



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES Y
CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

TESIS DOCTORAL

**EFECTO DE LAS HORMONAS
ESTERIOIDEAS SOBRE LAS ACTIVIDADES
AMINOPEPTIDASAS DEL EJE
HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL
DEL RATÓN**

**PRESENTADA POR:
MARÍA JESÚS GARCÍA LÓPEZ**

**DIRIGIDA POR:
DRA. DÑA. MARÍA JESÚS RAMÍREZ EXPÓSITO**

JAÉN, 23 DE MAYO DE 2003

ISBN 84-8439-203-1

**EFECTO DE LAS
HORMONAS ESTERIOIDEAS SOBRE
LAS ACTIVIDADES
AMINOPEPTIDASAS DEL EJE
HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL
DEL RATÓN**

MARÍA JESÚS GARCÍA LÓPEZ



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Nombre y apellidos del autor

MARÍA JESÚS GARCÍA LÓPEZ

Título de la Tesis Doctoral

EFFECTO DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS SOBRE LAS ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS DEL
EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL DEL RATÓN

I.S.B.N.

84-8439-203-1

Fecha de Lectura

23 DE MAYO DE 2003

Centro y Departamento en que fue realizada la lectura

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES Y DE LA SALUD
Departamento de Ciencias de la Salud

Composición del Tribunal/Dirección de la Tesis

Dirección de la Tesis	Dra. D ^a . María Jesús Ramírez Expósito
Presidente/a del Tribunal	Dr. D. Juan Manuel de Gandarias y Bajón
Vocales	Dra. D ^a . María Luisa del Moral Leal Dr. D. Félix Vargas Palomares Dra. D ^a . Amelia Arángena Jiménez
Secretario/a	Dra. D ^a . Garbiñe Arechaga Maza

Calificación Obtenida

SOBRESALIENTE CUM LAUDE



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**EFFECTO DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS SOBRE LAS ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS DEL EJE
HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL DEL RATÓN.**

El eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales es uno de los sistemas reguladores neuroendocrinos más importantes, y como su nombre indica, consiste en un bucle de retroalimentación que incluye al hipotálamo, la hipófisis y las glándulas adrenales. El eje está sujeto a una influencia de los esteroides sexuales, como indican las diferencias sexuales encontradas tanto en las funciones basales del eje como en las funciones relacionadas con el estrés, así como por las neuropatologías asociadas a las disfunciones del eje. Por tanto, las diferencias observadas entre machos y hembras reflejan diferentes efectos de las hormonas esteroideas sobre los distintos niveles del eje. Las aminopeptidasas son enzimas proteolíticos encargados de la inactivación de diversos péptidos activos con importantes funciones neurotransmisoras/neuromoduladoras, dando lugar a su inactivación o a la formación de otros péptidos, también con actividad biológica. La actividad de estas enzimas se ha demostrado regulada por las hormonas esteroideas. Por lo tanto, con el objetivo de analizar la influencia de los esteroides sexuales de machos y hembras sobre la actividad de diversas aminopeptidasas, y con ello, sobre los sustratos endógenos a los que regulan, en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales, se han llevado a cabo el análisis de las actividades enzimáticas de alanina aminopeptidasa, arginina aminopeptidasa, cisteína aminopeptidasa, aspartato aminopeptidasa, glutamato aminopeptidasa, piroglutamato aminopeptidasa, leucina aminopeptidasa y tirosina aminopeptidasa en el hipotálamo, hipófisis y glándulas adrenales, en su fracción soluble y de membrana, en ratones macho controles, orquidectomizados y orquidectomizados tratados subcutáneamente durante 10 días con 3 mg/Kg, 6 mg/Kg o 12 mg/Kg de testosterona, y en ratones hembra controles, ovariectomizados y ovariectomizados tratados subcutáneamente durante 10 días con 10 mg/Kg, 20 mg/Kg o 40 mg/Kg de estradiol, 100 mg/Kg, 200 mg/Kg o 400 mg/Kg de progesterona o 10 mg/Kg más 100 mg/Kg, 20 mg/Kg más 200 mg/Kg o 40 mg/Kg más 400 mg/Kg de estradiol más progesterona. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que:

1. El análisis de las actividades aminopeptidasas en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones macho y hembra es importante porque refleja el estado funcional de sus correspondientes sustratos endógenos, los cuales tienen importantes funciones como neurotransmisores/neuromoduladores en los distintos niveles del eje.
2. Los esteroides sexuales regulan la actividad de diversas aminopeptidasas, y por tanto, de los sustratos endógenos sobre los que actúan, a distintos niveles del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales, siendo esta regulación diferente en ratones macho y hembra.
3. Los esteroides sexuales participan en la regulación de las actividades aminopeptidasas implicadas en el sistema renina-angiotensina. En ratones macho, participan en la regulación de la actividad aminopeptidasa A, a nivel del hipotálamo en su fracción soluble, y de las glándulas adrenales, y de las aminopeptidasas M y B, en la fracción soluble de todos los niveles del eje, mientras que en ratones hembra, los esteroides sexuales regulan la actividad de la aminopeptidasa A en el hipotálamo, en su fracción soluble y de membrana, y glándulas adrenales, en su fracción de membrana, de la aminopeptidasa M, en la fracción de membrana del hipotálamo y glándulas adrenales, y de la aminopeptidasa B, en la fracción de membrana de hipotálamo y glándulas adrenales y en la fracción soluble de la hipófisis.
4. En ratones macho, los esteroides sexuales participan en la regulación de la actividad cisteína aminopeptidasa, implicada en la degradación de la vasopresina, a nivel de las glándulas adrenales, en su fracción soluble, mientras que en ratones hembra, los esteroides sexuales regulan dicha actividad a nivel del hipotálamo, en su fracción de membrana.
5. En ratones macho, los esteroides sexuales participan en la regulación de la actividad tirosina aminopeptidasa, implicada en la degradación de las encefalinas, a nivel de las glándulas adrenales, mientras que en ratones hembra, los esteroides sexuales regulan dicha actividad a nivel del hipotálamo y la hipófisis, en su fracción de membrana.

6. En ratones macho, los esteroides sexuales participan en la regulación de la actividad piroglutamato aminopeptidasa, implicada en la degradación de la TRH, a nivel del hipotálamo, en su fracción soluble, y las glándulas adrenales, mientras que en ratones hembra, los esteroides sexuales regulan dicha actividad a nivel del hipotálamo y la hipófisis.
7. El papel regulador de las hormonas esteroideas sobre las actividades aminopeptidasas en los distintos niveles del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales, puede ser responsable, al menos en parte, de las diferencias sexuales descritas para las diversas funciones del eje, tanto en situaciones basales como en situaciones de estrés.

**EFFECT OF THE STEROID HORMONES ON AMINOPEPTIDASE ACTIVITIES OF THE MICE
HYPOTHALAMUS-PITUITARY-ADRENAL AXIS.**

The hypothalamus-pituitary-adrenal axis is one of the most important neuroendocrine regulatory system and, as the name implies, consist in a feedback loop including the hypothalamus, pituitary and adrenal gland. It is clear that the axis is under sex steroid influence. Therefore, the differences found between male and female reflect different effects of steroid hormones at different levels of the axis. Aminopeptidases are proteolytic enzymes which play a physiological role in the degradation of circulating biologically active peptides with important neurotransmitter/neuromodulator functions and also can give rise to new peptides with properties different from its forerunner. It is clear an influence of gonadal steroids on aminopeptidase activities. Therefore, in order to analyze the sex steroid influence in males and females on several aminopeptidase activities, and in this way, on the endogenous substrate that regulate the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, we analyzed the enzymatic activities of alanine aminopeptidase, arginine aminopeptidase, cysteine aminopeptidase, aspartate aminopeptidase, glutamate aminopeptidase, pyroglutamate aminopeptidase, leucine aminopeptidase and tyrosine aminopeptidase in the hypothalamus, pituitary and adrenal glands in the soluble and membrane bound forms of male mice control, orchietomized and orchietomized treated subcutaneously for 10 days, with 3 mg/Kg, 6 mg/Kg or 12 mg/Kg of testosterone, and of female mice control, ovariectomized and ovariectomized treated subcutaneously for 10 days with 10 mg/Kg, 20 mg/Kg or 40 mg/Kg of estradiol, 100 mg/Kg, 200 mg/Kg or 400 mg/Kg of progesterone or 10 mg/Kg plus 100 mg/Kg, 20 mg/Kg plus 200 mg/Kg or 40 mg/Kg plus 400 mg/Kg of estradiol plus progesterone. Regarding the results, we conclude that:

1. The analysis of the aminopeptidase activities on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in male and female mice is important because reflects the functional state of their endogenous substrates, which have important functions as neurotransmitter/neuromodulators at different levels of the axis.
2. The sex steroids regulate the activity of several aminopeptidases and, therefore, of their endogenous substrates at different levels of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, and this regulation is different in male and female mice.
3. The sex steroids participate in the aminopeptidase activities regulations involved on the renin-angiotensin system. In male mice, participate in the aminopeptidase A activity regulation in the hypothalamus in its soluble form, and in the adrenal gland, and in the aminopeptidase M and B activities in its soluble form at all levels of the axis, whereas in female mice, sex steroids regulate aminopeptidase A activity in the hypothalamus in its soluble and membrane-bound forms and adrenal glands in its membrane-bound form, also regulate aminopeptidase M in its membrane-bound form in hypothalamus and adrenal glands, and aminopeptidase B, in its membrane-bound form in hypothalamus and adrenal gland and in its soluble form in pituitary.
4. In male mice, sex steroids participate in the cysteine aminopeptidase activity regulation, involved in vasopressin degradation, in the adrenal glands in its soluble form, whereas in female mice, sex steroids regulate this activity in the hypothalamus in its membrane-bound form.
5. In male mice, sex steroids participate in the tyrosine aminopeptidase activity regulation, involved in enkephalins degradation, in the adrenal glands, whereas in female mice, sex steroids regulate this activity in the hypothalamus and pituitary in its membrane-bound form.
6. In male mice, sex steroids participate in the pyroglutamate aminopeptidase activity regulation, involved in TRH degradation, in the hypothalamus in its soluble forms, and in the adrenal gland, whereas in female mice, sex steroids regulate this activity in the hypothalamus and pituitary.
7. The regulatory role of steroid hormones in the aminopeptidase activities at different levels of the hypothalamus-pituitary-adrenal glands axis, could be responsible, at least in part, of the sex differences at different level of the axis, either in basal or in stress conditions.



