). No obstante, la actividad aminopeptidásica detectada mediante la utilización de este método, es útil para valorar posibles modificaciones de estos enzimas ante determinados estados fisiológicos o situaciones experimentales (2, 21).

En relación a los cambios neuroquímicos más significativos que tienen lugar en el cerebro durante el envejecimiento normal, se han descrito reducciones de los enzimas implicados en la síntesis de dopamina y noradrenalina en humanos (18) y una disminución de la concentración de receptores hipofisarios para la LH-RH hipotalámica en rata (15) que podrían explicar la reducción en los niveles séricos de LH en la vejez. No obstante, la mayor parte de los estudios enzimáticos relacionados con el envejecimiento se han centrado en el análisis del comportamiento de la colín-acetil-transferasa y la acetil colinesterasa, enzimas implicados directamente en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, los resultados han sido contradictorios tanto en humanos como en animales de laboratorio (6).

La actividad aminopeptidásica a lo largo del desarrollo se ha investigado por diversos autores (7, 14, 17, 20) habiéndose demostrado diversos patrones de modificación desde el nacimiento hasta la edad adulta. Nuestros resultados muestran que el nivel de actividad aminopeptidásica que se alcanza en las ratas adultas de tres meses, se mantiene sin cambios a los seis y no se presentan posteriores modificaciones en ratas de 18 meses de edad.

El patrón regional de actividad detectable con la utilización de la Asp- $\beta$ -naftilamida, es sensiblemente diferente al resto (fig. 1). Con la utilización de Lys-, Arg-,

Leu- y Tyr- $\beta$ -naftilamida, los niveles corticales de actividad, sin diferencias entre sí, son superiores a los de las glándulas hipófisis y pineal, entre las cuales tampoco hay diferencias. Estos datos ya se habían constatado previamente en nuestro laboratorio con la utilización de Leu- y Arg- $\beta$ -naftilamida (8). Sin embargo, con la utilización de Asp- $\beta$  naftilamida se observa una mayor actividad a nivel de la hipófisis en relación a la actividad cortical y a la glándula pineal, presentando estas últimas estructuras unos niveles similares de actividad y además, en contraste con el resto de sustratos, las glándulas muestran una notable diferencia entre ambas.

Por otro lado, las diferencias que se observan a los 3 meses de edad entre hipófisis y el resto, cuando se utiliza Asp- $\beta$ -naftilamida como sustrato, tienden a hacerse más marcadas a los 18 meses ya que la actividad disminuye, aunque no de forma significativa, en corteza y glándula pineal y aumenta en hipófisis, circunstancia que no se da con el resto de los sustratos.

En el caso de existir modificaciones en la función de los neuropéptidos en las edades avanzadas, no parece que dependan de la actividad de las aminopeptidasas detectadas en el presente trabajo.

## Resumen

Se estudia comparativamente la actividad aminopeptidásica cerebral en ratas macho viejas de 18 meses frente a las de ratas adultas de 3 meses, utilizando las arilamidas Leu-, Arg-, Tyr-, Lys- y Asp- $\beta$ -naftilamida como sustratos. El análisis estadístico de los resultados no muestra diferencias significativas en ninguna de las zonas estudiadas ni para ninguna de las actividades enzimáticas detectadas, cuando se comparan ambas edades. Se observan dos modelos diferentes de distribución regional de la actividad enzimática: Uno de ellos resulta de utilizar Lys-, Arg-, Leu- o Tyr- $\beta$ -naftilamida y el otro, de hacerlo con Asp- $\beta$ -naftilamida.

Palabras clave: Envejecimiento, Aminopeptidasa, Cerebro, Arilamida.

## Bibliografía

1. Adams, I.: *Brain Res.*, 424, 343-351, 1987.
2. Alba, F., Ramírez M., Iribar, C., Cantalejo, E.S. y Osorio, C.: *Brain Res.*, 368, 158-160, 1986.
3. Berg, L.: *Arch. Neurol.*, 42, 737-739, 1985.
4. Berg, M. J. y Marks, N.: *J. Neurosci. Res.*, 11, 313-321, 1984.
5. Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
6. Decker, M. W.: *Brain Res. Rev.*, 12, 423-438, 1987.
7. Faivre-Bauman, A., Knisatschek, H., Tixier-Vidal, A., y Bauer, K.: *J. Neurosci. Res.*, 6, 63074, 1981.
8. Gandarias, J. M., Ramírez, M., Múgica, J., Múgica, R. y Casis, L.: *Ciencia Biol.*, 1989 (en prensa).
9. Gandarias, J.M., Ramírez, M., Zulaica, J., Iribar, C. y Casis, L.: *J. Biochem.*, 105, 44-46, 1989.
10. Gomori, G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 87, 559-561, 1954.
11. Greenberg, L. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 9, 430-435, 1962.
12. Hayashi, M.: *J. Biochem.*, 84, 1363-1372, 1978.
13. Iribar, C., Ramírez, M., Casis, L. y Alba, F.: *Neurosci. Lett.*, Supp. 18, S332, 1984.
14. Kato, T., Hama, T., Nagatsu, T., Kuzuya, H. y Sakakibara, S.: *Experientia*, 35, 1.329-1.330, 1979.
15. Limonta, P., Dondi, D., Maggi, R., Martini, L. y Piva, F.: *Life Sci.*, 42, 335-342, 1988.
16. Marks, N., Datta, R. K. y Lajtha, A.: *J. Biol. Chem.*, 243, 2.882-2.889, 1968.
17. Marks, N., Stern, F., y Lajtha, A.: *Brain Res.*, 86, 307-322, 1975.
18. McGeer, E. G. y McGeer, P. L.: En «Aging» (R.D. Terry and S. Gershon, eds.), Vol. 3, Raven Press, Nueva York, 1976, pp. 389-403.
19. Patterson, E. K., Hsiao, S. H. y Keppel, S. H.: *J. Biol. Chem.*, 238, 3.611-3.620, 1963.
20. Prasad, C., Mori, M., Pierson, W., Wilber, J. F. y Ewards, R. M.: *Neurochem. Res.*, 8, 389-399, 1983.
21. Ramírez, M., Casis, L., Zulaica, J., Múgica, J. y Gandarias, J. M.: *Neuroscience, Supp.* 22, S609, 1987.
22. Shaw, S. G. y Cook, W. F.: *Nature*, 274, 816-817, 1978.
23. Terry, R. D.: *Ann. Rev. Neurosci.*, 3, 17-95, 1980.

