UNIVERSIDAD DE JAÉN

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS DOCTORAL

ACTIVIDAD DE NEUROPEPTIDASAS EN REGIONES CORTICO-LÍMBICAS TRAS ESTRÉS AGUDO POR INMOVILIZACIÓN

PRESENTADA POR:
JOAQUÍN JESÚS HERNÁNDEZ MARÍN

DIRIGIDA POR:
DR. D. MANUEL RAMÍREZ SÁNCHEZ
DRA. DÑA. ISABEL PRIETO GÓMEZ
DRA. DÑA. ANA BELÉN SEGARRA ROBLES

JAÉN, 25 DE MAYO DE 2016

ISBN 978-84-16819-77-5

La presente tesis doctoral se realizó en los laboratorios del Área de Fisiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén dentro de de las líneas de investigación que lleva a cabo el Grupo P.A.I.: **CVI-221** "**Péptidos y Peptidasas**", actualmente **BIO-221** "**Neuroendocrinología y Nutrición**" y ha sido financiado en parte por el proyecto de la Junta de Andalucía: **P10-CVI6476**.

De los resultados de la presente tesis se han derivado hasta el momento las siguientes publicaciones:

Hernández J, Ramírez M, Segarra A, Banegas I, de Gasparo M, Alba F, Vives F, Duran R, Prieto I. Stress influences brain enkephalinase, oxytocinase and angiotensinase activities: a new hypothesis *Neuropsychobiology* 2009;59:184–189.

Hernández J, Prieto I, Segarra AB, de Gasparo M, Wangensteen R, Villarejo AB, Banegas I, Vives F, Cobo J, Ramírez-Sánchez M. Interaction of neuropeptidase activities in cortico-limbic regions after acute restraint stress. *Behav Brain Res*. 2015;287:42-48. doi: 10.1016/j.bbr.2015.03.036.

Ramírez M, Hernández J, Segarra AB, Banegas I, Alba F, Vives F, Prieto I. Effect of immobilization stress on enkephalinase activity in the rat central nervous system. Federación Europea de Neurociencias, FENS Forum 2008 Geneva. *FENS Abstr.,* vol 4, 186.36, 2008.

Joaquín Hernández, Ana B. Segarra, Isabel Prieto, Rosemary Wangensteen, Marc de Gasparo, Ana B. Villarejo, Inmaculada Banegas, Justo Cobo and Manuel Ramírez-Sánchez. Cortico-limbic neuropeptidases after acute restraint stress. 14th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins Vienna August 3–7, 2015. *Amino Acids* (2015) 47:1657 DOI 10.1007/s00726-015-2016-z

UNIVERSIDAD DE JAÉN
Departamento de Ciencias de la Salud
Área de Fisiología

D. **Manuel RAMÍREZ SÁNCHEZ**, Catedrático de Fisiología de la Universidad de Jaén, Dª. **Isabel PRIETO GÓMEZ**, Profesora Titular de Fisiología de la Universidad de Jaén y Dª **Ana Belén SEGARRA ROBLES**, Profesora Contratada de Fisiología de la Universidad de Jaén.

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **"Actividad de neuropeptidasas en regiones cortico-límbicas tras estrés agudo por inmovilización"**, que presenta D. **Joaquín Jesús Hernández Marín,** a superior juicio del tribunal que designe la Universidad de Jaén, reuniendo los requisitos exigidos en la normativa vigente, ha sido realizada bajo su dirección y asesoramiento, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que lo hacen acreedor del título de **Doctor**, siempre que así lo considere el citado tribunal.

Y para que así conste firmamos la presente en Jaén a 15 de abril de 2016.

Manuel Ramírez Sánchez

Isabel Prieto Gómez

Ana B. Segarra Robles

A mi hija Claudia Hernández, nieta de Cantabella

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. D. Manuel Ramírez, por el tiempo y esfuerzo que ha dedicado a mi formación científica, por examinar con su valioso criterio la presente Tesis, así como permitirme trabajar y aprender a su lado durante los últimos años, por su inestimable amistad y confianza que ha depositado en mí.

A la Dra. Isabel Prieto, por ofrecerme su juicioso criterio y revisar con todo detalle esta Tesis. Así como por su amistad.

A la Dra. Ana Belén Segarra por su excelente asistencia técnica, su constante apoyo y por la amistad que, en todo momento, me ha ofrecido.

A la escuela de Doctorado de la Universidad de Jaén por todas las facilidades que me han ofrecido en el desarrollo de esta Tesis.

A mis compañeros del colegio San Joaquín en especial a Antonio, Mª José, Javi, Lourdes, Vicente, Mª Cruz, Rosa, Gloria y Luis por aguantarme cada mañana, sobre todo durante este último año. También por la amistad que, en todo momento, me brindáis.

A todos mis amigos en especial a Francisco José Pérez, Ignacio Lillo y David Fuentes por ser como sois conmigo y entenderme en cada momento.

A mi amigo y Alcalde de Linares Juan Fernández Gutiérrez y Juan Sánchez porque con su cercanía y apoyo saben mantener elevada mi autoestima.

A la memoria del Dr. D. José González por ser artífice de lo que soy hoy, gracias a sus consejos y la confianza que tuvo en mi trabajo y persona.

A mis padres por su incondicional apoyo y estímulo, que tanto me ha ayudado en los momentos difíciles.

A mis hermanos Antonio y Francisco y a mi mujer Ana, por su ayuda, apoyo y paciencia, especialmente en estos últimos momentos.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN 15

INTRODUCCIÓN 19

Respuesta al estrés 21

Encefalinas y estrés 24

Oxitocina y estrés 24

Enzimas proteolíticos. Aminopeptidasas. Neuropeptidasas 25

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 29

MATERIALES Y MÉTODOS 33

RESULTADOS 43

DISCUSIÓN 51

CONCLUSIONES 61

BIBLIOGRAFÍA 65

PUBLICACIONES 75

RESUMEN

RESUMEN

Encefalinas y oxitocina cerebrales son agentes ansiolíticos implicados en los mecanismos de respuesta al estrés. Los enzimas que los metabolizan, tales como encefalinasas y oxitocinasa, también podrían estar implicados en esta respuesta. En la presente investigación hemos analizado el efecto de un modelo de estrés agudo por inmovilización sobre las actividades solubles y unidas a membrana de encefalinasas y oxitocinasa en la corteza prefrontal medial (mPFC), amígdala (AM) e hipocampo (HC), mediante el uso de alanina y leucina-beta naftilamida como sustratos, éste último en presencia y ausencia de L-metionina 20 mM. En comparación con los animales control, no se observaron cambios en las actividades enzimáticas estudiadas en la mPFC de los animales estresados. En contraste, la actividad encefalinasa disminuyó en la fracción soluble del HC pero aumentó en la unida a membrana. En la AM, las actividades de oxitocinasa soluble y de encefalinasa unida a membrana disminuyeron en los animales estresados. Estos resultados demuestran que el estrés agudo por inmovilización afecta de forma diferente a las actividades analizadas dependiendo de la fracción y de la región cerebral analizada. Una reducción en la actividad soluble de encefalinasa en el HC y de la actividad soluble de oxitocinasa, así como de la actividad unida a membrana de encefalinasa en la AM podría sugerir una mayor disponibilidad o un mayor tiempo de acción para las encefalinas y oxitocina en tales localizaciones. Esto podría sugerir una relativa importancia para estas actividades enzimáticas en las propiedades ansiolíticas propuestas para las encefalinas y oxitocina en HC y AM en condiciones de estrés. Esta interpretación no es aplicable para la actividad de encefalinasa unida a membrana en el HC. Sin embargo, la actividad hidrolítica de la alanina-beta-naftilamida no sólo determina actividad encefalinasa sino que

también refleja la hidrólisis de Ang II a Ang IV. Por lo tanto, nuestros resultados también pueden reflejar un aumento de Ang IV en HC y un descenso en la AM en condiciones de estrés agudo por inmovilización.

Puesto que las regiones cerebrales estudiadas constituyen un circuito funcional implicado en la respuesta al estrés, es necesario analizar el perfil regional de distribución de las actividades enzimáticas estudiadas así como el modelo de interacciones intra- e inter-regionales entre dichas actividades enzimáticas dentro de dicho circuito. En relación al estudio regional, mientras que la mayoría de las actividades enzimáticas estudiadas mostraban un marcado predominio de la AM en los animales control y en los sometidos a estrés, la actividad encefalinasa, determinada como alanina aminopeptidasa unida a membrana, mostró un cambio significativo tras el estrés, aumentando su actividad en el HC y disminuyéndola en la AM. Con respecto al análisis de correlaciones, en los animales control se observó básicamente una correlación positiva entre las actividades de la mPFC y las de la AM, sin una clara conexión entre las otras regiones. Sin embargo, tras el estrés se observó una marcada correlación entre mPFC e HC y entre AM e HC. Por lo tanto nuestros resultados sugieren un importante cambio funcional del circuito formado por mPFC, AM e HC en condiciones de estrés agudo por inmovilización.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Respuesta al estrés

Bajo unas condiciones de estrés, el organismo en su conjunto responde coordinadamente para mantener la *homeostasis* (la estabilidad del medio interno), con el fin de aumentar las posibilidades de supervivencia del individuo (Goldstein y Kopin, 2007). El término *alostasis* amplía este concepto implicando a mecanismos que consiguen la *homeostasis*, a través de ajustes anticipatorios que implican, entre otros, a diversas regiones cerebrales, al eje hipotálamo-hipófisis-adrenales y al sistema nervioso autónomo (Sterling, 2012), en respuesta a las condiciones de estrés. Sin embargo, la respuesta al estrés tanto a nivel central como periférico está aún lejos de ser totalmente comprendida.

Por tanto, ante un estímulo "amenazante" real o ficticio, se activan, coordinada y secuencialmente, múltiples sistemas encaminados a preparar al sujeto para enfrentarse a esa posible amenaza (revisado en Everly y Lating, 2013). En primer lugar, cuando el cerebro (áreas neocorticales y límbicas) interpreta que algo puede constituir una amenaza, activa de forma inmediata y coordinada al sistema nervioso simpático y parasimpático así como a la inervación de la musculatura estriada con el fin de provocar de forma inmediata en el organismo un estado de “alerta” (McCorry, 2007). Sin embargo, esto constituye una respuesta rápida que no se mantiene en el tiempo. Por lo tanto, con objeto de mantener altos niveles de alerta durante un período más prolongado, a continuación se activa el eje de respuesta neuroendocrino de “lucha ó huída” que implica directamente a la amígdala dorsomedial e hipotálamo como regiones centrales y a la médula adrenal como órgano periférico para

la masiva secreción de catecolaminas y opiáceos al torrente sanguíneo con objeto de llevar a cabo una activación adrenérgica generalizada del organismo junto con un determinado nivel de analgesia (Roldán y cols, 1974). El efecto es por tanto idéntico a la activación simpática inicial por inervación directa de los órganos, sólo que la liberación de catecolaminas adrenales se retrasa por unos segundos en relación a aquella. Finalmente, la respuesta al estrés se prolonga en el tiempo gracias a la activación de diversos ejes endocrinos que implican fundamentalmente a la corteza suprarrenal para la liberación de cortisol, a la glándula tiroides para un incremento en las hormonas tiroideas y a la neurohipófisis para la secreción de vasopresina y oxitocina, aunque también la liberación de hormona del crecimiento y prolactina ha sido relacionada con la respuesta al estrés psicosocial (Taylor y cols, 2006; Everly y Lating, 2013; Foley y Kirschbaum, 2010).