Universidad de Jaén

**EFFECTO DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS
SOBRE LAS ACTIVIDADES
AMINOPEPTIDASAS DEL EJE HIPOTÁLAMO-
HIPÓFISIS-ADRENAL DEL RATÓN.**

**María Jesús García López
Tesis Doctoral
Jaén, 2003**



UNIVERSIDAD DE JAÉN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA DE FISIOLÓGÍA

D^a María Jesús Ramírez Expósito y D. José Manuel Martínez Martos, Profesores Titulares de Fisiología, y D. Manuel Ramírez Sánchez, Catedrático de Fisiología, del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén, certifican que la Tesis Doctoral titulada “**Efecto de las hormonas esteroideas sobre las actividades aminopeptidasas del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal del ratón**”, que presenta D^a María Jesús García López para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección, reuniendo, a su juicio, los requisitos exigidos para su presentación.

Jaén, 17 de marzo de 2003

Fdo.: Dra. M.J. Ramírez Expósito

Fdo. Dr. J.M. Martínez Martos

Fdo.: Dr. M.J. Ramírez Sánchez



A mi familia.

Quisiera dirigir mi más sincero agradecimiento a cuantos han hecho posible de uno u otro modo, la realización de esta memoria. En primer lugar, agradecer a la Dra. María Jesús Ramírez Expósito y al Dr. José Manuel Martínez Martos su trabajo constante, sus enseñanzas y ante todo, su Amistad. ¡Gracias de corazón!. Al Dr. Manuel Ramírez Sánchez por darme la oportunidad de incorporarme a su equipo de trabajo hace ya casi 7 años. A la Dra. Garbiñe Arechaga Maza y a la Dra. Isabel Prieto Gómez, por su sonrisa y compañía. Es imposible olvidarse de mis compañeras de “fatigas” María Dolores Mayas Torres y María del Pilar Carrera González, las cuales me han brindado siempre su apoyo y amistad dentro y fuera del laboratorio. ¡Os deseo lo mejor!. Por último, agradecer enormemente el apoyo, comprensión y paciencia de mis padres, de mi hermano y especialmente de Ramón, quien ha compartido conmigo la ilusión por este proyecto.

¡Va por vosotros!

El trabajo que aquí se presenta ha sido realizado en el Área de Fisiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén.

Parte de los resultados obtenidos han sido presentados al *6th World Congress for Biomedical Sciences*, al *7th World Congress for Biomedical Sciences* y publicados en *Arch Neurocién (Mex)* 6: 170-173 (2001). *Rev Neurol* 33: 425-427 (2001). *Rev Neurol* 35: 784-793 (2002). *Arch Neurosci (en prensa)*. *Life Sci (en prensa)*.

Para la realización de este trabajo se ha contado con la subvención de las Ayudas a los Grupos de Investigación de la Junta de Andalucía (CVI 221).

ÍNDICE.

I. Introducción.

1. Enzimas proteolíticos.

1.1. Introducción.

1.2. Clasificación.

1.2.1. Endopeptidasas.

1.2.2. Exopeptidasas.

1.3. Resumen histórico.

1.4. Aminopeptidasas.

1.4.1. Alanina aminopeptidasa.

1.4.1.1. Alanina aminopeptidasa soluble.

1.4.1.2. Alanina aminopeptidasa microsomal.

1.4.2. Arginina aminopeptidasa.

1.4.3. Cisteína aminopeptidasa.

1.4.4. Aspartato aminopeptidasa.

1.4.5. Glutamato aminopeptidasa.

1.4.6. Piroglutamato aminopeptidasa.

1.4.6.1. Piroglutamato aminopeptidasa I.

1.4.6.2. Piroglutamato aminopeptidasa II.

1.4.7. Leucina aminopeptidasa.

1.4.8. Tirosina aminopeptidasa.

1.5. Enzimas proteolíticos y hormonas sexuales.

2. Hormonas sexuales.

2.1. Hormonas sexuales masculinas.

2.1.1. Introducción.

2.1.2. Los testículos.

2.1.3. Síntesis y metabolismo de los andrógenos.

2.1.4. Síntesis de estradiol.

2.1.5. Mecanismos de acción de los andrógenos y receptores.

2.1.6. Control hormonal de la función testicular.

2.2. Hormonas sexuales femeninas.

2.2.1. Introducción.

2.2.2. Los ovarios

2.2.3. Hormonas esteroideas ováricas.

2.2.3.1. Síntesis de estrógenos.

2.2.3.2. Síntesis de progesterona.

2.2.3.3. Síntesis de andrógenos.

2.2.4. Mecanismo de acción de las hormonas esteroides ováricas.

2.2.5. Ciclo reproductor.

3. Eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales.
 - 3.1. Introducción.
 - 3.1.1. El eje HHA y el sistema reproductor.
 - 3.1.2. El eje HHA como regulador de la presión sanguínea.
 - 3.1.3. El eje HHA y las encefalinas.
 - 3.2. Hipotálamo.
 - 3.2.1. Hormonas hipofisarias.
 - 3.2.1.1. Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).
 - 3.2.1.2. Hormona liberadora de tirotropina (TRH).
 - 3.2.2. Mecanismo de acción de las hormonas hipofisiotrópicas.
 - 3.3. Hipófisis.
 - 3.3.1. Hormonas de la neurohipófisis
 - 3.3.1.1. Control de la secreción de hormonas neurohipofisarias.
 - 3.3.1.2. Oxitocina.
 - 3.3.1.3. Vasopresina.
 - 3.4. Glándulas adrenales.
 - 3.4.1. Síntesis de hormonas adrenales.
 - 3.4.2. Aldosterona.
 - 3.4.3. Mecanismo de acción.
 - 3.4.3.1. Aldosterona.
 - 3.4.3.2. Angiotensina II.

II Hipótesis y planteamiento.

III. Material y Métodos.

1. Animales.
 - 1.1. Grupos experimentales.
2. Técnicas quirúrgicas.
 - 2.1. Orquidectomía.
 - 2.1.1. Tratamiento con testosterona.
 - 2.2. Ovaridectomía.
 - 2.2.1. Frotis vaginal.
 - 2.2.2. Tratamiento con estradiol.
 - 2.2.3. Tratamiento con progesterona.
 - 2.2.4. Tratamiento con estradiol más progesterona.
3. Sacrificio de los animales y obtención de muestras.

- 4. Obtención de la fracción soluble y de membrana.
- 5. Determinación de la actividad de aminopeptidasas.
 - 5.1. Recta de calibrado de β -naftilamina.
- 6. Determinación de proteínas.
 - 6.1. Recta de calibrado de albúmina.
- 7. Análisis estadístico.
- 8. Soluciones.
 - 8.1. Giemsa.
 - 8.2. Hidrato de cloral.
 - 8.3. Tris-ClH, 50 mM.
 - 8.4. Tris-ClH, 10 mM.
 - 8.5. Tris-ClH, 10 mM, tritón x-100 1%.
 - 8.6. Tampón fosfato 50 mM pH 7.4.
 - 8.7. Tampón acetato, 0.1 M, pH 4.2.
 - 8.8. Soluciones de incubación.
 - 8.8.1. Solución de alanina- β -naftilamida.
 - 8.8.2. Solución de arginina- β -naftilamida.
 - 8.8.3. Solución de cisteína- β -naftilamida.
 - 8.8.4. Solución de aspártico- β -naftilamida.
 - 8.8.5. Solución de glutámico- β -naftilamida.
 - 8.8.6. Solución de piroglutámico- β -naftilamida.
 - 8.8.7. Solución de leucina- β -naftilamida.
 - 8.8.8. Solución de tirosina- β -naftilamida.
 - 8.9. Solución de β -naftilamina.
 - 8.10. Solución de sal GBC.
 - 8.11. Solución de albúmina.
 - 8.12. Solución de bradford.

IV Resultados.

