

Efecto de la melatonina sobre la actividad L-leucinaminopeptidasa en hipotálamo y cortex cerebral de la rata normal y ovariectomizada

P. Montilla, M.^a C. Muñoz, J. Pinilla y J. A. Castro

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad de Córdoba
(España)

(Recibido el 5 de noviembre de 1981)

P. MONTILLA, M.^a C. MUÑOZ, J. PINILLA and J. A. CASTRO. *Effect of Melatonin on the L-Leucine Amino Peptidase Activity of the Hypothalamus and Brain Cortex on the Castrated and non Castrated Rats.* Rev. esp. Fisiol., 39, 145-148. 1983.

The effect of melatonin (500 µg/kg weight s.c. for 15 consecutive days) on the L-leucine amino peptidase (LAP) activity of the hypothalamus and brain cortex is studied on castrated and non castrated rats. There was a significant increase in the LAP activity of hypothalamus ($p < 0.001$ v.s. saline group) in the non castrated group, however, no changes were observed in the brain cortex.

In the ovariectomized group injected from the 15th to 30th after castration, a very big decrease was recorded in the LAP activity in both the hypothalamus and brain cortex which was not modified by melatonin. This data is studied in relationship to the antigonadotrophic effect of melatonin on the non castrated animals since the changes of this activity in the hypothalamus are inversely related to the gonadotrophin secretion, specially luteinizing hormone.

Es un hecho establecido que el hipotálamo de la rata posee enzimas peptidásicas con capacidad de inactivar a los péptidos hipotalámicos liberadores de hormonas hipofisarias (4, 9, 12). Este aspecto ha sido particularmente investigado en relación con las hormonas gonadotropas, FSH y LH, y esta última en mayor proporción (6, 7). Cambios en la actividad de estas enzimas han sido descritos en hipotálamo en relación con situaciones fisiológicas o experimentales que

implican modificación en la dinámica del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. Además, se ha encontrado una relación inversa entre el grado de actividad de las aminopeptidasas hipotalámicas y de producción y liberación de hormonas gonadotropas (1, 3, 5, 10).

Otro aspecto interesante es el efecto antigonadotropo de la melatonina, un hidroxindol de origen pineal, que ha sido descrito en varias especies animales (13, 18) bajo condiciones experimentales di-

versas (17, 19) y administrada tanto por vía sistémica (21) como inyectada en ventrículos cerebrales (8) o implantada en eminencia media (2).

El objeto de este trabajo es investigar la posible participación de la melatonina en la actividad L-aminopeptidasa (LAP) de hipotálamo y corteza cerebral en la rata intacta y en la ovariectomizada, con la finalidad de establecer la conexión entre los cambios de actividad enzimática en hipotálamo y corteza cerebral, y la acción antigonadotropa de melatonina, especialmente en el animal castrado, cuya acción es muy discutida (20, 30).

Material y métodos

Se han utilizado 52 ratas Wistar hembras de un peso medio de 250 g y cuatro meses de edad, expuestas a condiciones estandarizadas de temperatura (23° C), ritmo de luz: 14 h de luz/10 h de oscuridad, alimentación y agua *ad libitum*.

Los animales se distribuyeron del siguiente modo:

I) Intactos. II) Inyectados con solvente-vehículo (etanol absoluto/Ringer lactato: 3/97). III) Inyectadas s.c. con 500 µg/kg peso de melatonina en el vehículo mencionado durante 15 días seguidos. IV) Ovariectomizadas. V) Ovariectomiza-

das más vehículo. VI) Ovariectomizadas e inyectadas a los 15 días de la castración con 500 µg de melatonina en idénticas condiciones que para el grupo III.

Las ratas que constituyen este experimento fueron seleccionadas por frotis vaginal durante 12 días y tras mostrar ciclos regulares de 4 ó 5 días.

La medida de la actividad LAP, en hipotálamo y corteza cerebral, es expresada en µg de p-nitranilina (producto de la reacción) obtenidos por mg de proteína presente en el tejido a partir del sustrato de p-nitranilida (16). El contenido de proteínas tisulares se determinó según LOWRY *et al.* (11).

La preparación de los homogenados se efectuó de acuerdo al proceso descrito en anteriores publicaciones (14, 15). La melatonina en forma altamente purificada fue suministrada por Sigma.

Resultados

Actividad LAP en hipotálamo y corteza cerebral de rata intacta. La administración de melatonina (500 µg/kg peso) durante 15 días determinó un incremento altamente significativo ($p < 0,001$) de la actividad LAP hipotalámica, mientras que la de la corteza cerebral no se modificó (tabla I).

Tabla I. Efecto de la administración de melatonina durante 15 días consecutivos sobre la actividad L-leucinaminopeptidasa (LAP) en hipotálamo y en corteza cerebral de la rata normal y ovariectomizada.