Aunque existe una respuesta inespecífica basal ante los múltiples tipos de estímulos amenazantes, hay importantes matices que diversifican la respuesta. Así, las diferentes amenazas pueden ser percibidas por diferentes vías sensoriales y alcanzar diferentes centros cerebrales encargados de elaborar la respuesta. Muy simplificadamente, podemos dividir los estímulos amenazantes o factores estresantes en aquellos estímulos físicos que requieren una respuesta rápida para evitar un peligro inmediato (quemaduras, heridas, hemorragia, hipoxia etc.) y que implican directamente al hipotálamo y otras zonas del tronco cerebral y aquellos estímulos amenazantes de carácter psíquico como miedo o ansiedad, que requieren un procesamiento emocional y cognitivo antes de emitir una respuesta y que implican centros superiores como la corteza prefrontal, la amígdala y/o el hipocampo. Tales áreas constituyen un circuito cortico-límbico particularmente susceptible a la influencia del

estrés modificando su interacción funcional y en consecuencia alterando las funciones en las que están implicadas dichas áreas cerebrales (Davidson y McEwen, 2012; Godsil y cols, 2013).

Algunos autores diferencian entre factores estresantes exclusivamente psíquicos y aquellos que incluyen componentes físicos y psíquicos como es el caso del estrés por inmovilización (Melo de Carvalho, 2014; McEwen, 2007; Ulrich-Lai y Herman, 2009).

Existen múltiples modelos animales que abordan las diferentes posibilidades de estrés. Uno de los más utilizados es el estrés por inmovilización. En éste modelo los animales se introducen en tubos cilíndricos adecuadamente ventilados y se les mantiene inmovilizados durante diferentes períodos de tiempo con objeto de inducir un estrés agudo o crónico. Este modelo produce un estrés físico y mental con una baja tasa de adaptación. Tras el período de estrés los animales muestran altos niveles de ansiedad (Toth y Neumann, 2013; Campos y cols, 2013).

Entre los factores implicados en la respuesta al estrés, las encefalinas y la oxitocina son neuropéptidos que juegan un papel esencial actuando como agentes ansiolíticos (Bilkei-Gorzo y cols, 2008; Narita y cols, 2006; Neumann y cols, 2000; Neumann, 2007), siendo parcialmente regulados por la acción de enzimas proteolíticos como encefalinasas y oxitocinasa (Nomura y cols. 2004; Solhonne y cols, 1987; Thompson y Hersh, 2004).

Sin embargo, la influencia del estrés sobre tales actividades enzimáticas en áreas cerebrales como es el caso de la corteza prefrontal, la amígdala y el hipocampo, implicadas en la respuesta al estrés, es escasamente conocida. Tales áreas constituyen, como

hemos indicado, un circuito cortico-límbico especialmente susceptible a la influencia del estrés, modificando su interacción funcional y en consecuencia alterando las funciones en las que están implicadas tales áreas cerebrales (Davidson y McEwen, 2012; Godsil y cols, 2013).

Encefalinas y estrés

Existe un consenso general sobre el papel de los péptidos opiáceos en la regulación de la respuesta al estrés, tanto a nivel conductual, autonómico y endocrino. Los opiáceos parece que disminuyen las respuestas neuroendocrina y autonómica inducidas por el estrés, inhibiendo la actividad simpática y facilitando la parasimpática. Los opiáceos amortiguan la sensación de angustia, el componente afectivo del dolor sin anular la sensación dolorosa. De hecho, el alto contenido de encefalinas en el sistema límbico sugiere un papel directo de estas en la respuesta al estrés. Las encefalinas intervendrían en la regulación "alostática" del estrés anticipándose a los factores estresantes, reduciendo de ésta forma su impacto (Drolet y cols, 2001;McCubbin, 1993).

Oxitocina y estrés

Actualmente el estudio de la oxitocina recibe un interés especial debido, entre otros, al papel positivo que se le ha asignado en el desarrollo de la conducta social y en la regulación del estrés, dado su efecto ansiolítico. Debido a ello hay un interés creciente para utilizar este péptido como agente terapéutico en diversas alteraciones psiquiátricas (Olff y cols, 2013).

Existen numerosos datos que relacionan la oxitocina con la regulación del estrés. Así, los niveles de oxitocina aumentan a nivel central y periférico en respuesta a diversas situaciones estresantes

incluyendo el estrés por inmovilización (Okimoto y cols, 2012; Neumann y Slattery, 2016). Se han observado altos niveles de oxitocina plasmática asociados a bajos niveles de noradrenalina, presión arterial y frecuencia cardíaca por lo que se ha sugerido que esta hormona amortiguaría las consecuencias de la respuesta al estrés (Light y cols, 2004). En ratas, la oxitocina atenúa la respuesta neuroendocrina al estrés del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, efecto en el que estarían implicadas diversas áreas cortico-límbicas como la corteza prefrontal, la amígdala y el hipocampo (Windle y cols, 2004). Además, la administración de oxitocina incrementa la actividad parasimpática (Norman y cols, 2011) y disminuye los niveles salivares de cortisol (Linnen y cols, 2012). Estos efectos podrían ser debidos a la influencia inhibidora de la oxitocina sobre la amígdala que a su vez inhibiría las áreas hipotalámicas responsables de la respuesta al estrés (Viviani y cols, 2011). Estas sugerencias están apoyadas en trabajos que demuestran que la administración intranasal de oxitocina disminuye la actividad en la amígdala (Domes y cols, 2007) y disminuye la conectividad entre amígdala y tronco cerebral (Kirsch y cols, 2005) pero la aumenta entre amígdala y corteza prefrontal (Sripada y cols, 2012).

Enzimas proteolíticos. Aminopeptidasas. Neuropeptidasas

Enzimas proteolíticos son aquellos capaces de hidrolizar enlaces peptídicos. De acuerdo con la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB: Internacional Union of Biochemistry and Molecular Biology; http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/), estos enzimas se incluyen dentro de la clase 3, debido a su actividad hidrolasa, específicamente a la subclase 3.4, que engloba a todas las hidrolasas de péptidos. A su vez, estos enzimas se dividen en exopeptidadas y endopeptidasas si respectivamente hidrolizan enlaces próximos (uno o dos aminoácidos) a los extremos de la

cadena peptídica o si actúan en el interior de la proteína, sobre enlaces distantes a los extremos de la cadena (McDonald y Barrett, 1986). Debido a la amplia especificidad de substrato de la mayoría de estos enzimas, más que a la acción de un enzima concreto, deberíamos referirnos a actividades enzimáticas debido a que un mismo enzima puede actuar sobre diferentes substratos.

Las exopeptidasas que requieren un grupo alfa-amino libre y liberan aminoácidos individualmente se denominan aminopeptidasas y son los enzimas proteolíticos más abundantes en el sistema nervioso (Checler, 1993). Las aminopeptidasas se localizan tanto en la fracción soluble como unida a membrada de los tejidos y ambas formas son capaces de hidrolizar los mismos substratos. Sin embargo, los procesos que regulan a cada una de esas formas son diferentes y consecuentemente, pueden ejercer diferentes funciones. La regulación de los enzimas unidos a membrana (de distribución cerebral heterogénea), fundamentalmente bajo control nuclear, se conecta de forma más directa con las funciones que ejercen sus substratos y están menos sujetas a variaciones en el entorno bioquímico del enzima, como lo están los enzimas localizados en la fracción soluble (con una distribución cerebral más homogénea). Por lo tanto, las actividades de aminopeptidasas plasmáticas, las localizadas en la fracción soluble de la célula o en el fluido intersticial, o las unidas a las membranas celulares están bajo la influencia de mecanismos de regulación diferentes dependiendo de su localización (Prieto y cols, 2015).

La regulación de la función de los neuropéptidos se lleva a cabo en parte por la acción de aminopeptidasas, solubles o unidas a membrana, denominadas genéricamente como *neuropeptidasas* que, como anteriormente indicamos, son los enzimas proteolíticos más

abundantes del sistema nervioso (Checler, 1993). Ciertamente, aunque la poca especificidad de sustrato es una limitación en los estudios que implican actividades enzimáticas, su análisis es una importante herramienta que nos refleja el estado funcional de sus substratos. El conocimiento del papel funcional de estos enzimas es esencial para conocer la función de los neuropéptidos y nos ofrece la posibilidad de controlar farmacológicamente los procesos en los que estos están implicados (Ramírez y cols, 2011).

El estudio de la actividad encefalinasa se puede llevar a cabo mediante el análisis de la actividad de alanina-aminopeptidasa tanto en la fracción unida a membrana (MB AlaAP) (aminopeptidasa M, EC 3.4.11.2) (Solhonne y cols, 1987), como en la fracción soluble (Sol AlaAP) (aminopeptidasa sensible a la puromicina, EC 3.4.11.14). Este enzima es especialmente abundante en el cerebro y se ha considerado como la principal actividad degradativa de las encefalinas (Thompson y Hersh, 2004). La actividad de aminopeptidasa M, además de encefalinasa, también refleja actividad angiotensinasa, responsable de la hidrólisis de la Ang III (Wright y cols, 1991). La actividad de leucina aminopeptidasa (LeuAP, EC 3.4.11.1), tanto soluble como unida a membrana, se ha descrito como responsable de la hidrólisis de encefalinas, substancia P o angiotensina II (revisado por Hernández y cols, 2009).

Con respecto a la oxitocinasa, se han descrito varias formas de este enzima. En primer lugar se le denominó cistina aminopeptidasa (CysAP) porque en su determinación se utilizó la Cistina-β-naftilamida como sustrato (Tuppy y Nesbadva, 1957). Posteriormente, Tsujimoto y cols. (1992), purificaron la leucina aminopeptidasa de placenta (EC 3.4.11.3, P-LeuAP) que hidrolizaba a la oxitocina, vasopresina y angiotensina III y llegaron a la conclusión de que CysAP y P-LeuAP

eran el mismo enzima. La oxitocinasa existe en forma soluble y unida a membrana (Iwase y cols, 2001) y se ha identificado en el cerebro donde sólo se ha descrito en forma unida a membrana (Matsumoto y cols, 2001). Sin embargo, los resultados descritos en la presente tesis sugieren que la forma soluble del enzima también se encuentra presente en el cerebro. Por otro lado, La aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP) demostró ser idéntica a la oxitocinasa (Keller y cols, 2003). La IRAP inicialmente se observó en vesículas de adipocitos y miocitos que también contienen el transportador de glucosa GLUT4, sensible a la insulina. Cuando las células son estimuladas por la insulina, tanto la IRAP como el GLUT4 se transfieren de las vesículas a la membrana plasmática de la célula, induciendo una mayor captación de glucosa (Wallis y cols, 2007). Además, este enzima ha demostrado ser idéntico al receptor de angiotensina IV AT_4, relacionado con procesos de aprendizaje y memoria y en la regulación local de flujo sanguíneo (Albiston y cols, 2003).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las encefalinas y oxitocina cerebrales son neuropéptidos con funciones ansiolíticas implicados en los mecanismos de respuesta al estrés. Las encefalinasas y la oxitocinasa son enzimas relacionados con su metabolismo y podrían participar en ésta respuesta de una forma diferencial, dependiendo de su localización cerebral (Nomura y cols, 2004; Solhonne y cols, 1987; Thompson y Hersh, 2004). Del mismo modo, la respuesta de tales enzimas reguladores ante una situación de estrés puede estar coordinada entre diversas regiones cerebrales implicadas en la respuesta al estrés como la corteza prefrontal medial, la amígdala y el hipocampo (Davidson y McEwen, 2012; Godsil y cols, 2013). Con objeto de analizar el comportamiento de tales enzimas ante una situación de estrés nos proponemos:

1. Analizar el efecto de un modelo de estrés agudo por inmovilización sobre los niveles de actividad encefalinasa y oxitocinasa en la corteza prefrontal medial, amígdala e hipocampo, consideradas individualmente.