- 1. Efecto de la orquidectomía y la administración de testosterona sobre la actividad aminopeptidasa en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.
 - 1.1. Efecto de la orquidectomía y la administración de testosterona sobre la actividad específica de alanina aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.
 - 1.2. Efecto de la orquidectomía y la administración de testosterona sobre la

actividad específica de arginina aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

1.3. Efecto de la orquidectomía y la administración de testosterona sobre la actividad específica de cisteína aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

1.4. Efecto de la orquidectomía y la administración de testosterona sobre la actividad específica de aspartato aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

1.5. Efecto de la orquidectomía y la administración de testosterona sobre la actividad específica de glutamato aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

1.6. Efecto de la orquidectomía y la administración de testosterona sobre la actividad específica de piroglutamato aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

1.7. Efecto de la orquidectomía y la administración de testosterona sobre la actividad específica de leucina aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

1.8. Efecto de la orquidectomía y la administración de testosterona sobre la actividad específica de tirosina aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

2. Efecto de la ovariectomía y la administración de estradiol y progesterona sobre la actividad aminopeptidasa en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

2.1. Efecto de la ovariectomía y la administración de estradiol y progesterona sobre la actividad específica de alanina aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

2.2. Efecto de la ovariectomía y la administración de estradiol y progesterona sobre la actividad específica de arginina aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

2.3. Efecto de la ovariectomía y la administración de estradiol y progesterona sobre la actividad específica de cisteína aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

2.4. Efecto de la ovariectomía y la administración de estradiol y progesterona sobre la actividad específica de aspartato aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

2.5. Efecto de la ovariectomía y la administración de estradiol y progesterona sobre la actividad específica de glutamato aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

2.6. Efecto de la ovariectomía y la administración de estradiol y progesterona sobre la actividad específica de piroglutamato aminopeptidasa soluble y unida a

membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

2.7. Efecto de la ovariectomía y la administración de estradiol y progesterona sobre la actividad específica de leucina aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

2.8. Efecto de la ovariectomía y la administración de estradiol y progesterona sobre la actividad específica de tirosina aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

V Discusión.

1. Sobre la determinación de actividades aminopeptidasas.

2. Sobre los resultados.

2.1. Sobre la actividad APA, APM, APB y CysAP.

2.2. Sobre la actividad TyrAP (encefalinas).

2.3. Sobre la actividad pGluAP.

VI Conclusiones.

VII. Bibliografía.

I. INTRODUCCIÓN.

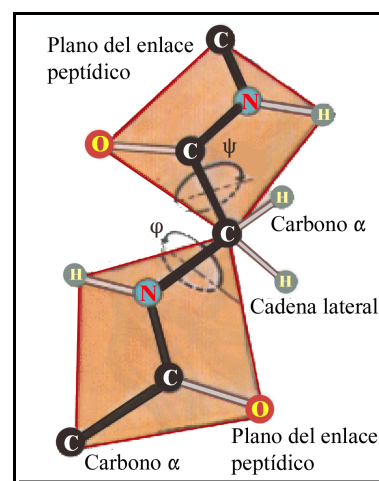
1. ENZIMAS PROTEOLÍTICOS.

1.1. Introducción.

Los enzimas proteolíticos son aquéllos que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos. Existen varios términos que, aunque tuvieron mínimas diferencias de significado (Barrett y McDonald, 1986), hoy se usan indistintamente junto al de enzimas proteolíticos, y son proteasas, proteinasas y peptidasas (Barrett *et al.*, 1998).

Desde un punto de vista químico, un enlace peptídico (*Figura EP.1.*) es un enlace amido establecido entre el grupo α -carboxílico de un aminoácido y el grupo α -amino del siguiente aminoácido de una cadena polipeptídica (con pérdida de una molécula de agua). Los enzimas que catalizan la ruptura hidrolítica de este enlace se denominan hidrolasas, según la Lista de la Comisión de Enzimas, E.C. (Webb, 1993).

Figura EP.1. Esquema de un enlace peptídico y su representación tridimensional.



Esta primera lista, principalmente la parte encargada de las peptidasas (perteneciente a la clase 3, subclase 3.4.), ha experimentado la mayor revisión, basada en las recomendaciones de un grupo de expertos del Comité de Nomenclatura de la Unión de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), que todavía hoy sigue en ello (www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme.html). Además, por si queda la posibilidad de que hubiese limitaciones con la clasificación para algunos de los enzimas aparece la clasificación MEROPS, que asigna las peptidasas a familias en base a las similitudes de la secuencia de aminoácidos; y grupos de familias forman clanes de acuerdo a la estructura tridimensional (Barrett *et al.*, 1998).

Uno de los temas al que se ha dedicado gran parte de la investigación científica en los últimos años, ha sido el estudio del metabolismo proteico. El conocimiento de la maquinaria encargada de sintetizar proteínas (el anabolismo proteico), desde el proceso de transcripción del material genético hasta el mecanismo de traducción a nivel ribosomal, junto con las complejas modificaciones posttraduccionales, constituye un cuerpo de doctrina perfectamente coherente y sobradamente contrastado. Sin embargo, los procesos por los que las proteínas son nuevamente

reducidas a sus pilares básicos, así como los mecanismos que regulan el catabolismo proteico, constituyen una laguna a pesar de que también se ha dedicado a este tema una considerable proporción de investigación experimental.

Todo lo que hoy se sabe sobre la degradación proteica se reduce al conocimiento de un determinado número de enzimas, ampliamente distribuidos en la naturaleza, con capacidad de catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos. Por otra parte, y a diferencia de los procesos anabólicos proteicos, todo este conocimiento se agrupa en una serie de datos que no presentan un nexo que interrelacione la actividad de unos enzimas con otros, ni con el resto del metabolismo celular, por lo que no se tiene aún un marco general donde pueda describirse una teoría del catabolismo proteico como un conjunto coherente de datos.

1.2. Clasificación.

Aunque actualmente resulte demasiado simplificado, clásicamente los enzimas proteolíticos se dividieron en exopeptidasas y endopeptidasas. Los primeros hidrolizan enlaces próximos (uno o dos residuos) a los extremos N- o C-terminal de la cadena polipeptídica, mientras que las endopeptidasas actuarían sobre enlaces distantes de los extremos de la cadena.

Dado que la especificidad de muchos de estos enzimas resulta demasiado compleja, debido a la existencia de enzimas con actividad exo- y endopeptidasa, (Singh y Kalnitsky, 1980) y ante la aparición de peptidasas que forman parte de complejos multicatalíticos (Tsukahara *et al.*, 1988), siempre se debería referir a que un determinado enzima tiene una “actividad peptidasa” concreta, más que a que sea una peptidasa. En el presente trabajo se utilizará indistintamente una u otra terminología aun siendo conscientes de este problema de nomenclatura. Además, la nomenclatura de las peptidasas es dificultosa. La especificidad es comúnmente difícil de definir dependiendo de la naturaleza de varios residuos aminoacídicos del enlace peptídico para ser hidrolizado y también de la conformación de la cadena polipeptídica sustrato.

La IUBMB clasificó a los enzimas proteolíticos en cinco clases o familias basándose en la comparación de sus centros activos, mecanismo de acción y estructura tridimensional. Cada familia tiene un conjunto característico de residuos aminoacídicos dispuestos en una configuración peculiar para formar el sitio activo. Además, cada clase de enzimas posee inhibidores característicos, lo que permite su clasificación dentro de un determinado grupo. Se cree que los miembros de cada familia descienden de una forma común ancestral por evolución divergente. Existen otros enzimas proteolíticos, actualmente aislados e identificados, que no pueden ser incluidos en esta clasificación hasta que no sea conocida la naturaleza de su centro activo y su mecanismo de acción (Barrett *et al.*, 1998). Estas cinco clases de enzimas proteolíticos basados en la naturaleza de los grupos responsables de la catálisis son:

- Serina-peptidasas. Contienen al menos un resto de serina en su centro activo y son inhibidas específicamente por di-isopropil-fosfofluoridato. Entre ellas citar tripsina, leucil endopeptidasa o prolil aminopeptidasa.
- Cisteína-peptidasas. Caracterizadas por poseer un grupo tiol (-SH) del aminoácido cisteína en su centro activo. Activadas por ditioneitol (DTT) e inhibidas por 4-cloromercuribenzoato. Entre ellas se encuentran piroglutamil peptidasa I y glicil endopeptidasa.
- Aspártico-peptidasas. Poseen un grupo carboxílico (usualmente del ácido aspártico) en su centro activo y son inhibidas por pepstatina. Como ejemplos renina y pepsina.
- Metallo-peptidasas. Caracterizadas por tener uno o dos iones metálicos en su centro activo (en la mayoría de los casos Zn^{2+}). Inhibidas por ácido etilén-diamino-tetraacético (EDTA) y fosforamidón. Entre ellas se encuentran la mayoría de las aminopeptidasas, como son las alanil-, leucil- o glutamil- aminopeptidasa.
- Peptidasas no clasificadas. Se incluyen aquí peptidasas de mecanismo catalítico desconocido tales como algunas dipeptidasas.