Media \pm error estándar. Número de animales entre paréntesis.

Grupo experimental	Actividad LAP (µg de p-nitranilina/mg de proteína)	
	Hipotálamo	Corteza cerebral
Controles Intactos	13,61 \pm 0,72 (8)	9,70 \pm 0,46 (8)
Solvente-vehículo	12,43 \pm 0,80 (6) NS ^a	10,42 \pm 0,34 (6) NS ^a
Melatonina: 500 µg/kg peso	17,36 \pm 0,66 (9) $p < 0,001^a$	11,20 \pm 0,63 (9) NS ^a
Ovariectomizadas	8,72 \pm 0,50 (9) $p < 0,001^a$	5,77 \pm 0,28 (9) $p < 0,001^a$
Ovariectomizadas + vehículo	9,10 \pm 0,48 (8) $p < 0,001^a$ NS ^b	6,42 \pm 0,55 (8) $p < 0,001^a$
Ovariectomizadas + melatonina 500 µg/kg peso	10,06 \pm 0,82 (10) $p < 0,001$ NS ^b	6,58 \pm 0,43 (10) $p < 0,001^a$ NS ^b

a: Valor de p versus controles Intactos; b: valor de p versus ovariectomizadas; NS: no significativo.

Actividad LAP en hipotálamo y corteza cerebral de la rata ovariectomizada. La castración determinó un descenso altamente significativo de la actividad LAP, tanto en hipotálamo como en corteza cerebral ($p < 0,001$) respecto a los controles intactos e inyectados con el solvente vehículo. La administración de melatonina no modificó la actividad LAP (tabla I).

Discusión

Los cambios de actividad LAP registrados en hipotálamo después de la administración de melatonina en ratas no castradas sugiere que esta sustancia interviene de algún modo en la dinámica del enzima. No ha sido propósito de este trabajo determinar si se trata de un efecto directo o indirecto de la melatonina sobre la actividad del enzima. No obstante, el hecho de que la melatonina sea considerada como un factor con acción antigonadotropa y que los cambios de secreción de gonadotropinas se relacionen con los de la actividad de ciertas peptidasas inespecíficas entre ellas LAP, sugiere que este efecto se atribuya a la actividad antigonadotropa exhibida por la melatonina. El incremento de actividad LAP es coherente con los datos de otros autores en modelos en los que la producción de hormonas gonadotropas ha sido inhibida (1, 2, 5, 10, 14 y 15).

La actividad LAP en la corteza cerebral de animales intactos no es modificada por la melatonina, lo que indica que esta hidroxindolamina no interviene ni directa ni indirectamente en la cinética de LAP de la corteza del cerebro.

La ovariectomía desciende la actividad LAP en las dos zonas del cerebro estudiadas, siendo, especialmente los datos referidos a hipotálamo, coincidentes con los aportados anteriormente (5). La administración de melatonina en el animal ovariectomizado no modifica el descenso de actividad LAP producido por la cas-

tración, lo que sugiere que en esta situación es inefectiva sobre las hormonas gonadotropas. Es posible que el efecto antigonadotrofo de melatonina capaz de alterar la actividad de este enzima en el animal castrado sea distinto al mecanismo antigonadotrofo de los esteroides sexuales, los cuales revierten el descenso de actividad LAP producido por la castración (1, 5). Este nulo efecto pudiera relacionarse con el nulo efecto antigonadotrofo de este principio en el animal ovariectomizado. Se ha demostrado que la inyección subcutánea (23) y la implantación permanente de melatonina (20), por implante siláctico, no previene la normal elevación de FSH y LH tras la castración. La mínima variación de la actividad LAP en el hipotálamo de la rata ovariectomizada, tras la administración de melatonina, pudiera ser relacionada con el nulo efecto de esta amina en el animal castrado. Hecho que es coincidente con la baja actividad arilamidasa encontrada en hipotálamo por la hiperactividad del sistema hipotálamo-hipofisario en la producción de hormonas gonadotropas (1, 3, 10). También pudiera vincularse a otros condicionamientos, ya que el efecto antigonadotrofo producido por melatonina es dependiente del ritmo de iluminación, la vía y el momento adecuado de la inyección (18, 19, 22). Sin embargo, en los animales intactos sí se produce cambio en la actividad LAP, estando éstos sometidos a idénticas condiciones de experimentación en lo que se refiere a dosis, vía y momento de administración, por lo que la inefectividad no puede vincularse a estos hechos, sino sólo a la condición de castrados.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de la existencia de una relación inversa entre la actividad l-adinopeptidasa y la inhibición del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. El hecho de que la actividad enzimática en corteza cerebral no se modifique por la inyección de melatonina sugiere que esta indolamina no participa

en esta zona del sistema nervioso en la inactividad del factor liberador de gonadotropinas, LHRH, por las arilamidadas inespecíficas. En un sentido más directo, la baja actividad enzimática en hipotálamo registrada en el animal castrado, que no es modificada por la melatonina, hace pensar que ésta no participa en la inactivación de LHRH, cuyos niveles de producción se incrementan después de la castración, alcanzando las máximas cotas alrededor del 14 día de la intervención.