2. Analizar el perfil de distribución regional de tales actividades así como su modelo intra e inter-regional de correlaciones dentro del circuito funcional que forman la corteza prefrontal medial, amígdala e hipocampo tras estrés agudo por inmovilización.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

En la presente investigación se utilizaron diez ratas macho adultas, raza Wistar, con un peso comprendido entre 200 y 250 g, con una edad de 3 meses. Hasta el momento de los experimentos, los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (25ºC), con un ciclo regular de luz/obscuridad de 12/12 h (luz de 7:00 a 19:00 h; oscuridad de 19:00 a 7:00 h) y con acceso a comida y agua *ad libitum*. Para el grupo control, cinco de los animales se mantuvieron en sus jaulas originales y los otros cinco (seleccionados al azar), a los que se consideró como grupo de animales estresados, se introdujeron en cilindros plásticos (longitud: 21 cm; diámetro: 6 cm), los terminales de los cilindros, adecuadamente ventilados, se cerraron y se mantuvieron así durante una hora. Con éste método desarrollamos un modelo de estrés agudo por inmovilización (De Oliveira y cols, 2004). Los animales se sacrificaron inmediatamente después de terminar el período de inmovilización. La obtención de las muestras de tejido y su procesamiento para determinar en ellas las diversas actividades enzimáticas así como el contenido de proteínas se describe detalladamente en Ramírez y cols (2011).

Estudios previos demostraron que los niveles de las actividades neuropeptidásicas se afectan por diversos factores endógenos y exógenos como es el caso de las condiciones ambientales de luz y oscuridad (revisado por Ramírez y cols, 2004). Por lo tanto, los experimentos se llevaron a cabo durante los meses de verano y los animales fueron sacrificados bajo anestesia con equitensin (2 ml/kg de peso corporal) (para 100 ml, el equitensin contiene 4.5 g de hidrato de cloral disueltos en 9.88 ml de etanol a lo que se añaden

0.972 g de Nembutal disueltos en 16.2 ml de agua destilada, a lo que, tras disolverse adecuadamente, se le añaden 39.6 ml de propilenglicol y 2.126 g de sulfato de magnesio, se disuelve y enrasa a 100 ml con agua destilada) y sus cerebros perfundidos con suero salino y extraídos en condiciones de luz y durante un período fijo (entre las 9:00 de la mañana y las 12:00 del medio día). Los cerebros se perfundieron a través del ventrículo izquierdo pinzando la aorta abdominal y dejando como vía de salida del suero la aurícula derecha. Tras ello, los cerebros se extrajeron rápidamente (menos de 1 min.) y se enfriaron en hielo seco.

Para obtener las muestras de tejido cerebral seleccionadas (corteza prefrontal medial, amígdala e hipocampo), los cerebros fueron individualmente descongelados hasta que alcanzaran una adecuada consistencia que permitiera llevar a cabo a mano secciones coronales del cerebro con una cuchilla sin que éste se deformara. Las áreas cerebrales elegidas se identificaron en los cortes y sus coordenadas comprobadas en el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1998). La corteza prefrontal medial (mPFC) se obtuvo entre los planos coronales correspondientes a 12.7 y 11.2 mm anteriores a la línea interauricular (**figura 1**) y el hipocampo (HC) y la amígdala (AM) se obtuvieron entre los planos coronales correspondientes a 7.12 y 5.4 mm anteriores a la línea interauricular (**figura 2**).

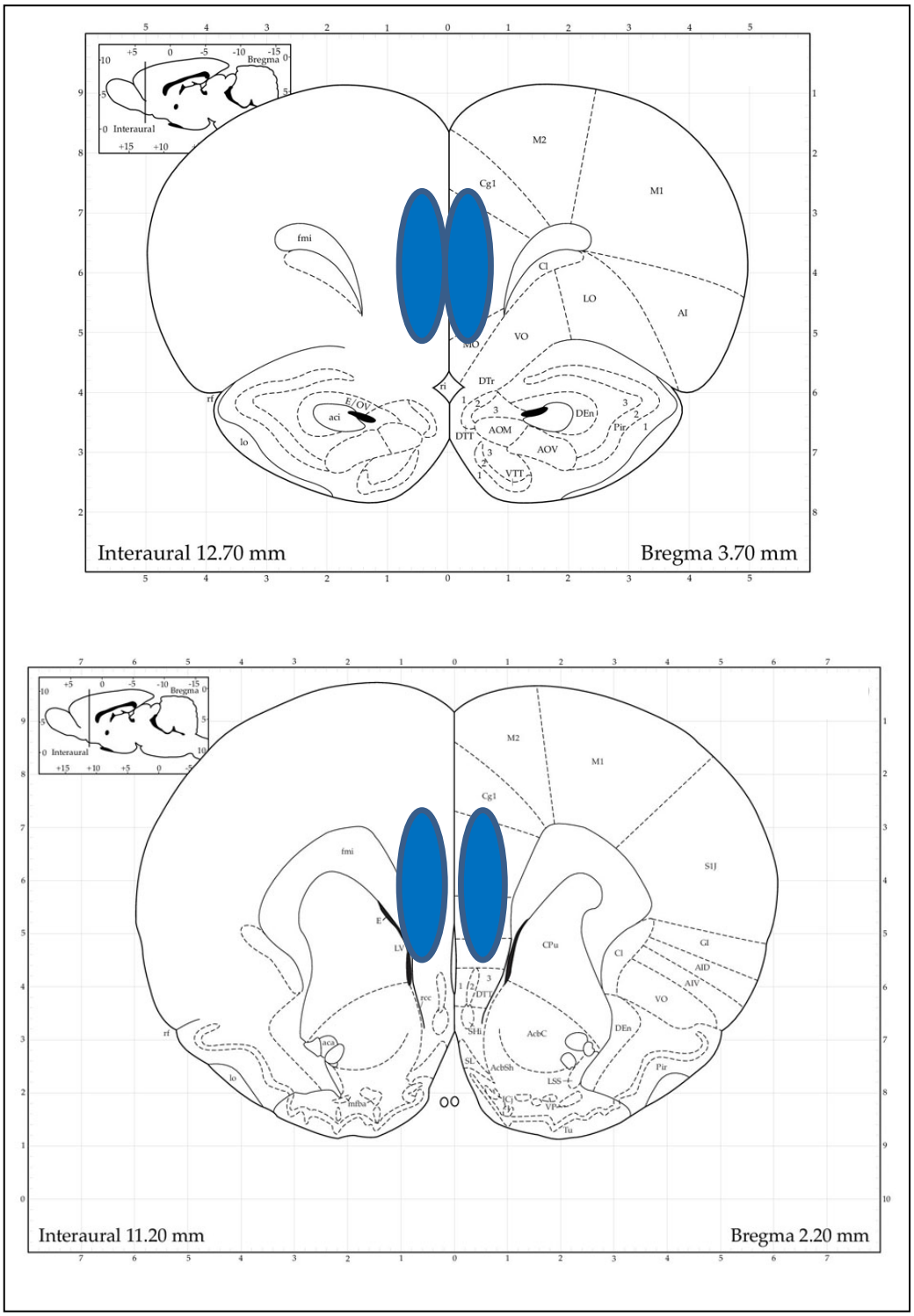

Figura 1. Planos coronales anterior y posterior entre los que se obtuvieron las muestras de mPFC (tomado de Paxinos y Watson, 1998).

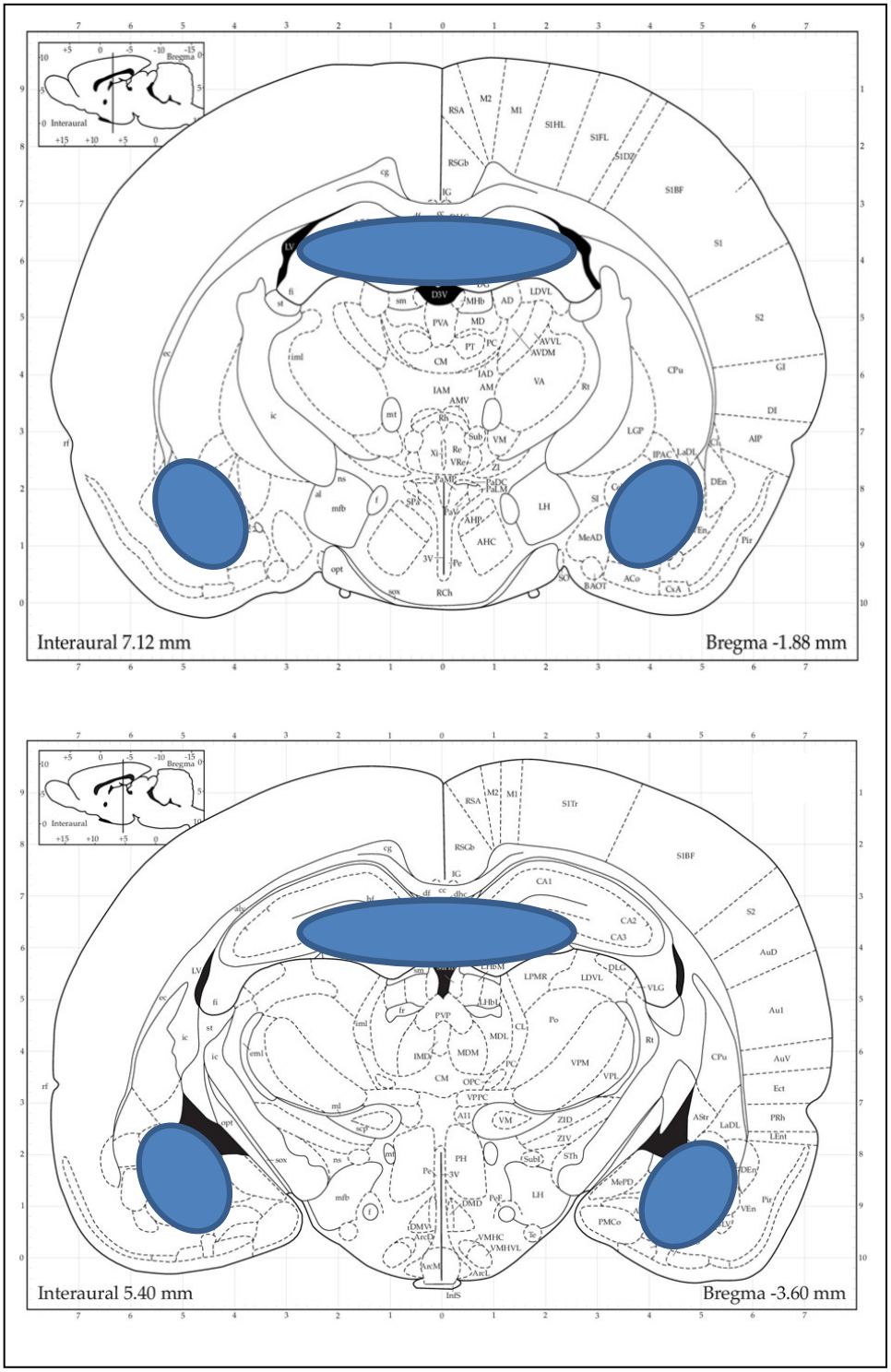

Figura 2. Planos coronales anterior y posterior entre los que se obtuvieron las muestras de HC y AM (tomado de Paxinos y Watson, 1998).