Como se ha dicho previamente, existe una clasificación diferente a la adoptada por la E.C., que aun teniendo en cuenta el grupo catalítico, agrupa a las peptidasas en familias y clanes de acuerdo a la secuencia y estructura tridimensional:

- Una familia de peptidasas es un grupo en el que cada miembro muestra una relación estadísticamente significativa en la secuencia de aminoácidos al menos con un miembro de la familia, en la parte de la molécula que es responsable de la actividad peptidasa (Reeck *et al.*, 1987). Cada familia de peptidasas es nombrada con una letra que denota el tipo catalítico (S, T, C, A, M, U; para serina, treonina, cisteína, aspártico, metalo o desconocida), seguido de un número arbitrario. Cuando una familia desaparece porque se fusiona con otra el número no vuelve a ser reutilizado.
- Clan es el término usado para describir a un grupo de familias cuyos miembros vienen de una sola proteína ancestral, que ha divergido tan rápidamente que no se ha podido probar la relación por comparación de la estructura primaria (Rawlings y Barrett, 1993; Barrett y Rawlings, 1995). La clara evidencia de la relación entre familias es la similitud entre las estructuras tridimensionales. El nombre del clan se forma con la letra del sitio catalítico (como para las familias) seguido de una segunda letra arbitraria. Si un clan desaparece el nombre no se vuelve a utilizar. No todas las familias pertenecen a un clan y cuando es necesario dar una asignación a esto se usa SX, CX...

1.2.1. ENDOPEPTIDASAS.

Se dividieron en base al metabolismo catalítico en:

- serina endopeptidasas
- cisteína endopeptidasas
- aspártico endopeptidasas
- metalopeptidasas

También nombrar las oligopeptidasas, que actúan de forma óptima en sustratos menores que las proteínas.

1.2.2. EXOPEPTIDASAS.

Las exopeptidasas son enzimas hidrolíticas cuya acción se limita a uno u otro terminal de la cadena polipeptídica. Estos enzimas se clasifican de acuerdo a la especificidad que muestran por un determinado sustrato y se les suele asignar un nombre convencional que indica el extremo del péptido (grupo α -amino o α - carboxilo) frente al cual son activos y el tamaño del fragmento liberado (aminoácido, dipéptido o tripéptido aislado).

Las exopeptidasas que requieren un grupo α -amino libre se denominan aminopeptidasas si liberan aminoácidos, dipeptidil aminopeptidasas si liberan dipéptidos, y tripeptidil aminopeptidasas si liberan tripéptidos. Las exopeptidasas que requieren un grupo carboxilo terminal no sustituido en los péptidos se denominan carboxipeptidasas si liberan aminoácidos y dipeptidil carboxipeptidasas si liberan dipéptidos.

Un tercer grupo de exopeptidasas son las denominadas dipeptidasas y tripeptidasas, cuyo principal atributo común es su especificidad por sustratos que poseen una determinada distancia (de dos o tres aminoácidos respectivamente) entre el grupo α -amino libre y el grupo α -carboxilo libre. Esto da lugar a confusiones, ya que ciertas dipeptidasas y tripeptidasas parecen afectar a cadenas polipeptídicas mayores (Coffey y De Duve, 1968) y algunas aminopeptidasas pueden utilizar como sustratos dipéptidos y tripéptidos de diversa naturaleza (Kania *et al.*, 1977; Felgenhauer y Glenner, 1966).

Las omega peptidasas agrupan a aquellas exopeptidasas capaces de separar residuos terminales cuyo grupo α -amino o α -carboxilo no se encuentre libre porque esté ciclado (por ejemplo: piroglutamato aminopeptidasa), esté sustituido o esté unido a otros residuos terminales que formen enlace mediante un grupo carboxilo o amino no unido a un carbono α (por ejemplo: γ -glutamato aminopeptidasa).

Los nombres dados a la mayoría de las aminopeptidasas se basan frecuentemente en sus preferencias o requerimientos por un residuo N-terminal característico. Por ejemplo, un enzima que muestre su más alta tasa de hidrólisis sobre enlaces formados por alanina en el extremo amino-terminal se denominaría alanina aminopeptidasa.

De manera similar, los nombres aplicados a las carboxipeptidasas que liberan aminoácidos individuales sirven para identificar el residuo carboxi-terminal preferido o requerido por el enzima.

1.3. Resumen Histórico.

El estudio de los enzimas proteolíticos tuvo su origen a finales del siglo XIX en los laboratorios alemanes, cuando se descubrió que la composición química de los tejidos se alteraba tras su almacenamiento. Tales alteraciones se producían aun cuando se impedía la intervención bacteriana. Al describir la naturaleza de estos cambios, Jacoby (1900) introdujo el término autólisis para referirse al proceso de autodigestión de los tejidos, producido presumiblemente por efecto de distintas actividades enzimáticas. Pronto se descubrió (Hedin y Rowland, 1901) que la actividad proteolítica era mucho mayor a pH ácido en todos los tejidos excepto en el músculo esquelético, el cual manifestaba débil actividad a ambos lados de la neutralidad.

En 1929, Willstätter y Bamann propusieron el término catepsina para describir peptidasas que actuaban preferentemente en medio ácido y que serían localizadas posteriormente en todas las células y tejidos, luego de origen lisosomal.

Un punto crucial en el estudio de estos enzimas fue la introducción de la hemoglobina como sustrato para medir la actividad proteolítica (especialmente la catepsina D) que se utiliza actualmente dada su facilidad de purificación y determinación (Ansos, 1938). Además, se introdujeron sustratos sintéticos para su determinación, algunos de los utilizados fueron Z-Glu-Tyr (Z-: Benciloxycarbonil-), Bz-Arg-NH₂ (Bz-: Benzoil-) y Leu-NH₂ como sustratos de las catepsinas I, II y III respectivamente (Fruton *et al.*, 1941a, 1941b). Esta última fue posteriormente reconocida como una aminopeptidasa y red denominada leucina aminopeptidasa. Además se descubrió la catepsina IV que describe la actividad hidrolítica sobre el sustrato Z-Gly-Phe y que finalmente ha sido identificada como una carboxipeptidasa.

En 1952, fueron clasificadas de nuevo las catepsinas por Tallan *et al.*, creando términos que aún resultan familiares: catepsina A, B y C. Posteriormente se descubrió la catepsina D y E (Press *et al.*, 1960; Lapresle y Webb, 1962).

A partir de 1970, el número de enzimas proteolíticos descritos incrementó de forma abrumadora, siendo evidente que la nomenclatura enzimática se iba de las manos por no existir

una autoridad que la guiara. En muchos casos el mismo enzima se conocía con nombres diferentes, mientras que a veces el mismo nombre era asignado a diferentes enzimas. Pero sus mecanismos catalíticos se encuadraron en uno de los previamente señalados. A continuación se hace referencia al descubrimiento de las exopeptidasas exclusivamente, agrupándolas según su localización subcelular (citosólicas, de membrana y lisosomales).

Las exopeptidasas citosólicas se encuentran entre las primeras proteasas conocidas (McDonald y Barrett, 1986). La mucosa intestinal fue la fuente original del descubrimiento de muchas exopeptidasas, ya que contiene una mezcla compleja de enzimas de diversa especificidad y naturaleza. Entre ellas se encuentran la leucina aminopeptidasa, primer ejemplo de exopeptidasa N-terminal conocido (Linderstrom-Lang, 1929), y varias dipeptidasas. Simultáneamente (Waldschmidt-Leitz y Purr, 1929) se descubrió en páncreas de buey una carboxipeptidasa. Más tarde (Folk, 1956) se describió otra carboxipeptidasa pancreática que mostraba preferencia casi absoluta por aminoácidos básicos. Esta última se denomina actualmente carboxipeptidasa B, y la primera, carboxipeptidasa A. Ambas son segregadas como zimógenos (procarboxipeptidasas) activables por tripsina.

Tras las aminopeptidasas de origen intestinal, se encontró que el riñón era una fuente aún más abundante de estas actividades enzimáticas (Spackman *et al.*, 1955) al igual que el cristalino y la pulpa dental. Hopsu *et al.* (1964) detectaron en los extractos de hígado de rata una nueva aminopeptidasa citosólica dependiente de Cl⁻ y grupos -SH, que fue denominada aminopeptidasa B (arginina aminopeptidasa) debido a su estricta especificidad por residuos básicos; Parece ser la contrapartida de la carboxipeptidasa B. La denominada alanina aminopeptidasa soluble fue descubierta en hígado (Behal *et al.*, 1966), pero su especificidad de sustrato, en contraste con la aminopeptidasa B, abarca la mayoría de residuos N-terminales de los péptidos, aunque la alanina sea el residuo preferido. Por otro lado, se identificó una nueva aminopeptidasa en riñón específica para los residuos aspártico y glutámico N-terminales (Cheung y Cushman, 1971), a la que mas tarde se le dio el nombre de aspartato aminopeptidasa (Wilk *et al.*, 1998).

Por otro lado, las membranas celulares contienen exopeptidasas de todo tipo, y la mayoría de ellas fueron inicialmente descritas a partir de extractos renales. La aminopeptidasa A (glutamato aminopeptidasa) es relativamente específica para aminoácidos N-terminales ácidos con preferencia por hidrolizar enlaces peptídicos donde participa el glutámico (Glenner *et al.*, 1962), a diferencia de su contrapartida citosólica que prefiere aspartato.

