Influencia de la naloxona sobre la actividad L-aminopeptidasa hipotalámica de la rata normal y ovariectomizada

P. Montilla, M. R. Vígara, M. C. Muñoz, A. Varo y M. R. Clavero

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad de Córdoba
.14080 Córdoba (Spain)

(Recibido el 25 de junio de 1985)

P. MONTILLA, M. R. VIGARA, M. C. MUÑOZ, A. VARO and M. R. CLAVERO. *Influence of Naloxone on the Hypothalamic L-Aminopeptidase Activity in the Normal and Ovariectomized Rats*. Rev. esp. Fisiol., 42 (3), 285-288, 1986.

The effect of naloxone on the L-leucinaminopeptidase (LAP) activity has been determined in the hypothalamus of normal female rats or after different periods of time from ovariectomy (15th or 30th day). Castration at 15th and 30th days produced a not very important fall of LAP activity. The naloxone injections (2.5 or 5 mg/kg vía i.p.) determined a significant decrease in LAP activity in the intact and ovariectomized rats, greater for 5 mg/kg. A significant LAP activity decrease was found only after a 30 day postcastration period when naloxone treated intact animals were compared with the castrated rats. These data are discussed in relation to the physiological significance of brain peptidases and the pharmacological effect of naloxone on the function of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis.

Key words: Peptidases hypothalamus, Naloxone, Ovariectomy.

Es conocida la existencia, en hipotálamo e hipófisis, de peptidasas capaces de inactivar a los péptidos liberadores de hormonas hipofisarias (7, 17), siendo este hecho particularmente estudiado en relación con LHRH y TRH (10, 14, 15). En cuanto a LHRH son numerosas las investigaciones que indican cambio de la actividad peptidásica en hipotálamo e hipófisis en circunstancias fisiológicas o experimentales que implican incremento de la producción y secreción de FSH

y LH, especialmente de esta última, al tiempo que son coincidentes en señalar una relación inversa entre el grado de actividad de estas enzimas y el de liberación de estas hormonas gonadotropas (1, 8, 9, 18, 22).

También se conoce el efecto inhibitor de los opiáceos endógenos o exógenos y del estimulador de su antagonista naloxona, sobre la secreción de LH en el hombre y otras especies (3, 4, 5, 12), evaluados en distintas circunstancias como pu-

bertad, ovariectomía con o sin implante permanente de estrógenos (6).

En razón a lo expuesto, este trabajo tiene como principal objetivo explorar, dado el efecto de la naloxona sobre LH, si la actividad de una peptidasa en hipotálamo, L-leucinaminopeptidasa (LAP), se modifica por la presencia de este antagonista opiáceo, tanto en circunstancias normales como tras distintos períodos de ovariectomía, en la que se producen incrementos progresivos de la producción y secreción de LH.

Material y Métodos

Se han utilizado 120 ratas Wistar hembras, de un peso medio de 250 g y tres meses de edad, sometidas durante el curso del experimento a condiciones controladas de iluminación (14 h de luz/10 h de oscuridad), alimentación integral y agua *ad libitum*.

Las ratas fueron seleccionadas tras estudio por frotis vaginal y presentar ciclos regulares. La naloxona, en forma de clorhidrato (Abelló S. A.), se administró durante cinco días consecutivos a las dosis de 2,5 y 5 mg/kg peso vía i.p. Los animales ovariectomizados fueron inyectados en los períodos comprendidos entre los días 11 al 15 y 26 al 30, postovariectomía, según grupo (tabla I).

Una hora después de la última inyección de naloxona, los animales se sacrificaron por decapitación, siendo rápidamente extraído el cerebro y separado el hipotálamo, el cual, una vez pesado, se vertió en una solución de Ringer. Todo este proceso se efectuó en ambiente frío, a 4°C, y en un tiempo no superior a 90 segundos. Los hipotálamos se homogeneizaron y del sobrenadante se tomaron alícuotas en las que se determinó la actividad L-leucinaminopeptidasa (LAP) (18). Las proteínas tisulares se estimaron según método de LOWRY *et al.* (16).

Resultados

En la tabla I se exponen los cambios de actividad L-aminopeptidasa hipotalámica obtenidos en los distintos grupos como la cantidad de producto (p-nitranilina) formado a partir del sustrato (p-nitranilida), por mg de proteína tisular.

La ovariectomía produce un descenso débilmente significativo de actividad LAP, tanto a los 15 como a los 30 días. La naloxona, a las dosis de 2,5 y 5 mg/kg peso, disminuye la actividad LAP respecto a los controles.