Las muestras de tejido se homogenizaron en 10 volúmenes de Tris ClH 10 mM (pH 7.4) y para obtener la fracción soluble se ultracentrifugaron a 100.000 g durante 30 min a 4ºC. En los sobrenadantes obtenidos se determinaron por triplicado la actividad enzimática soluble y el contenido de proteínas. Los precipitados se volvieron a homogenizar en el mismo tampón de Tris ClH al que se añadió el detergente Tritón-X-100 al 1% para solubilizar las proteínas unidas a membrana. El homogenado se volvió a ultracentrifugar y en los sobrenadantes que se obtuvieron se determinó por triplicado la actividad enzimática unida a membrana así como el contenido de proteínas. Para recuperar la actividad enzimática que inhibe el detergente, éste se retiró del medio añadiendo "Biobeads SM-2" (100 mg/ml) y agitando las muestras durante 2 h a 4ºC (**figura 3**).

Las actividades solubles (Sol) y unidas a membrana (MB) de AlaAP, LeuAP y P-LeuAP se determinaron fluorimétricamente utilizando como sustratos las aminoacil-β-naftilamidas (aaNNap): AlaNNap y LeuNNap de acuerdo con el método descrito por Ramírez y cols (2011). Para la determinación de AlaAP y LeuAP, 10 µl de cada sobrenadante se incubaron durante 30 min a 25ºC con 1 ml de la solución de sustrato: 2.14 mg/100 ml AlaNNap o bien 2.92 mg/ 100 ml LeuNNap, 10 mg/100 ml de albúmina bovina, y 10 mg/ 100 ml ditiotreitol (DTT) en 50 mM de tampón fosfato, pH 7.4. Para la determinación de P-LeuAP se añadió L-metionina 20 mM a la solución de sustrato (Mizutani y cols, 1976). Para detener las reacciones enzimáticas tras el período de incubación se añadió 1 ml (0.1 mol/l) de tampón acetato, pH 4.2. La cantidad de β-naftilamina, liberada por la acción enzimática, se midió fluorimétricamente a 412 nm de emisión con una excitación de 312 nm de longitud de onda. La sensibilidad del método permite medir las actividades enzimáticas en el rango picomolar. Las proteínas se determinaron por triplicado

según el método colorimétrico de Bradford (1976) (**figura 4**). Las actividades se expresan como pmol de AlaNNap o LeuNNap hidrolizada por min y por mg de proteínas. Los procedimientos experimentales estuvieron de acuerdo con la normativa de la unión europea 86/609/EEC y aprobados por la dirección general de la producción agrícola y ganadera de la Consejería de agricultura, pesca y desarrollo rural de la Junta de Andalucía con fecha de 30 de noviembre de 2015.

Las diferencias entre grupos se analizaron mediante un análisis de varianza de dos vías. Comparaciones Post-hoc se llevaron a cabo mediante el test LSD. Para estudiar la posible asociación entre las actividades aminopeptidásicas de mPFC, HC y AM se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Los cálculos se llevaron a cabo utilizando SPSS 13.0 y STATA 9.0. Se consideraron como significativos aquellos valores de p inferiores a 0.05.

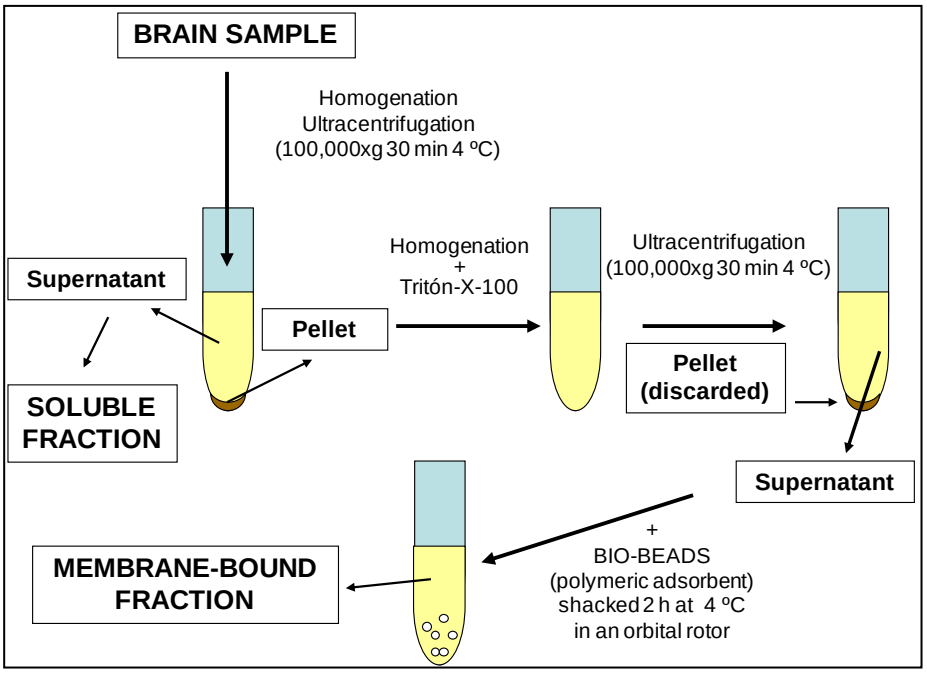

Figura 3. Esquema que indica el procedimiento seguido para la obtención de las fracciones soluble y unida a membrana, donde se determinaron, mediante fluorimetría, las diversas actividades enzimáticas y, mediante espectrofotometría, el contenido de proteínas (tomado de Ramírez y cols, 2011).

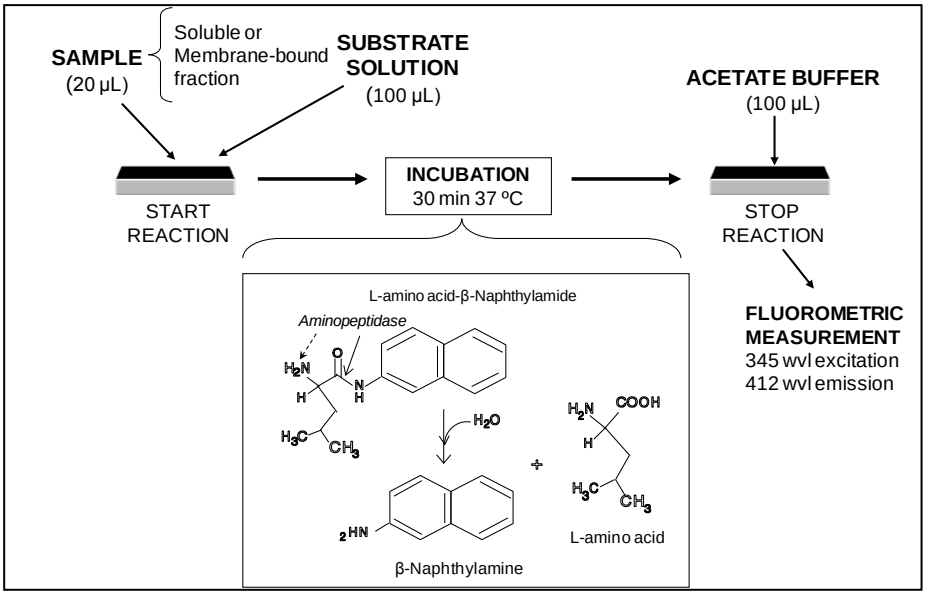

Figura 4. Reacción entre la AP y un ejemplo de sustrato artificial. El enzima reconoce el terminal amino libre de la aminoacil-β-naftilamida y separa, mediante hidrólisis, el aminoácido de la β-naftilamina que se puede medir fluorimétricamente a una determinada longitud de onda (ver texto) (tomado de Ramírez y cols, 2011).

RESULTADOS

RESULTADOS

La influencia del estrés agudo por inmovilización sobre las actividades aminopeptidásicas en mPFC, HC y AM se ilustra en la **figura 5**. Todas las actividades enzimáticas mostraron sus mayores niveles en AM, especialmente las actividades solubles. Las actividades de AlaAP (que refleja actividad encefalinasa y angiotensinasa), la de LeuAP (encefalinasa y angiotensinasa) y P-LeuAP (oxitocinasa) no se modificaron en la mPFC tras someter a los animales a las condiciones de estrés. Sin embargo, sí se observaron cambios en el HC y la AM. Mientras que AlaAP disminuyó significativamente ($p=0.018$) en la fracción soluble del HC, esta misma actividad aumentó ($p=0.012$) en la fracción unida a membrana de las ratas estresadas. En la AM, sólo la actividad soluble de P-LeuAP (oxitocinasa) disminuyó significativamente ($p=0.005$). Además, la actividad unida a membrana de AlAP también disminuyó significativamente ($p=0.012$) en la AM de los animales estresados (Hernández y cols. 2009).

En relación al perfil regional (**figura 6**), la actividad soluble de AlaAP en animales control y estresados, así como la actividad unida a membrana de AlaAP sólo en los controles, mostraron el mismo patrón regional con los mayores niveles en AM y los menores en mPFC, mostrando diferencias altamente significativas ($p<0.001$) entre las tres regiones. En marcado contraste, tras someter a los animales a estrés, la actividad unida a membrana de AlaAP, cambió significativamente su perfil de distribución regional mostrando, en este caso, los mayores niveles en AM e HC. La mPFC difirió significativamente del HC ($p<0.001$) y de la AM ($p<0.01$) pero no se observaron diferencias entre AM e HC. La actividad soluble de LeuAP, tanto en controles como estresados, mostró sus mayores niveles ($p<0.001$) en la AM, en comparación con mPFC e HC pero difiere de

AlaAP en que los menores niveles se obtuvieron en HC. La actividad unida a membrana de LeuAP, tanto en controles como estresados, mostró sus máximos niveles en la AM ($p<0.001$) y los menores en mPFC e HC, sin diferencias entre éstos últimos. La actividad soluble de P-LeuAP (oxitocinasa) también mostró un claro predominio ($p<0.001$) de la AM sobre mPFC e HC, sin diferencias entre éstos últimos. Sin embargo, la actividad unida a membrana, tanto en controles como en estresados, mostró sus mayores niveles en la AM y la mPFC (sin diferencia entre ellos) y los menores en el HC con diferencias altamente significativas con las otras regiones ($p<0.001$) (**figura 6**) (Hernández y cols, 2015).