La aminopeptidasa M (alanina aminopeptidasa de membrana) (Pfleiderer y Celliers, 1963) sería la contrapartida de la alanina aminopeptidasa citosólica con un amplio rango de acción sobre enlaces donde participan aminoácidos neutros y básicos N-terminales.

Desde que Fekete (1930) descubriera la capacidad del suero de mujeres embarazadas de degradar oxitocina, muchos investigadores estudiaron este enzima de membrana, que es una aminopeptidasa con especificidad por los enlaces peptídicos entre la cisteína N-terminal y la tirosina adyacente de la oxitocina o vasopresina, por lo que se le llamó oxitocinasa o vasopresinasa (Sjöholm e Yman, 1967).

A nivel lisosomal se ha podido demostrar que algunas catepsinas B, D, H son realmente exopeptidasas y no endopeptidasas. Sólo se ha purificado una aminopeptidasa a este nivel (Kirschke *et al.*, 1977). Dicho enzima es una cisteína-proteinasa que, junto a su capacidad de hidrolizar proteínas, posee actividad aminopeptidásica. Por ello se le ha calificado de endoaminopeptidasa. Probablemente sea el enzima responsable de la actividad aminopeptidásica previamente insinuada por otros autores. Actualmente se le denomina catepsina H.

Por último, también se han encontrado representantes del grupo de las Ω -peptidasas en las tres localizaciones subcelulares previamente reseñadas (citosol, membrana y lisosomas). Por ejemplo, la piroglutamato peptidasa II es un enzima unido a membrana, mientras que la piroglutamato peptidasa I se encuentra en el citosol (McDonald y Barrett, 1986).

1.4. Aminopeptidasas.

En los últimos años se ha producido una importante aceleración en las investigaciones sobre enzimas proteolíticos, desarrollándose varias aplicaciones prácticas en biotecnología que sugieren que las peptidasas son potenciales dianas terapéuticas. El análisis de la secuencia completa de varios genomas ha mostrado que el 2% de todos los productos genéticos son peptidasas, lo que indica que se trata de uno de los grupos funcionales de proteínas más importante (Barrett *et al.*, 1998).

A continuación, siguiendo a Barrett *et al.* (1998), se expone un breve resumen de algunas de las aminopeptidasas presentes en el organismo de los mamíferos y descritas en la literatura. Junto a ellas se destacan algunas características y propiedades de estos enzimas.

1.4.1. ALANINA AMINOPEPTIDASA.

Se han descrito dos actividades específicas que han sido denominadas, según su localización como, alanina aminopeptidasa soluble y alanina aminopeptidasa microsomal.

1.4.1.1. Alanina aminopeptidasa soluble.

- *Clasificación de peptidasas*: Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.010.
- *Clasificación enzimática del NC-IUBMB*: E.C. 3.4.11.14.

- Acción.* Libera un aminoácido N-terminal, preferentemente Ala (en menor grado Leu, Arg, Phe, Tyr, Met), de un amplio rango de péptidos, aminoacil- β -naftilamidas y aminoacil-metilcumarinas.
- Sustrato artificial.* Ala- β -naftilamida.
- Propiedades moleculares.* Es una zinc-sialoglicoproteína de 100 KDa, con un ión Zn^{2+} unido a su única cadena proteica. Extremadamente sensible a la puromicina, también se inhibe por EDTA y 1,10-fenantrolina. Mientras que es activada por compuestos tioles, Ca^{2+} y Co^{2+} . pH óptimo de 7.5.
- Distribución.* Ampliamente distribuido por diferentes especies animales, especialmente tejidos de mamíferos y fluidos corporales.
- Aspectos biológicos.* La función fisiológica todavía no está bien conocida. La localización predominantemente citosólica no fundamenta el papel que también desarrolla en la degradación extracelular de péptidos bioactivos. Aunque exista en una amplia variedad de tejidos, la mayor parte del trabajo se ha realizado con enzimas cerebrales, ya que ha sido implicado en el metabolismo de las encefalinas. Pero su amplia distribución muestra que no tiene puramente un efecto regulador de los neuropéptidos, por lo que se sugiere que participa en procesos proteolíticos esenciales para el crecimiento y viabilidad celular.

1.4.1.2. Alanina aminopeptidasa microsomal.

- *Clasificación de peptidasas:* Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.001
- *Clasificación enzimática del NC-IUBMB:* E.C. 3.4.11.2.

También llamada aminopeptidasa M.

- Acción.* Libera un aminoácido N-terminal, preferiblemente Ala, aunque pueden ser muchos aminoácidos como Phe, Tyr, Leu y otros en menor grado, de péptidos, aminoacil- β -naftilamidas, aminoacil-pnitroanilidas y aminoacil-metilcumarinas. Cuando un residuo terminal va seguido de Pro, los dos pueden ser liberados como un dipéptido.

Sustrato artificial.

Ala-β-naftilamida.

Propiedades moleculares.

Es una metaloenzima altamente glicosilada por carbohidratos (20%). En su estado nativo existe como homodímero de 140-150 KDa en muchas especies, aunque se ha descrito como monomérica en el conejo (Feracci y Maroux, 1980). La cadena polipeptídica intacta (α) es susceptible de proteólisis generando dos fragmentos de 90 (β) y 45 (γ) KDa con un átomo de Zn²⁺ por subunidad. No se activa por iones de metales pesados y se inhibe por agentes quelantes, bestatina, amastatina, probestina y últimamente 3-amino-2-tetralona. Su pH óptimo está alrededor de 7, y al aumentar la concentración de sustrato puede llegar a 9.

Distribución.

Es una proteína de membrana integral de tipo II, localizada en la membrana plasmática como una ectoenzima, muy distribuida entre diferentes especies y tejidos, con mayor abundancia en las membranas del borde en cepillo de hígado, riñón, intestino delgado, con funciones típicas de estos lugares, y en cerebro.

Aspectos biológicos.

La presencia de este enzima en el cerebro ha sido muy estudiada debido a su potencial implicación en la hidrólisis e inactivación de acciones de ciertos neuropéptidos, especialmente de encefalinas, también de la sustancia P y la interleukina 8. Además está presente en células endoteliales y membranas sinápticas de varios tipos de células nerviosas, con funciones relacionadas con cada tipo celular. También actúa en el catabolismo del glutatión, para la reabsorción de aminoácidos. Es idéntica al antígeno CD13 expresado en la superficie de células hematopoyéticas y receptor de ciertos virus como coronavirus.

1.4.2. ARGININA AMINOPEPTIDASA.

- *Clasificación de peptidasas:* Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.014.
- *Clasificación enzimática del NC-UIMB:* E.C. 3.4.11.6.

También llamada aminopeptidasa B

Acción.

Libera residuos básicos (Arg, Lys) N-terminales de L-aminoacil-β-naftilamidas, L-aminoácido-4-metilcumarinas y de varios péptidos como las encefalinas, somatostatina y kalidina 10 (que se convierte en bradikinina).

Sustrato artificial. Arg-β-naftilamida.

Propiedades moleculares. Es una zinc-metalopeptidasa de 72,3 KDa con un átomo de Zn^{2+} unido a su única cadena proteica. Su pH óptimo es 7. Se inhibe por agentes quelantes (EDTA, EGTA y 1,10-fenantrolina) y por inhibidores clásicos como la bestatina y amastatina. Se activa por Cl^- a concentraciones fisiológicas y bajas concentraciones de compuestos tioles.

Distribución. Es un enzima de membrana o soluble ampliamente distribuido en diferentes tejidos de mamíferos y varias líneas celulares, aunque importante es su presencia en las espermátidas en la fase de maduración.

Aspectos biológicos. Su ubicuidad argumenta en favor de su adaptabilidad en varios subcompartimentos celulares y su implicación en un amplio espectro de fenómenos fisiológicos, incluyendo procesos inflamatorios en los que algunos sustratos potenciales de esta enzima (encefalinas, kalidina¹⁰ o somatostatina) pueden jugar un papel importante.

1.4.3. CISTEÍNA AMINOPEPTIDASA.

- *Clasificación de peptidasas:* Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.011.
- *Clasificación enzimática del NC-UIMB:* E.C. 3.4.11.3.

Acción. Libera un aminoácido N-terminal, Cys de sustratos como la oxitocina y vasopresina, además de hidrolizar L-cys-di-naftilamida, aminoacil-β-naftilamidas y aminoacil-p-nitroanilidas.

Sustrato artificial. Cys-β-naftilamida.

Propiedades moleculares. Es una glicoproteína en forma dimérica, y cada subunidad contiene dos átomos de Zn^{2+} . Dependiendo del método de purificación es de 14, 17 ó 21 KDa. Su pH óptimo es 7.4. Se inhibe por agentes quelantes (1,10-fenantrolina), inhibidores clásicos (bestatina y amastatina) y por cationes divalentes (Cd^{2+} , Cu^{2+}).

Distribución. Abunda en plasma de embarazadas y placenta de primates y humanos. También en el hipotálamo, existiendo trazas en suero de mujeres no embarazadas y hombres, aunque estudios con Northern blot muestran que existe en varios tejidos (corazón, músculo esquelético, cerebro).