En el animal ovariectomizado los cambios producidos en la actividad LAP, por la inyección de naloxona, son más notorios a los 15 días para la dosis de 5 mg que para la de 2,5, siendo los descensos del orden de $p < 0,005$ y $0,05$, respectivamente.

Después de los 30 días de la ovariectomía, se obtienen los mayores descensos con ambas dosis, arrojando datos de alta significación estadística. Comparando los cambios de actividad LAP hipotalámica tras naloxona, en ambos períodos tras ovariectomía, no se encontraron cambios a los 15 días de la misma respecto a los controles, pero sí a los 30 días de la castración, para ambas dosis.

Discusión

Los resultados obtenidos después de la ovariectomía, tanto a los 15 como a los 30 días, coinciden con los datos aportados por otros autores en estos modelos experimentales (8, 19), aunque los descensos de la actividad LAP registrados no muestran la significación indicada en estos estudios, evidencian el fenómeno indicado de la relación inversa entre el grado de actividad de las peptidasas hipotalámicas y el de funcionalidad del sistema LHRH-LH (1, 8, 9, 18, 22).

La administración de naloxona, tanto en la rata normal como en la ovariectomi-

Tabla I. Efecto de diversas dosis de naloxona sobre la actividad L-aminopeptidasa hipotalámica de la rata normal y ovariectomizada.
Media $\pm$ Error estándar. Número de animales por grupo, 10.

Grupo	LAP hipotalámica/ p-nitranilina/mg prot.	p
Intactos	25,66 $\pm$ 2,18	
CINa 0,9 %	26,31 $\pm$ 1,97	NS ^a
Naloxona 2,5 mg/kg	18,36 $\pm$ 1,58	0,01 ^b
Naloxona 5 mg/kg	14,85 $\pm$ 1,64	0,001 ^b
Ovariectomizadas 15 días	18,77 $\pm$ 1,58	0,05 ^a
CINa 0,9 %	20,31 $\pm$ 1,75	
Naloxona 2,5 mg/kg	14,85 $\pm$ 1,38	0,05 ^b NS ^c
Naloxona 5 mg/kg	13,46 $\pm$ 1,32	0,005 ^b NS ^c
Ovariectomizadas 30 días	19,45 $\pm$ 1,89	0,05 ^a
CINa 0,9 %	21,00 $\pm$ 1,85	
Naloxona 2,5 mg/kg	13,88 $\pm$ 1,05	0,005 ^b 0,05 ^c
Naloxona 5 mg/kg	9,28 $\pm$ 0,88	0,001 ^b 0,05 ^c

NS: No significativo.

a: Valor de p v.s. Intactos.

b: Valor de p v.s. CINa 0,9 % cada grupo.

c: Valor de p v.s. Naloxona Intactos misma dosis.

zada, produce descensos significativos de la actividad LAP hipotalámica, que dependen, en cada caso, de la dosis empleada y del tiempo de administración. El solo hecho de este cambio en la rata normal no permitiría deducir una relación entre los descensos de la actividad LAP y el grado de secreción de LH, aunque ha sido comprobado que la naloxona incrementa los niveles de LH, también modifica la secreción de otras hormonas hipofisarias, especialmente la ACTH, cuyos niveles periféricos se incrementan con dosis elevadas de este antagonista (11, 21), y es conocida la influencia que los cambios del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal mantienen con los sistemas peptidásicos del hipotálamo (2). Sin embargo, los descensos registrados en el animal castrado, en todo momento significativamente superiores a los obtenidos en los respectivos controles inyectados con naloxona, permiten relacionar estos cambios de activi-

dad enzimática con una situación funcional que implica una elevada producción y secreción de hormona luteinizante. Aunque en este estudio no han sido medidos, junto con los cambios de actividad LAP los correlativos niveles periféricos LH, existe evidencia de que dosis inferiores a las utilizadas y en menor tiempo de administración duplican la cantidad de LH periférica hacia el séptimo día de la castración (6).

Estos resultados sugieren, por una vía distinta, que la naloxona ejerce a nivel hipotalámico un importante papel en la dinámica metabólica de LHRH, si es asumida la relación de las peptidasas en la degradación de esta hormona, hecho corroborado, ya que la naloxona bloquea de un modo parcial el efecto *feed-back* negativo del estradiol sobre LH (20). Es importante considerar la capacidad de los esteroides sexuales de provenir el descenso de la actividad peptidásica en el animal

castrado (1, 8, 22). Es difícil establecer si estos cambios de actividad LAP son consecutivos a efectos directos de la naloxona o son consecuencia de su acción sobre la dinámica de LHRH, pero de cualquier modo, según estos resultados, es permisible sugerir la existencia de una relación.