Las correlaciones significativas intra- e inter-regionales entre las diferentes actividades enzimáticas determinadas en los animales control y estresados se muestran en la **tabla 1** y se ilustran en las **figuras 7 y 8**. En los animales control, la región que demostró un mayor número de correlaciones significativas fue la AM, siendo la mayoría de ellas de carácter positivo. Cuando se compararon las regiones entre sí, la mayor parte de las correlaciones significativas se observaron entre la mPFC y la AM, siendo la mayor parte de ellas positivas. Algunas de estas correlaciones mostraron valores altamente positivos como Sol AlaAP de la mPFC versus MB AlaAP de la AM ($r=+0.974$; $p<0.001$) o Sol P-LeuAP de la mPFC versus MB AlaAP de la AM ($r=+0.960$; $p<0.002$). Sin embargo, sólo se observó una correlación negativa entre la mPFC y el HC y ninguna entre AM e HC. Tras someter a los animales a estrés agudo por inmovilización, se observó un menor número de correlaciones intra-regionales que las que se observaron en los controles. Cuando se analizaron las correlaciones inter-regionales, se observó que mientras que el número de correlaciones significativas entre mPFC y AM había disminuido, el número de correlaciones significativas que presentaban

entre HC y AM y entre mPFC e HC había aumentado marcadamente (**tabla 1**, **figura 7**). Es necesario llamar la atención sobre la comparación entre la actividad Sol de AlaAP en la mPFC y la actividad Sol de P-LeuAP en el HC que fue altamente significativa (r=+0.993; p<0.0001). Tal y como ocurrió en los controles, la mayor parte de las correlaciones significativas que se observaron en los animales estresados lo fueron con carácter positivo (Hernández y cols, 2015).

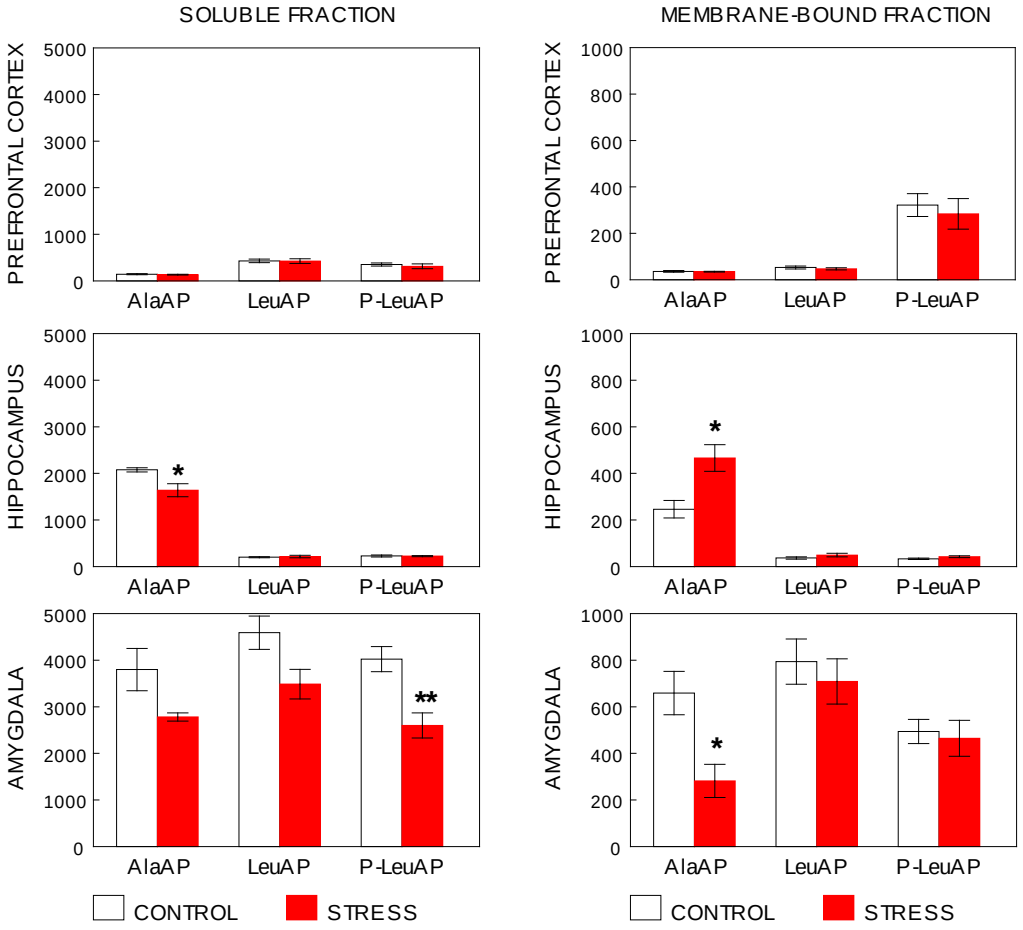

Figura 5. Actividad soluble y unida a membrana de alanina- (AlaAP), leucina- (LeuAP) y leucina-aminopeptidasa de placenta (P-LeuAP) en la corteza prefrontal medial, hipocampo y amígdala de ratas control (barras blancas) y sometidas a estrés agudo por inmovilización (barras rojas). Los valores representan la media ± EEM de la actividad específica de AlaAP, LeuAP y P-LeuAP expresadas como pmol de alanina- o leucina-β-naftilamida hidrolizada por min y por mg de proteínas. * representa la existencia de diferencias entre ratas control y estresadas * p<0.05, ** p<0.01 (Hernández y cols, 2009).

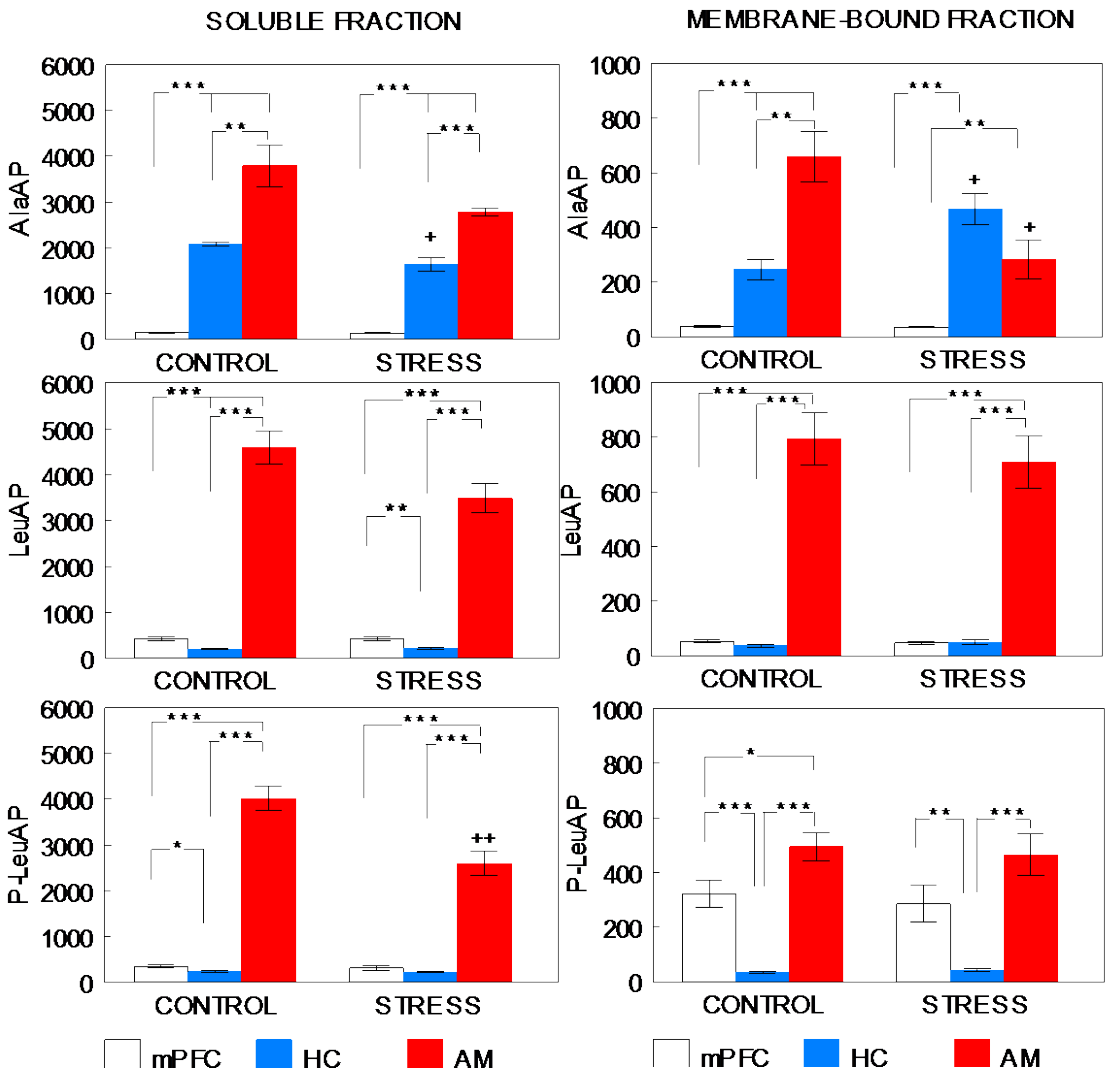

Figura 6. Distribución regional de la actividad soluble y unida a membrana de alanina- (AlaAP), leucina- (LeuAP) y leucina-aminopeptidasa de placenta (P-LeuAP) en la corteza prefrontal medial (mPFC, barras blancas), hipocampo (HC, barras azules) y amígdala (AM, barras rojas) de ratas control y sometidas a estrés agudo por inmovilización. Los valores representan la media ± EEM de la actividad específica de AlaAP, LeuAP y P-LeuAP expresadas como pmol de alanina- o leucina-β-naftilamida hidrolizada por min y por mg de proteínas. * Representa diferencias entre regiones: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; + representa diferencias entre animales control y estresados: +p<0.05, ++p<0.01 (Hernández y cols, 2009, 2015).

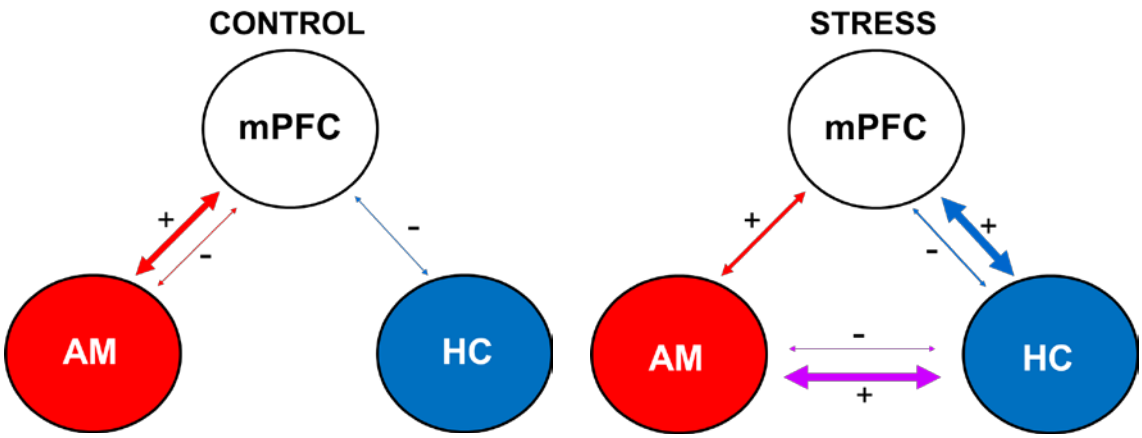

Figura 7. Correlaciones positivas (+) y negativas (-) entre la corteza prefrontal medial (mPFC, círculos blancos), hipocampo (HC, círculos azules) y amígdala (AM, círculos rojos) en los animales control y estresados de acuerdo con el número de correlaciones inter-regionales significativas que se indican en la tabla 1. El espesor de las líneas es proporcional al número de correlaciones. Las flechas, que indican la existencia de correlaciones entre regiones, están coloreadas dependiendo de las regiones que se comparan: mPFC vs AM (rojo), mPFC vs HC (azul), y HC vs AM (fucsia) (Hernández y cols, 2015).