Aspectos biológicos. Es un ectoenzima que degrada vasopresina y oxitocina, por lo que se llama también oxitocinasa. Durante el embarazo la placenta libera esta oxitocinasa a la circulación materna (mediante un mecanismo desconocido). La actividad enzimática permanece en suero a bajas concentraciones en el primer trimestre y aumentan progresivamente durante el segundo y tercer trimestre hasta llegar al máximo en el momento del parto. La oxitocinasa en sangre sirve como control de la presión sanguínea materna y del feto mediante la regulación de la concentración de péptidos vasoactivos. También sugiere que el enzima puede estar implicado en el crecimiento fetal mediante la degradación de somatostatina.

1.4.4. ASPARTATO AMINOPEPTIDASA.

La descripción de este enzima corresponde a Wilk *et al.* (1998).

- *Clasificación de peptidasas:* Clan MH, familia M18, MEROPS ID: M18.002.
- *Clasificación enzimática del NC-UlMBB:* E.C. 3.4.11.21.

Acción. Libera un aminoácido N-terminal ácido de péptidos (Glu, Asp) con preferencia por el aspártico, y aminoacil- β -naftilamidas aunque con menor eficacia.

Sustrato artificial. Asp- β -naftilamida.

Propiedades moleculares. Es una metalopeptidasa de 440 KDa sensible a agentes quelantes como el DTT e iones Zn^{2+} . pH óptimo en el rango neutro (7.5).

Distribución. Es un enzima con distribución uniforme por diferentes especies y tejidos, aunque la mayor actividad se encuentra en los testículos. Es abundante enzima citosólica en células de mamíferos.

Aspectos biológicos. Debido a su distribución uniforme en todos los tejidos y su abundancia en el citosol, se sugiere que tenga un papel en el metabolismo general de péptidos y

proteínas intracelulares. Un papel mas especializado en tejidos específicos puede ser el metabolismo de péptidos biológicamente activos como las angiotensina II.

1.4.5. GLUTAMATO AMINOPEPTIDASA.

- *Clasificación de peptidasas*: Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.003.
- *Clasificación enzimática del NC-UIBMB*: E.C. 3.4.11.7.

Acción. Libera restos glutámicos N-terminales y también, aunque en menor medida, restos aspárticos de péptidos, α -(L)-aminoacil- β -naftilamidas y α -(L)-aminoacil- ρ -nitroanilidas.

Sustrato artificial. α -(L)-Glu- β -naftilamida.

Propiedades moleculares. Es una zinc-metalopeptidasa de 45-400 KDa, dependiendo del método de purificación y del tejido. Sensible a agentes quelantes (EDTA, EGTA, 1,10-fenantrolina), amastatina e iones de metales de transición (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+}). Se activa por Ca^{2+} . pH óptimo 7.2.

Distribución. Es un enzima con distribución uniforme por diferentes tejidos, aunque principalmente en cerebro y digestivo.

Aspectos biológicos. Proteína integral de membrana de tipo II, de la que es bien conocido uno de sus sustratos fisiológicos, la angiotensina II (importante en la regulación de la presión sanguínea). Por esta razón se la ha llamado angiotensinasa, encargada de transformar la angiotensina II en angiotensina III (uno de los neuropéptidos mas activos en el cerebro), mediando así los efectos del sistema renina-angiotensina en el cerebro y la homeostasis de la presión sanguínea. Aunque este enzima se expresa en muchos tejidos, su expresión es específica de linea celular y la diferenciación es específica del estado de las células hematopoyéticas. También se sugiere que este ectoenzima puede estar implicado en la regulación de la proliferación de las células pre-B.

1.4.6. PIROGLUTAMATO AMINOPEPTIDASA.

Existen dos actividades específicas y diferenciadas de piroglutamato aminopeptidasa según la localización, la actividad piroglutamato aminopeptidasa I, localizada a nivel citosólico, y la actividad piroglutamato aminopeptidasa II, localizada a nivel de membrana (también llamadas piroglutamato peptidasas I y II). También se ha descrito esta actividad a nivel del suero, donde se le denomina tiroliberinasa (Cummins y O'Connor, 1998).

1.4.6.1. Piroglutamato aminopeptidasa I.

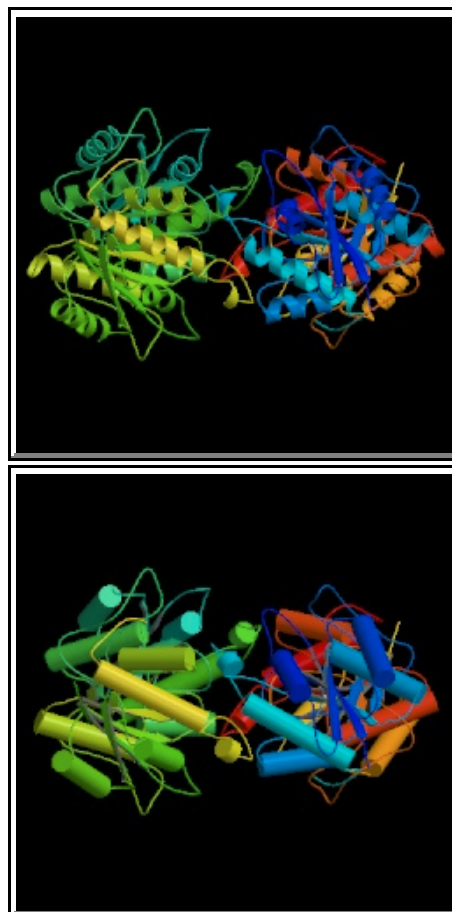
- *Clasificación de peptidasas*: Clan CF, familia C15, MEROPS ID: C15.010.
- *Clasificación enzimática del NC-UIMB*: E.C. 3.4.19.3.

Acción. Libera un grupo piroglutámico N-terminal de péptidos y proteínas, no siendo el segundo aminoácido Pro, además de aminoacil- β -naftilamidas, aminoacil-metilcumarinas y aminoacil- p -nitroanilidas.

Sustrato artificial. pGlu- β -naftilamida.

Propiedades moleculares. Cistein-peptidasa monomérica de 24 KDa y pH óptimo entre 6.5-8.5. Es un enzima sulfidril-dependiente, mostrando un requerimiento estricto de agentes como el DTT o 2-ME (2-mercaptoetanol). Se inhibe por iodoacetamida y otros agentes bloqueantes de grupos sulfidrilos. También es muy sensible a trazas de metales pesados. Tiene dos residuos de Cys, uno de los cuales está implicado en su actividad catalítica (*Figura EP.2.*).

Figura EP.2. Estructura tridimensional propuesta para el enzima piroglutamato aminopeptidasa I.



Distribución. Exopeptidasa ampliamente distribuida por diferentes especies y tejidos a nivel citosólico, especialmente en cerebro y digestivo.

Aspectos biológicos. Capaz de liberar residuos piroglutámicos N-terminales de péptidos biológicamente activos, incluyendo TRH, LHRH, neurotensina y bombesina. Aunque su papel no está claro todavía, por similitud a otras aminopeptidasas solubles puede contribuir a los estados funcionales del catabolismo intracelular de péptidos y aminoácidos libres.

1.4.6.2. Piroglutamato aminopeptidasa II.

- *Clasificación de peptidasas:* Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.008.

- *Clasificación enzimática del NC-UIBMB:* E.C. 3.4.19.6.

Acción. Libera el grupo piroglutámico N-terminal de tripéptidos pGlu-His-X y tetrapéptidos pGlu-His-X-Gly, con estrecha especificidad por sustratos como la TRH, además de el Glu del Glu-His-Pro- β -naftilamidas.

Sustrato artificial. pGlu- β -naftilamida.

Propiedades moleculares. Metalopeptidasa glicosilada, zinc-dependiente de alto peso molecular, 230 KDa, formada por dos subunidades. Se inhibe por 1,10-fenantrolina y agentes quelantes como el EDTA. PH óptimo de 7.3.

Distribución. Ectoenzima localizada concretamente como proteína integral de membrana en la superficie de células neuronales (no células gliales), aunque también se encuentra en todo el SNC, retina y pulmón.

Aspectos biológicos. La alta especificidad por su sustrato TRH indica que esta enzima puede servir para funciones muy especializadas. Su localización en cerebro, en las células neuronales sugiere que puede ser importante para la terminación y transmisión de señales de TRH, un neuromodulador o neurotransmisor del SNC.

1.4.7. LEUCINA AMINOPEPTIDASA.

- *Clasificación de peptidasas*: Clan MF, familia M17, MEROPS ID: M17.001.
- *Clasificación enzimática del NC-IUBMB*: E.C. 3.4.11.1.

Acción. Libera un aminoácido N-terminal, preferentemente Leu pero pueden ser otros aminoácidos, incluyendo Pro aunque en menor medida, de péptidos, aminoacil- β -naftilamidas y aminoacil-p-nitroanilidas.

Sustrato artificial. Leu- β -naftilamida.

Propiedades moleculares. Metalopeptidasa monomérica de 324 KDa. Se inhibe por amastatina y bestatina. Se activa por iones de metales pesados (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+}). El sitio activo tiene dos Zn^{2+} . pH óptimo de 9-9.5 (*Figura EP.3.*).