Resumen

Se estudia el efecto de la inyección de melatonina (500 µg peso s.c.) durante 15 días consecutivos sobre la actividad L-leucinaminopeptidasa (LAP) en hipotálamo y cortex cerebral de ratas intactas y ovariectomizadas.

La inyección de melatonina a intactas produce un incremento significativo de la actividad LAP en hipotálamo ($p < 0,001$), no siendo modificada en cortex cerebral.

En la rata castrada se produce un descenso significativo ($p < 0,001$) de la actividad LAP en hipotálamo y cortex cerebral, no siendo este efecto modificado por melatonina, lo que sugiere la ineficacia de la misma en el animal castrado.

Estos resultados son discutidos en relación con el efecto antigonadotropo en animales intactos y castrados.

Bibliografía

1. BICKEL, M.; KHUL, H., SIOE ENG TANG, J. y TAUBERG, H. D.: *Neuroendocrinology*, **9**, 321-331, 1972.
2. FRASCHINI, F., COLLU, R. y MARTINI, L.: En: «The pineal gland». (Wolstenholme, G. W. E. and Knight, eds.). Churchill-Livingstone. Edimburgo, 1971, pp. 265-279.
3. FIRTH, H. y HOOPER, K. C.: *Biochem. J.*, **108**, 510-511, 1968.
4. GRIFFITHS, E. C.: *Hormone Res.*, **7**, 179-191, 1976.
5. GRIFFITHS, E. C. y HOOPER, K. C.: *Acta Endocrin.*, **72**, 1-8, 1973.
6. GRIFFITHS, E. C., HOOPER, K. C. y HOPKINSON, C. R. N.: *Acta Endocrin.*, **79**, 7-15, 1975.
7. GRIFFITHS, E. C., HOOPER, K. C., JEFFCOATE, S. L. y HOLLAND, D. T.: *Acta Endocrin.*, **77**, 435-442, 1974.
8. KAMBERY, I. A., MICAL, R. S. y PORTER, J. S.: *Endocrinology*, **88**, 1288-1293, 1971.
9. KAMBERY, I. A. y VELLIS, J.: *60th Ann. Meeting Endocr. Soc. USA*, 1978, p. 172.
10. KHUL, M., ROSNIATOWSKIN, C., SIANG-AN-OEN y TAUBERT, H. D.: *Acta Endocrin.*, **76**, 1-14, 1974.
11. LOWRY, D., ROSEBROUGH, N., FARR, L. y RANDALL, R.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-271, 1951.
12. MARKS, N. y STERN, F.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **61**, 1458-1463, 1974.
13. MINNEMANN, K. P. y WURTMAN, R. J.: *Life Sci.*, **17**, 1189-1200, 1975.
14. MONTILLA, P., BELLIDO, M. C., DORADO, M. L. y MUÑOZ, M. C.: *Rev. Fac. Med. Sevilla*, **31**, 347-356, 1974.
15. MONTILLA, P., BELLIDO, M. C., DORADO, M. L. y MUÑOZ, R.: *Rev. esp. Fisiol.*, **35**, 1-4, 1979.
16. NAGEL, W., WILLIG, F. y SCHMIDT, F. H.: *Klin. Wschr.*, **42**, 447-449, 1964.
17. REITER, J. R., BLASK, K. D., JOHNSON, L. Y., RUDEEN, P. K., VAUGHAN, M. K. y WARING, P. J.: *Neuroendocrinology*, **22**, 107-116, 1976.
18. REITER, R. J., ROLLANG, M. D., PANKE, E. S. y BANKS, A. F.: *J. Neural Transmission. Suppl.* **13**, 209-223, 1978.
19. REITER, R. J., RUDEEN, P. K., SACKMAN, J. W., VAUGHAN, M. K., JOHNSON, L. Y. y LITTLE, J. C.: *Endocrin. Res. Comm.*, **4**, 35-44, 1977.
20. TALBOT, J. A. y REITER, R. J.: *Neuroendocrinology*, **13**, 164-168, 1973/74.
21. TAMARKIN, L., WESTROM, W. K., MAC MILL, A. C. y GOLDMAN, B. D.: *Endocrinology*, **99**, 1534-1545, 1976.
22. TRAKULRUNGSI, C., REITER, R. J., TRAKULRUNGSI, W. K., VAUGHAN, M. K. y WARING, P. J.: *Acta Endocrin.*, **91**, 59-69, 1979.
23. VAUGHAN, M. K., BLASK, D. E., JOHNSON, L. Y. y REITER, R. J.: *Endocrinology*, **104**, 212-217, 1979.