CORRELACIONES INTRA- E INTER-REGIONALES

CONTROL			ESTRES		
Correlaciones significativas	r	p	Correlaciones significativas	r	p
mPFC AlaAP Sol vs mPFC P-LeuAP Sol	+0.906	0.01	mPFC LeuAP Sol vs mPFC P-LeuAP Sol	+0.997	<0.0001
mPFC LeuAP MB vs mPFC P-LeuAP Sol	*-0.849*	*0.03*	mPFC AlaAP Sol vs AM LeuAP Sol	+0.844	0.03
mPFC AlaAP Sol vs AM AlaAP MB	+0.974	0.001	mPFC LeuAP Sol vs AM LeuAP Sol	+0.869	0.02
mPFC AlaAP MB vs AM AlaAP Sol	+0.830	0.04	mPFC LeuAP MB vs AM AlaAP MB	+0.924	0.008
mPFC AlaAP MB vs AM LeuAP MB	+0.935	0.006	mPFC P-LeuAP Sol vs AM LeuAP Sol	+0.883	0.01
mPFC LeuAP MB vs AM LeuAP Sol	+0.911	0.01	mPFC AlaAP Sol vs HC LeuAP MB	+0.872	0.02
mPFC P-LeuAP Sol vs AM AlaAP MB	+0.960	0.002	mPFC AlaAP Sol vs HC P-LeuAP Sol	+0.993	<0.0001
mPFC AlaAP Sol vs AM P-LeuAP Sol	*-0.833*	*0.03*	*mPFC AlaAP Sol vs HC P-LeuAP MB*	*-0.893*	*0.01*
mPFC LeuAP MB vs HC P-LeuAP MB	*-0.847*	*0.03*	mPFC LeuAP Sol vs HC AlaAP Sol	+0.915	0.01
HC AlaAP Sol vs HC LeuAP Sol	+0.913	0.01	*mPFC LeuAP MB vs HC AlaAP MB*	*-0.815*	*0.04*
HC P-LeuAP Sol vs HC P-LeuAP MB	+0.896	0.01	mPFC LeuAP MB vs HC P-LeuAP Sol	+0.813	0.04
AM AlaAP Sol vs AM LeuAP Sol	+0.890	0.01	*mPFC LeuAP MB vs HC P-LeuAP MB*	*-0.850*	*0.03*
AM AlaAP Sol vs AM LeuAP MB	+0.972	0.001	mPFC P-LeuAP Sol vs HC AlaAP Sol	+0.905	0.01
AM AlaAP Sol vs AM P-LeuAP MB	+0.964	0.001	HC AlaAP Sol vs HC LeuAP MB	+0.932	0.006
AM LeuAP Sol vs AM LeuAP MB	+0.890	0.01	HC LeuAP MB vs HC P-LeuAP Sol	0.856	0.02
AM LeuAP Sol vs AM P-LeuAP MB	+0.943	0.004	*HC P-LeuAP Sol vs HC P-LeuAP MB*	*-0.924*	*0.008*
AM LeuAP MB vs AM P-LeuAP MB	+0.904	0.01	HC AlaAP Sol vs AM LeuAP Sol	+0.903	0.01
			HC AlaAP Sol vs AM P-LeuAP Sol	+0.851	0.03
			HC LeuAP Sol vs AM LeuAP MB	+0.910	0.01
			HC LeuAP Sol vs AM P-LeuAP MB	+0.883	0.01
			HC LeuAP MB vs AM AlaAP Sol	+0.886	0.01
			HC LeuAP MB vs AM LeuAP Sol	+0.935	0.006
			HC P-LeuAP Sol vs AM LeuAP Sol	+0.824	0.04
			HC P-LeuAP MB vs AM AlaAP MB	*-0.828*	*0.04*
			AM AlaAP MB vs AM P-LeuAP Sol	+0.816	0.04
			AM LeuAP MB vs AM P-LeuAP MB	+0.882	0.02

Tabla 1. Correlaciones significativas entre actividades aminopeptidásicas solubles (Sol) y unidas a membrana (MB) (AlaAP, LeuAP, P-LeuAP) entre mPFC, AM e HC de los animales control y estresados. Se indica el coeficiente de correlación de Pearson (r) y los valores de p. Las correlaciones inversas se indican en cursiva. Las correlaciones inter-regionales están coloreadas: mPFC vs AM (rojo), mPFC vs HC (azul), y HC vs AM (fucsia). Las correlaciones intra-regionales no se colorean (Hernández y cols, 2015).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Sobre el efecto del estrés agudo por inmovilización en los niveles de actividades aminopeptidásicas de la corteza prefrontal medial, amígdala e hipocampo

Los resultados obtenidos demuestran que al someter a los animales a un modelo de estrés agudo por inmovilización, se afectan de forma diferente las actividades de oxitocinasa y encefalinasa dependiendo de la fracción (soluble o de membrana) y de la región cerebral analizada. La actividad encefalinasa se reduce claramente en la fracción soluble del hipocampo y en la de membrana de la amígdala, pero la actividad oxitocinasa se reduce en la fracción soluble de la amígdala. Estos resultados podrían sugerir una mayor disponibilidad de encefalina y oxitocina en dichas localizaciones. Tales resultados sugieren la posible importancia de esas actividades enzimáticas en las propiedades ansiolíticas propuestas para las encefalinas y la oxitocina en el HC y la AM en condiciones de estrés. Sin embargo es necesario destacar que, puesto que la actividad enzimática que hidroliza el sustrato alanina-beta-naftilamida también refleja actividad angiotensinasa, responsable del metabolismo de la Ang III a la Ang IV, nuestros resultados también podrían indicar un papel para dichos péptidos en la respuesta al estrés. De esta forma, nuestros datos sugerirían un descenso en la formación de Ang IV en la amígdala. Sin embargo, habría un aumento en la formación de éste péptido en el hipocampo. Por lo tanto, según lo anterior, un estrés agudo por inmovilización afectaría a la disponibilidad de la Ang IV en el hipocampo y la amígdala de una forma opuesta. En este sentido, se ha descrito que la administración de Ang IV en el hipocampo aumenta significativamente la potenciación a largo plazo de una

forma dosis-dependiente y también dependiente del tiempo (Waygner y cols, 2001). Aunque la implicación de la amígdala está bien establecida en los procesos relacionados con la ansiedad (Narita y cols, 2006), el papel que ejerce el hipocampo aún no es concluyente (Engin y Treit, 2007). Sin embargo, nuestros resultados claramente indican que las actividades aminopeptidásicas en el hipocampo y la amígdala se afectan en condiciones de estrés agudo por inmovilización y por lo tanto, podrían modificar los niveles de encefalinas, oxitocina o angiotensinas y consecuentemente las acciones que éstos péptidos ejerzan en tales localizaciones, lo cual apoya un papel para tales péptidos y los enzimas que los regulan en la respuesta ansiolítica ante un estrés agudo por inmovilización. El análisis de la participación de las actividades aminopeptidásicas durante la respuesta al estrés puede abrir nuevas posibilidades terapéuticas que contemplen el uso de inhibidores de los enzimas implicados para prolongar la vida media de los agentes ansiolíticos.

Sobre el perfil de distribución regional de las actividades aminopeptidásicas tras un estrés agudo por inmovilización, considerando la corteza prefrontal medial, amígdala e hipocampo

El análisis de distribución regional de la actividad enzimática demostró que la mayor parte de las actividades neuropeptidásicas en las ratas control y estresadas mostró un predominio de la amígdala sobre el hipocampo y la corteza prefrontal. Esto indica un alto nivel de metabolismo de los sustratos susceptibles de hidrolizarse en dicha localización y, considerando las funciones de estos neuropéptidos, denota la importancia relativa de la amígdala en el circuito cortico-

límbico que forman estas tres áreas cerebrales. En contraste, la actividad encefalinasa, detectada cuando determinamos AlaAP unida a membrana, mostró un marcado cambio en los animales estresados con un predominio del hipocampo y la amígdala sobre la corteza prefrontal. Además, la actividad oxitocinasa, determinada como P-LeuAP unida a membrana, también mostró un cambio evidente en los animales estresados frente a los controles, demostrando en este caso un predominio de la corteza prefrontal y la amígdala sobre el hipocampo. Considerando el posible papel en el que pueden estar implicados los neuropéptidos susceptibles de hidrolizarse por estos enzimas, estos resultados podrían indicar un cambio en las funciones llevadas a cabo por este circuito tras someter a los animales a un estrés agudo por inmovilización.

Sobre el modelo intra- e inter-regional de correlaciones entre las actividades aminopeptidásicas dentro del circuito funcional que forman la corteza prefrontal medial, amígdala e hipocampo tras un estrés agudo por inmovilización

El estudio de correlación puede sugerir que las actividades neuropeptidásicas y en consecuencia, las funciones en las que están implicados los neuropéptidos susceptibles de hidrolizarse, están relacionados con el estado funcional del circuito formado por mPFC, HC y AM, que cambia significativamente tras someter a los animales a unas condiciones de estrés.

Según los resultados obtenidos, en los animales control, esta posible conexión implicaba una interacción positiva entre mPFC y AM.

Sin embargo, tras someter a los animales a estrés por inmovilización, hubo un marcado cambio en el modelo de interacciones dentro de este circuito funcional: surge una correlación positiva entre mPFC e HC y también entre AM e HC. Sin embargo la interacción que observábamos en los controles entre mPFC y AM disminuía significativamente. Tales interacciones entre regiones podrían establecerse mediante procesos de retroalimentación que impliquen mecanismos paracrinos y/o mediante transporte axonal bidireccional de neuropeptidasas (Prieto y cols, 2014). Neuropéptidos como las encefalinas u oxitocina coexisten con neurotransmisores clásicos en esas regiones cortico-límbicas (Poulin y cols, 2008). La presencia de neuropéptidos en tales regiones puede ser debida a su síntesis "in situ" o procedente de una distante liberación dendrítica al espacio extracelular que resulte no sólo en una acción local sino que difunda a través del cerebro, mediante mecanismos de transporte de fluido extracelular no identificados aún, para alcanzar localizaciones distantes a su lugar de origen. Por ejemplo, se ha descrito que neuronas del núcleo paraventricular hipotalámico producen oxitocina y vasopresina que se proyecta a otras regiones cerebrales como la amígdala o el hipocampo (Landgraf y Neumann, 2004).

Es difícil comprender el significado funcional de nuestros resultados. Sin embargo, dado que las actividades enzimáticas que estudiamos reflejan el estado funcional de sus sustratos endógenos peptídicos, nuestros resultados pueden reflejar la posible activación de una conexión funcional neuropeptidérgica entre mPFC, AM e HC tras una situación de estrés por inmovilización, lo cual podría estar implicado en algunas de las funciones llevadas a cabo por este circuito.