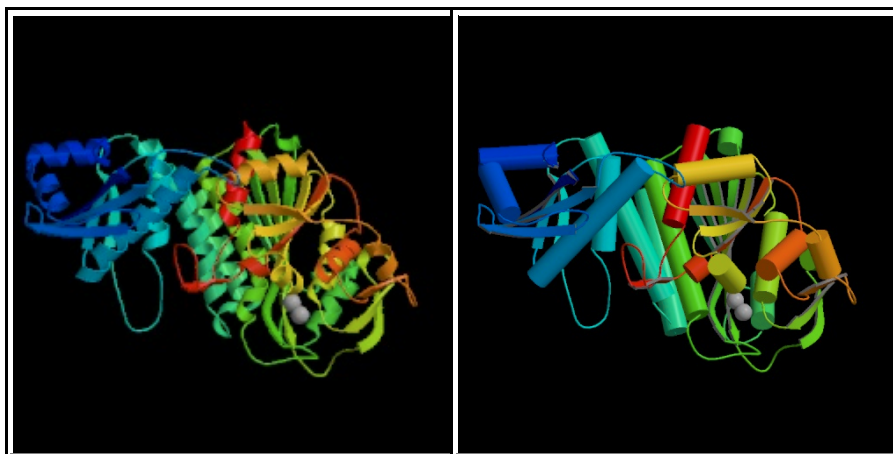


Figura EP.3. Estructura tridimensional propuesta para el enzima leucina aminopeptidasa.

Distribución. Enzima ampliamente distribuida y localizada en células de animales, plantas y también bacterias.

Aspectos biológicos. La función precisa en animales todavía no es bien conocida, aunque parece actuar en la degradación de oligopéptidos, incluyendo péptidos hormonales. La

actividad leucina aminopeptidasa alterada se ha asociado a ciertas condiciones patológicas como las cataratas en humanos. Los cambios en los niveles de este enzima se han usado para la diagnosis prenatal de la fibrosis cística.

1.4.8. TIROSINA AMINOPEPTIDASA.

Aunque todavía no se ha clasificado como tal, ha sido descrita una actividad tirosil aminopeptidasa (Hui *et al.*, 1998).

Acción. Libera un resto Tyr N-terminal de las Met-enkefalinas e hidroliza aminoacil- β -naftilamidas de aminoácidos con cadenas laterales alifáticas, polares no cargadas, cargadas positivamente o aromáticas.

Sustrato artificial. Tyr- β -naftilamida.

Propiedades moleculares. Cistein-peptidasa dependiente de grupos tioles de una sola cadena polipeptídica de 110 KDa. Se inhibe con agentes quelantes (EDTA, 1,10-fenantrolina) y es muy sensible a la inhibición por amastatina y puromicina, también a los metales divalentes como Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} . Sin embargo, Mg^{2+} lo restaura y el DTT es necesario para mantener la actividad enzimática. pH óptimo de 7.

Distribución. Distribución heterogénea, ha sido descrito exclusivamente en neuronas del SNC de cerebro de ratas (corteza e hipocampo), no en tejidos periféricos. Abundante en sinaptosomas. Un 85% se ha encontrado en forma soluble y el 15% restante asociado a membranas.

Aspectos biológicos. Su enriquecimiento en sinaptosomas y terminaciones nerviosas sugiere que juega un papel importante en la neurotransmisión y diferenciación sináptica. Degrada enkefalinas.

1.5. Enzimas proteolíticos y hormonas sexuales.

Trabajos previos (De Gandarias *et al.*, 1988; De Gandarias *et al.*, 1989; De Gandarias *et al.*, 1990) habían analizado distintas actividades aminopeptidasas a lo largo del ciclo del estro, en el que son conocidos los cambios hormonales que tienen lugar en cada una de sus fases, y que sugerían la participación de los esteroides sexuales en la regulación de estas actividades enzimáticas (*Figura EP.4.*). Trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio, intentaron demostrar la existencia o no de una influencia directa de los esteroides sexuales sobre la actividad aminopeptidasa. Para ello se incubaron muestras de sueros procedentes de ratones macho, hembras, machos orquidectomizados y hembras ovariectomizadas, con soluciones de sustrato que contenían colesterol, estradiol, testosterona, progesterona e hidrocortisona y determinamos la actividad AlaAP y GluAP (Martínez *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 1998).

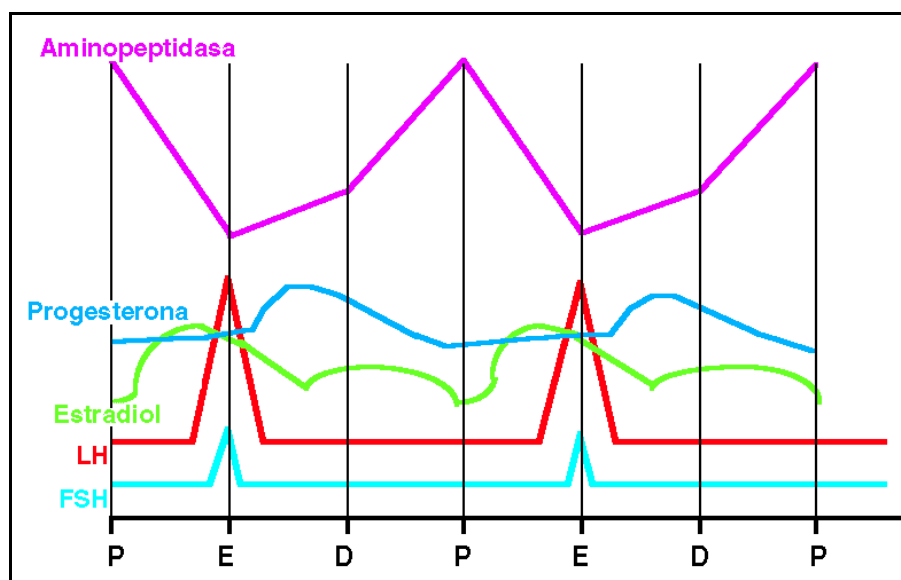


Figura EP.4. Evolución de los niveles de actividad aminopeptidasa, progesterona, estradiol, hormona luteinizante (LH), hormona estimulante de los folículos (FSH), durante los periodos de proestro (P), estro (E) y diestro (D) del ciclo sexual de la rata.

En el grupo control, la actividad de AlaAP fue significativamente mayor en machos que en hembras. La orquidectomía y ovariectomía aumentaban la actividad en machos y hembras. El incremento fue más pronunciado en machos que en hembras, por lo que el resultado final fue un aumento de las diferencias entre sexos después de la gonadectomía. En machos, la actividad disminuyó significativamente tras la incubación con estradiol, testosterona o progesterona. Sin embargo, no se modificó tras incubación con colesterol o hidrocortisona. En las hembras, ni el colesterol ni las hormonas esteroideas modificaron la actividad de AlaAP. En machos orquidectomizados tampoco se modificó la actividad con colesterol u hormonas esteroideas. Sin embargo, en hembras ovariectomizadas, mientras que las hormonas esteroideas aumentaron significativamente la actividad, el colesterol no la modificó.

También podemos observar una clara respuesta diferencial entre machos y hembras en la actividad sérica de AlaAP: Las hembras no gonadectomizadas no modificaron la actividad después de la incubación con los esteroideos, sin embargo, las ovariectomizadas aumentaron significativamente su actividad tras la incubación con las hormonas esteroideas. En contraste, los machos no gonadectomizados disminuyeron su actividad con la incubación de las hormonas esteroideas y no se modificaron tras la gonadectomía.

La actividad de GluAP también mostró mayores niveles en machos que en hembras en los grupos control. Sin embargo, la respuesta a la gonadectomía o a la incubación con colesterol y hormonas esteroideas fue radicalmente distinta. Mientras que la AlaAP aumentaba tras orquidectomía u ovariectomía, la actividad tiende a disminuir en la GluAP. Por otro lado, los 4 grupos aumentaron su actividad tras la incubación con el colesterol. Sin embargo, las hormonas esteroideas no modificaron el nivel de actividad.

Estos resultados, además de demostrar una influencia directa de las hormonas esteroideas sobre la actividad de AlaAP, podrían sugerir que la actividad refleja enzimas diferentes en machos que en hembras, o bien, que otros factores diferentes a los esteroideos sexuales, establecen la respuesta diferencial entre machos y hembras. Sin embargo, la GluAP aumenta tras la incubación con colesterol, en todos los grupos experimentales, lo cual refleja la misma respuesta enzimática en machos que en hembras.

2. HORMONAS SEXUALES.

2.1. Hormonas sexuales masculinas.

2.1.1. INTRODUCCIÓN.

La castración de los machos jóvenes para obtener eunucos fue una costumbre extendida entre las sociedades antiguas. Los eunucos no desarrollan los caracteres sexuales secundarios típicos de la adolescencia y la pubertad en los machos normales. Las bases fisiológicas de este desarrollo atípico de los machos no se entendía pero resultaba obvio que los testículos debían proporcionar algún estímulo para el desarrollo masculino normal. Ya en 1711, Hunter fue capaz de inducir caracteres masculinos en gallinas transplantándoles testículos procedentes de gallos; se había comprobado que la reversión sexual espontánea en gallinas estaba asociada a la conversión de los ovarios en testículos. En 1849, Berthold demostró que trasplantando testículos a gallos castrados se evitaba la pérdida de los caracteres sexuales secundarios y del comportamiento sexual. Posteriormente Brown-Séquard (1889) popularizó el concepto de que los testículos mantenían la virilidad afirmando que la administración de extractos testiculares restauraba el vigor.