Concluyendo, los resultados muestran que la naloxona disminuye la actividad LAP en la rata intacta y en la ovariectomizada, lo que viene a corroborar una vez más el criterio unánimemente aceptado de que la actividad peptidásica de hipotálamo guarda relación inversa con aquellas situaciones fisiológicas o experimentales que implican, caso de la naloxona (4), un incremento en la producción y secreción de LH.

Resumen

En hipotálamo de ratas normales y tras distintos períodos de ovariectomía (15 ó 30 días), se determina el efecto de la naloxona sobre la actividad Leucinaminopeptidasa (LAP). La ovariectomía produce, en ambos períodos, descensos poco importantes de la actividad LAP. La inyección de naloxona (2,5 ó 5 mg/kg peso v.i.p.), determina caídas altamente significativas de esta actividad tanto en las ratas intactas como en las castradas, mayores tras la dosis de 5 mg. Comparando los grupos intactos inyectados con naloxona con los ovariectomizados, sólo se registra diferencia significativa a los 30 días. Estos resultados se discuten en relación con el significado que las peptidasas y los opiáceos guardan con la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal.

Bibliografía

1. Bickel, Kuhl, H., Eng Tan, J. S. y Taubert, H. D.: *Neuroendocrinology*, **9**, 321-331, 1972.
2. Bruce, S. y Crertow, S.: *Endocr. Rev.*, **2**, 137-173, 1981.
3. Cicero, T. J.: *Fed. Proc.*, **39**, 2551-2554, 1980.
4. Delitala, G., Giusti, M., Mazzocchi, G., Granziera, L. y Tarditi, W.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **57**, 1277-1281, 1983.
5. Delitala, G., Grossman, A. y Besser, M.: *Neuroendocrinology*, **37**, 275-279, 1983.
6. Gabriel, S. M. y Simpkins, J. W.: *Neuroendocrinology*, **37**, 342-348, 1983.
7. Griffiths, E. C.: *Hormone Res.*, **7**, 179-191, 1976.
8. Griffiths, E. C. y Hooper, K. C.: *Acta Endocrinol.*, **72**, 1-8, 1973.
9. Griffiths, E. C. y Hooper, K. C.: *Acta Endocrinol.*, **77**, 10-18, 1974.
10. Griffiths, E. C. y Hopkinson, C. R. N.: *Hormone Res.*, **10**, 233-242, 1979.
11. Grossman, A., Gaillard, R. C., McCartney, P., Rees, L. H. y Besser, G. M.: *Clin. Endocrinology*, **17**, 279-286, 1982.
12. Ieri, T., Chem, H. T., Campbell, G. A. y Meites, J.: *Endocrinology*, **106**, 1568-1570, 1980.
13. Kalra, S. P. y Simpkins, J. W.: *Endocrinology*, **109**, 776-781, 1981.
14. Koch, Y., Baram, T., Chobieng, P. y Fridkin, M.: *Res. Comm.*, **61**, 95-103, 1974.
15. Kuhl, H., Rostniatowsky, C. y Taubert, H.: *Acta Endocrinol.*, **87**, 476-484, 1978.
16. Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, L. y Randall, R.: *J. Biol. Chem.*, **93**, 265-271, 1951.
17. Marks, N.: En «Neuroendocrinology». (Naftolin y Davies, eds.). Elsevier, Amsterdam, 1976, pp. 129-147.
18. Montilla, P., Bellido, M. C., Dorado, L. y Muñoz, R.: *Rev. esp. Fisiol.*, **35**, 1-4, 1979.
19. Montilla, P., Muñoz, M. C., Ortiz, A. y Piniella, J.: *Arch. Neurobiol.*, **47**, 29-36, 1984.
20. Van Vugt, D. A., Sylvester, P. W., Aylsworth, C. F. y Meites, J.: *Neuroendocrinology*, **34**, 274-278, 1982.
21. Volavka, J., Bauman, J., Pevnik, J., Reker, D., James, B. y Cho, D.: *Psychoneuroendocrinology*, **5**, 225-234, 1980.
22. Ween, R. U. y Kamberi, J. D.: *Hormone Res.*, **9**, 285-290, 1977.