La inmovilización aguda es un situación inevitable de estrés que da lugar a importantes consecuencias autonómicas y de conducta en el animal de experimentación (Reis y cols, 2011). Se ha sugerido una posible modificación de las interacciones existentes entre áreas cerebrales tras una exposición a una experiencia estresante (Maroun y cols, 2003). El HC, la AM y la mPFC se han propuesto como importantes regiones que median algunos aspectos de la respuesta al estrés, participando especialmente en la interacción entre las emociones y la formación de memorias (Maroun y cols, 2003). El hipocampo parece interaccionar bidireccionalmente con la amígdala a través de conexiones directas o indirectas durante la codificación de memorias emocionales subsecuentes a acontecimientos estresantes (Richardson y cols, 2004). Se ha sugerido que la activación de las interacciones entre dichas áreas cerebrales podría aumentar la consolidación de la memoria (Bass y cols, 2014). Además, la mPFC es una región clave en este circuito cortico-límbico mediando en las respuestas a situaciones estresantes. Está bien establecido que la mPFC modula la función neuroendocrina durante el estrés (McEwen y cols, 1986), a través de su conexión con la AM (Akirav y Maroun, 2007) e HC (Xu y Südhof, 2013). Sin embargo, aunque hay abundantes evidencias que sugieren que el estrés agudo modifica los procesos cognitivos alterando la función de circuitos cerebrales que implican a regiones frontales y límbicas (Shafiei y cols, 2012), el mecanismo exacto por el cual interactúan estas regiones aún no ha sido dilucidado por lo que los presentes resultados, podrían ser relevantes para comprender mejor dicha respuesta. Nuestros datos sugieren un papel para las neuropeptidasas y sus correspondientes sustratos como encefalinas u oxitocina en la respuesta del circuito integrado por mPFC, AM e HC ante algunas condiciones de estrés, lo que puede influir en algunos procesos cognitivos como la memoria. De hecho se ha descrito que la vasopresina (Alescio-Lautier y cols,

2000), la oxitocina (Neumann, 2008), la actividad oxitocinasa (Gard, 2008), las encefalinas (Pierce y cols, 2014), y la actividad encefalinasa (Wu y cols, 2010) están relacionados con procesos de memoria. Por lo tanto, las neuropeptidasas y sus sustratos pueden representar un objetivo para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de las consecuencias del estrés.

En conclusión, teniendo en cuenta las actividades neuropeptidásicas, el estrés agudo por inmovilización induce un cambio muy significativo en el estado funcional del circuito que forman la mPFC, AM e HC. Este cambio consiste en un refuerzo de las interacciones que se observan en los animales control entre las regiones estudiadas, pero especialmente, activando una correlación positiva entre mPFC e HC y entre AM e HC. Para destacar esta sugerencia, en la **figura 8** se representan las comparaciones que obtuvieron los mayores niveles de correlación entre regiones, en los animales control y estresados, contrastándolas con las mismas comparaciones en el correspondiente grupo opuesto control o de animales estresados. Como se puede observar en la figura, resulta evidente que en los animales sometidos a estrés, hubo un cambio significativo en las interacciones entre actividades neuropeptidásicas que se observaron en los animales control.

Tal y como se ha apuntado anteriormente, la activación de esas interacciones (implicando actividades neuropeptidásicas) podría estar relacionada con cambios en los procesos cognitivos como un incremento en la consolidación de la memoria tras un estrés agudo por inmovilización. No obstante, para comprender adecuadamente el significado funcional de estos resultados, se deberán realizar estudios de conducta que impliquen la activación o inhibición de las actividades neuropeptidásicas en condiciones basales y de estrés, lo

que podría ser útil para el desarrollo de nuevos agentes ansiolíticos (Hernández y cols, 2015).

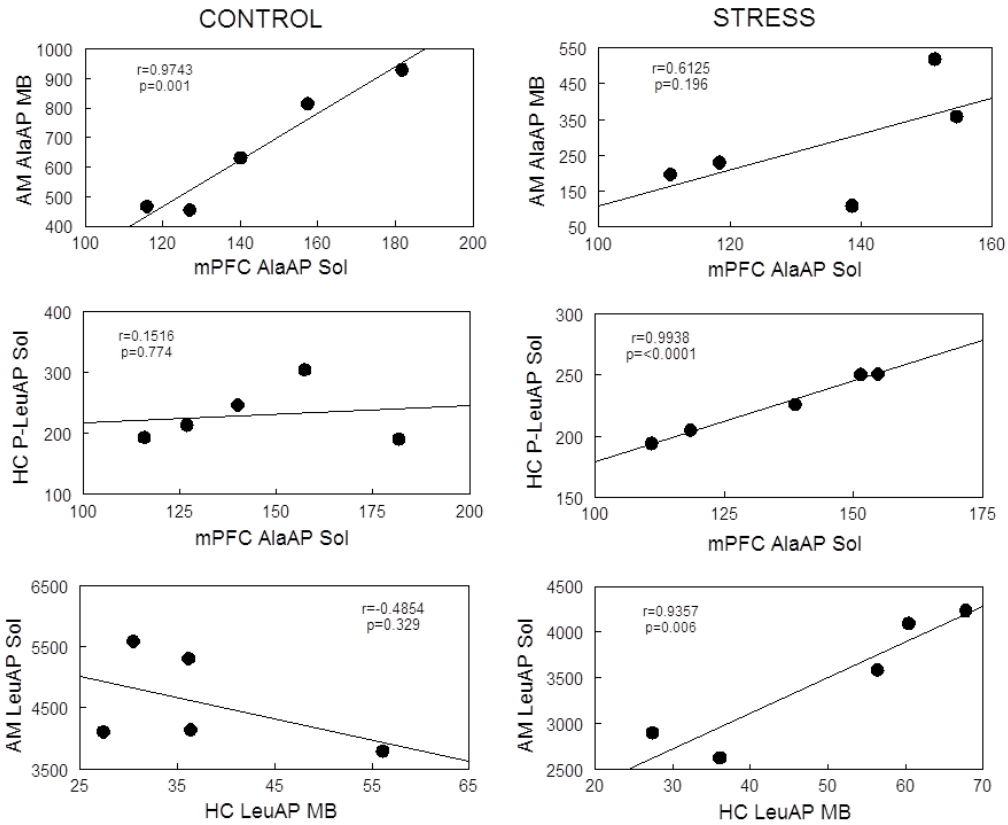

Figura 8. Correlaciones con los niveles más elevados de significación que hemos observado en las comparaciones inter-regionales (mPFC vs AM, mPFC vs HC y AM vs HC) en los animales control y estresados, contrastadas con las mismas comparaciones enzimáticas en el grupo contrario. Se indican los valores del coeficiente de correlación de Pearson (r) y los valores de p (Hernández y cols, 2015).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1ª Tras someter a los animales a un modelo de estrés agudo por inmovilización, se afectan de forma diferente las actividades de alanina aminopeptidasa, leucina aminopeptidasa o leucina aminopeptidasa de placenta, dependiendo de la fracción (soluble o de membrana) y de la región cerebral analizada. La actividad de alanina aminopeptidasa se reduce significativamente en la fracción soluble del hipocampo y en la de membrana de la amígdala, pero la actividad de leucina aminopeptidasa de placenta se reduce en la fracción soluble de la amígdala. Estos resultados podrían sugerir una mayor disponibilidad de encefalina y oxitocina en dichas localizaciones.

2ª El análisis de distribución regional de la actividad enzimática demostró que la mayor parte de las actividades neuropeptidásicas en las ratas control y estresadas mostró un predominio de la amígdala sobre el hipocampo y la corteza prefrontal. En contraste, la actividad encefalinasa, detectada cuando determinamos AlaAP unida a membrana, mostró un marcado cambio en los animales estresados con un predominio del hipocampo y la amígdala sobre la corteza prefrontal. Además, la actividad oxitocinasa, determinada como P-LeuAP unida a membrana, también mostró un cambio evidente en los animales estresados frente a los controles, demostrando en este caso un predominio de la corteza prefrontal y la amígdala sobre el hipocampo. estos resultados podrían indicar un cambio en las funciones llevadas a cabo por este circuito tras someter a los animales a un estrés agudo por inmovilización.

3ª Teniendo en cuenta las actividades neuropeptidásicas, el estrés agudo por inmovilización induce un cambio muy significativo en el estado funcional del circuito que forman la mPFC, AM e HC. Este cambio consiste en un refuerzo de las interacciones que se observan en los animales control entre las regiones estudiadas, pero especialmente, activando una correlación positiva entre mPFC e HC y entre AM e HC. La activación de esas interacciones podría estar relacionada con cambios en procesos cognitivos como un incremento en la consolidación de la memoria tras un estrés agudo por inmovilización.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Akirav I, Maroun M. The role of the medial prefrontal cortex-amygdala circuit in stress effects on the extinction of fear. Neural Plast 2007:30873.

Albiston AL, Mustafa T, McDowall SG, Mendelsohn FA, Lee J, Chai SY. AT4 receptor is insulin-regulated membrane aminopeptidase: potential mechanisms of memory enhancement. Trends Endocrinol Metab 2003;14:72-77.

Alescio- Lautier B, Paban V, Soumireu-Mourat B. Neuromodulation of memory in the hippocampus by vasopressin. Eur J Pharmacol 2000;405:63-72.

Bass DI, Nizam ZG, Partain KN, Wang A, Manns JR. Amygdala-mediated enhancement of memory for specific events depends on the hippocampus. Neurobiol Learn Mem 2014;107:37-41.

Bilkei-Gorzo A, Racz I, Michel K, Mauer D, Zimmer A, Klingmüller D, Zimmer A. Control of hormonal stress reactivity by the endogenous opioid system. Psychoneuroendocrinology 2008;33:425-436.

Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.

Campos AC, Fogaça MV, Aguiar DC, Guimarães FS. Animal models of anxiety disorders and stress. Rev Bras Psiquiatr. 2013;35:S101-111.

Checler, F. Methods in neurotransmitter and neuropeptide research. Parvez SH, Naoi M, Nagatsu T, Parvez S. (Eds), 1993; Elsevier, Amsterdam.

Davidson RJ, McEwen BS. Social influences on neuroplasticity: stress and interventions to promote well-being. Nat Neurosci 2012;15:689-695.

De Oliveira AC, Suchecki D, Cohen S, D'Almeida V. Acute stressor-selective effect on total plasma homocysteine concentration in rats. Pharmacol Biochem Behav 2004;77:269-273.

Domes G, Heinrichs M, Gläscher J, Büchel C, Braus DF, Herpertz SC. Oxytocin attenuates amygdala responses to emotional faces regardless of valence. Biol Psychiatry. 2007;62:1187-1190.

Drolet G, Dumont EC, Gosselin I, Kinkead R, Laforest S, Trottier JF. Role of endogenous opioid system in the regulation of the stress response. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 200;25:729-741.

Engin E, Treit D: The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. Behav Pharmacol 2007;18:365-374.

Everly Jr, GS, Lating JM The anatomy and physiology of the human stress response. In: A clinical guide to the treatment of the human stress response. 2013; Chapter 2: pp 17-51 Springer, New York.

Foley P, Kirschbaum C. Human hypothalamus-pituitary-adrenal axis responses to acute psychosocial stress in laboratory settings. Neurosci Biobehav Rev. 2010;35:91-96.

Gard PR. Cognitive-enhancing effects of angiotensin IV. BMC Neurosci 2008;9:S15.

Godsil BP, Kiss JP, Spedding M, Jay TM. The hippocampal-prefrontal pathway: the weak link in psychiatric disorders? Eur Neuropsychopharmacol 2013;23:1165-1181.

Goldstein DS, Kopin IJ. Evolution of concepts of stress. Stress 2007;10:109-120.

Hernández J, Prieto I, Segarra AB, de Gasparo M, Wangensteen R, Villarejo AB, Banegas I, Vives F, Cobo J, Ramírez-Sánchez M. Interaction of neuropeptidase activities in cortico-limbic regions after acute restraint stress. Behav Brain Res. 2015;287:42-48.

Hernández J, Segarra AB, Ramírez M, Banegas I, de Gasparo M, Alba F, Vives F, Durán R, Prieto I. Stress influences brain enkephalinase, oxytocinase and angiotensinase activities: a new hypothesis. Neuropsychobiology.2009;59:184-189.

Ikegaya Y, Saito H, Abe K. Dentate gyrus field potentials evoked by stimulation of the basolateral amygdaloid nucleus in anesthetized rats. Brain Res 1996;718:53–60.

Iwase A, Nomura S, Mizutani S: Characterization of a secretase activity for placental leucine aminopeptidase. Arch Biochem Biophys 2001;393:163-169.

Keller SR: The insulin-regulated aminopeptidase: a companion and regulator of GLUT4. Front Biosci 2003;8:s410-420.

Kim JJ, Koo JW, Lee HJ, Han JS. Amygdalar inactivation blocks stress-induced impairments in hippocampal long-term potentiation and spatial memory. *J Neurosci 2005;* 25:1532–1539.

Kirsch P, Esslinger C, Chen Q, Mier D, Lis S, Siddhanti S, Gruppe H, Mattay VS, Gallhofer B, Meyer-Lindenberg A. Oxytocin modulates neural circuitry for social cognition and fear in humans. J Neurosci. 2005;25:11489-11493.

Landgraf R, Neumann ID. Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. Front Neuroendocrinol 2004;25:150-176.

Light KC, Grewen KM, Amico JA, Boccia M, Brownley KA, Johns JM. Deficits in plasma oxytocin responses and increased negative affect, stress, and blood pressure in mothers with cocaine exposure during pregnancy. Addict Behav. 2004;29:1541-1564.

Linnen AM, Ellenbogen MA, Cardoso C, Joober R. Intranasal oxytocin and salivary cortisol concentrations during social rejection in university students. Stress. 2012;15:393-402.

Maroun M, Richter-Levin G. Exposure to acute stress blocks the induction of long-term potentiation of the amygdala-prefrontal cortex pathway in vivo. J Neurosci 2003;23:4406-4409.

Matsumoto H, Nagasaka T, Hattori A, Rogi T, Tsuruoka N, Mizutani S, Tsujimoto M: Expression of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in neuronal cells and its action on neuronal peptides. Eur J Biochem 2001;268:3259-3266.

McCorry LK. Physiology of the autonomic nervous system. Am J Pharm Educ. 2007;71:78.

McCubbin JA. Stress and endogenous opioids: behavioral and circulatory interactions. Biol Psychol. 1993;35:91-122.

McDonald JK, Barrett AJ. Mammalian proteases: a glossary and bibliography. 1986; vol 2. Academic Press, London.

McEwen BS, De Kloet ER, Rostene W. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. Physiol Rev 1986;66:1121-1188.

McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. Physiol Rev. 2007;87:873-904.

Melo de Carvalho, Irene. Neuropeptides in stress reactivity. Role of enkephalin in response to chronic stress. Thesis. Faculty of Mathematics and Natural Sciences. Rheinische Friedrich Wilhelms University, Bonn, 2014.

Milad MR, Quirk GJ. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. Nature 2002;420:70–74.

Mizutani S, Yoshino M, Oya M. Placental and non-placental leucine aminopeptidases during normal pregnancy. Clin Biochem 1976;9:16-18.

Narita M, Kaneko C, Miyoshi K, Nagumo Y, Kuzumaki N, Nakajima M, Nanjo K, Matsuzawa K, Yamazaki M, Suzuki T. Chronic pain induces anxiety with concomitant changes in opioidergic function in the amygdala. Neuropsychopharmacology 2006;3:739-750.

Neumann ID, Slattery DA. Oxytocin in general anxiety and social fear: a translational approach. Biol Psychiatry 2016;79:213-221.

Neumann ID, Torner L, Wigger A. Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant and lactating rats. Neuroscience 2000;95:567-575.

Neumann ID. Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. J Neuroendocrinol 2008;20:858-865.

Neumann ID: Stimuli and consequences of dendritic release of oxytocin within the brain. Bioch Soc Trans 2007;35:1252-1257.

Nomura S, Ito T, Mizutani S: Placental leucine aminopeptidase. In: Aminopeptidases in biology and disease. 2004; Kluwer Academic/Plenum, New York, Hooper NM and Lendeckel U Eds. pp 45-59.

Norman GJ, Cacioppo JT, Morris JS, Malarkey WB, Berntson GG, Devries AC. Oxytocin increases autonomic cardiac control: moderation by loneliness. Biol Psychol. 2011;86:174-180.

Okimoto N, Bosch OJ, Slattery DA, Pflaum K, Matsushita H, Wei FY, Ohmori M, Nishiki T, Ohmori I, Hiramatsu Y, Matsui H, Neumann ID, Tomizawa K. RGS2 mediates the anxiolytic effect of oxytocin. Brain Res 2012;1453:26-33.

Olff M, Frijling JL, Kubzansky LD, Bradley B, Ellenbogen MA, Cardoso C, Bartz JA, Yee JR, van Zuiden M. The role of oxytocin in social bonding, stress regulation and mental health: an update on the moderating effects of context and interindividual differences. Psychoneuroendocrinology. 2013;38:1883-1894.

Paxinos G, Watson C: The Rat brain in Stereotaxic Coordinates. 4ª Ed. 1998; Academic Press, London.

Pierce JP, Kelter DT, McEwen BS, Waters EM, Milner TA. Hippocampal mossy fiber leu-enkephalin immunoreactivity in female rats is

significantly altered following both acute and chronic stress. J Chem Neuroanat 2014;55:9-17.

Poulin JF, Castonguay-Lebel Z, Laforest S, Drolet G. Enkephalin co-expression with classic neurotransmitters in the amygdaloid complex of the rat. J Comp Neurol 2008;506:943-959.

Prieto I, Villarejo AB, Segarra AB, Banegas I, Wangensteen R, Martinez-Cañamero M, de Gasparo M, Vives F, Ramírez- Sánchez M. Brain, heart and kidney correlate for the control of blood pressure and water balance. Role of angiotensinases. Neuroendocrinology 2014;9:198-208.

Prieto I, Villarejo AB, Segarra AB, Wangensteen R, Banegas I, de Gasparo M, Vanderheyden P, Zorad S, Vives F, Ramírez-Sánchez M. Tissue distribution of CysAP activity and its relationship to blood pressure and water balance. Life Sci. 2015;134:173-178.

Quirk GJ, Likhtik E, Pelletier JG, Pare D. Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. J Neurosci 2003;23:8800–8807.

Ramírez M, Prieto I, Banegas I, Segarra AB, Alba F. Neuropeptidases. Methods Mol Biol. 2011;789:287-294.

Ramírez M, Prieto I, Vives F, De Gasparo M, and Alba F: Neuropeptides, neuropeptidases and brain asymmetry. Curr Protein Pept Sci 2004;5:497-506.

Reis DG, Scopinho AA, Guimarães FS, Corrêa FM, Resstel LB. Behavioral and autonomic responses to acute restraint stress are segregated within the lateral septal area of rats. PLoS One 2011;6:e23171.

Richardson MP, Strange BA, Dolan RJ. Encoding of emotional memories depends on amygdala and hippocampus and their interactions. Nat Neurosci 2004;7:278-285.

Richardson MP, Strange BA, Dolan RJ. Encoding of emotional memories depends on amygdala and hippocampus and their interactions. Nature Neurosci 2004;7:278–285.

Roldán E, Alvarez-Pelaez R, Fernandez de Molina A. Electrographic study of the amygdaloid defense response. Physiol Behav. 1974;13:779-787.

Shafiei N, Gray M, Viau V, Floresco SB. Acute stress induces selective alterations in cost/benefit decision-making. Neuropsychopharmacology 2012;37:2194-2209.

Solhonne B, Gros C, Pollard H, Schwartz JC: Major localization of aminopeptidase M in rat brain. Neuroscience 1987;22:225-232.

Sripada CS, Phan KL, Labuschagne I, Welsh R, Nathan PJ, Wood AG. Oxytocin enhances resting-state connectivity between amygdala and medial frontal cortex. Int J Neuropsychopharmacol. 2013;16:255-260.

Sterling P. Allostasis: a model of predictive regulation. Physiol Behav 2012;106:5-15.

Taylor SE, Gonzaga GC, Klein LC, Hu P, Greendale GA, Seeman TE. Relation of oxytocin to psychological stress responses and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity in older women. Psychosom Med. 2006;68:238-245.

Thompson MW, Hersh LB: The puromycin-sensitive aminopeptidase In: Aminopeptidases in biology and disease. 2004; Kluwer Academic/Plenum, New York, Hooper NM and Lendeckel U Eds. pp 1-15.

Toth I, Neumann ID. Animal models of social avoidance and social fear. Cell Tissue Res. 2013;354:107-118.

Tsujimoto M, Mizutani S, Adachi H, Kimura H, Nakazato H, Tomoda Y. Identification of human placental leucine aminopeptidase as oxytocinase. 1992;292:388-392.

Tuppy H, Nesbadva H. The aminopeptidase acitvity of serum in pregnancy and its relationship to the potential for inactivating oxytocin. Monatsh Chem 1957;88:977-988.

Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. Nat Rev Neurosci 2009;10:397–409.

Viviani D, Charlet A, van den Burg E, Robinet C, Hurni N, Abatis M, Magara F, Stoop R. Oxytocin selectively gates fear responses through distinct outputs from the central amygdala. Science 2011;333:104-107.

Wallis MG, Lankford MF, Keller SR. Vasopressin is a physiological substrate for the insulin-regulated aminopeptidase IRAP. Am J Physiol Endocrinol Metab 2007; 293:1092–1102.

Wayner MJ, Armstrong DL, Phelix CF, Wright JW, Harding JW. Angiotensin IV enhances LTP in rat dentate gyrus in vivo. Peptides. 2001;22:1403-1414.

Windle RJ, Kershaw YM, Shanks N, Wood SA, Lightman SL, Ingram CD. Oxytocin attenuates stress-induced c-fos mRNA expression in specific forebrain regions associated with modulation of hypothalamo-pituitary-adrenal activity. J Neurosci 2004;24:2974-2982.

Wright JW, Amir HZ, Murray CE, Roberts KA, Harding JW, Mizutani S, Ward PE. Use of aminopeptidase M as a hypotensive agent in spontaneously hypertensive rats. Brain Res Bull 1991;27:545-551.

Wu HM, Wang C, Wang XL, Wang L, Chang CW, Wang P, Gao GD. Correlations between angiotensinase activity asymmetries in the brain and paw preference in rats. Neuropeptides 2010;44:253-259.

Xu W, Südhof TC. A neural circuit for memory specificity and generalization. Science 2013;339:1290-1295.

PUBLICACIONES