En 1931 Butenald aisló por primera vez una sustancia androgénica (androsterona) de la orina de hombres. Algo antes, en 1927, se habían preparado extractos testiculares y poco después se aislaba en forma cristalina el principal principio androgénico. En 1935 Ruzicka y Wettstein sintetizaban y caracterizaban químicamente este principio y lo llamaban testosterona (Kochakian, 1993; Revisado en Hadley, 1997; Freeman *et al.*, 2001) (*Figura H.1.*).

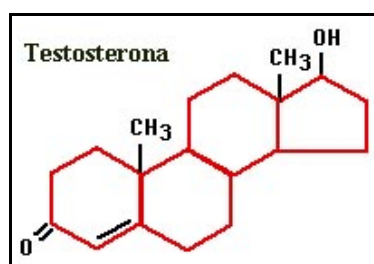
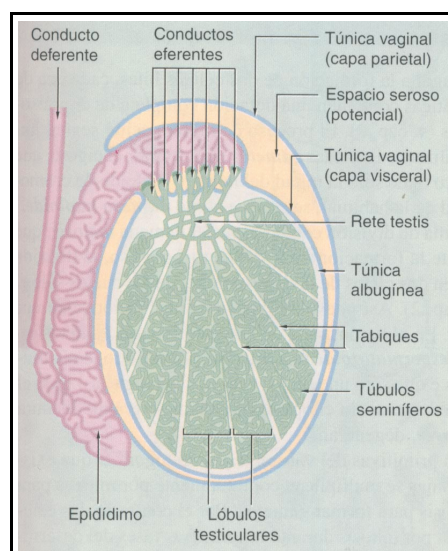


Figura H.1. Fórmula de la testosterona.

2.1.2. LOS TESTÍCULOS.

En los mamíferos los testículos se sitúan en el escroto y tienen forma ovoide. Cada testículo está recubierto por una capa de tejido conjuntivo denominada túnica albugínea. Los testículos están formados por los túbulos seminíferos en cuyo interior se producen los espermatozoides (Johnson *et al.*, 2000) y que convergen en la rete testis, que se abre mediante conductos o ductos eferentes en el epidídimo (Sellars y Sidhu, 2001). Este último está formado por la cabeza, el cuerpo y la cola, que conecta directamente con el vaso o conducto deferente (Figura H.2.).

Figura H.2. Anatomía macroscópica del testículo humano.



La capa más externa del túbulo seminífero está formada por tejido conjuntivo y músculo liso; la capa interna está compuesta por células de Sertoli, entre las que se encuentran embebidas espermatogonias y espermatozoides en distintos grados de maduración (Kerr, 1992). Las células germinales se encuentran profundamente mezcladas y entrelazadas con las células de Sertoli, lo que confirma la teoría de que estas últimas proporcionan los nutrientes y demás factores necesarios para la maduración de los espermatozoides (Kerr, 1992; Griswold, 1998). Los espermatozoides maduros se liberan a la luz de los túbulos seminíferos y avanzan lentamente hasta la rete testis y el epidídimo donde se almacenan en la cola. Entre los túbulos seminíferos se encuentran las células intersticiales de Leydig, que son las productoras de andrógenos en el interior del testículo (Habert *et al.*, 2001) (Figura H.3.).

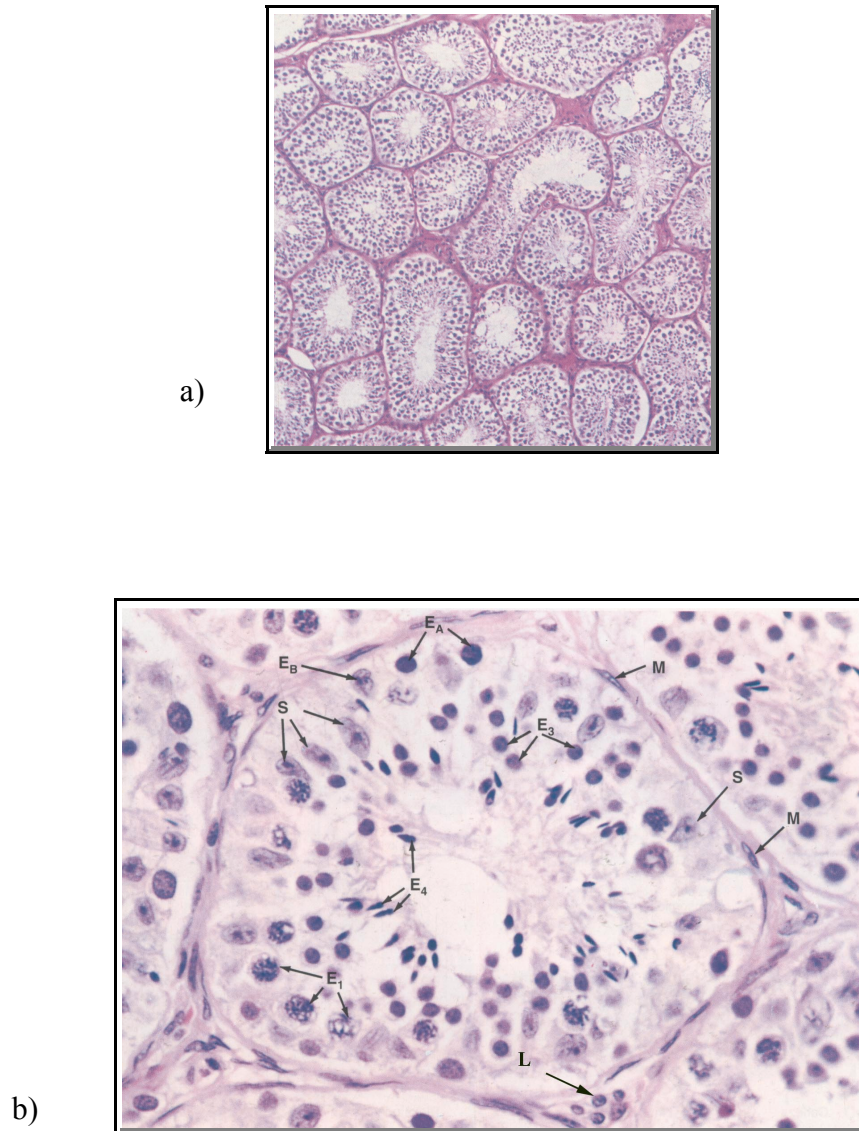


Figura H.3. Microfotografías de a) un corte transversal de túbulos seminíferos y b) vista de un sólo túbulo. Tinción Eosina-Hematoxilina 100× y 640× respectivamente. E_A : Espermatogonia tipo A; E_B : Espermatogonia tipo B; E_1 : Espermatozitos 1°; E_3 : Espermátides; E_4 : Espermatozoides; L: Células de Leydig; M: Miofibroblastos; S: Células de Sertoli.

Las funciones principales de los testículos en el adulto son dos: Proporcionar el ambiente adecuado para que se produzca la espermatogénesis y segregar testosterona para regular una serie de procesos corporales relacionadas con la función reproductora masculina (Amory y Bremner, 2002). En la presente memoria nos centraremos principalmente en la segunda de estas funciones.

2.1.3. SÍNTESIS Y METABOLISMO DE LOS ANDRÓGENOS.

Los andrógenos son hormonas importantes para la expresión del fenotipo en machos. Tienen funciones características en la diferenciación sexual, el desarrollo, el mantenimiento de caracteres secundarios, y durante la iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis (George y Wilson, 1994; Brinkmann, 2001). El colesterol es el precursor de la síntesis de hormonas sexuales tanto en los testículos como en las glándulas adrenales (Stocco, 2000). En las células de Leydig, partiendo del colesterol se sintetiza pregnenolona (Payne y Youngblood, 1995). En estas células, las lipoproteínas extracelulares de baja densidad son los sustratos principales para la producción de andrógenos. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en el tejido adrenal, en el tejido intersticial testicular, la vía esteroidogénica principal es la conversión de pregnenolona en esteroides hidroxilados en el carbono 17. En el hombre la conversión de pregnenolona en progesterona con una 17 hidroxilación posterior, no parece ser la vía de elección, al contrario, los 17-hidroxisteroides se convierten, por escisión de la cadena lateral en 17-cetoesteroides, que son, a su vez, convertidos en testosterona, que es el principal esteroide sintetizado por las células de Leydig (*Figura H.4.*). También se produce androstenediona y deshidroepiandrosterona, pero su potencia fisiológica es tan baja que no pueden usarse como sustitutos en caso de fallos de la función normal de las células de Leydig. El último paso en la biosíntesis de testosterona es la reducción de androstenediona por el enzima 17- β -hidroxisteroide deshidrogenasa/17-cetoesteroide reductasa (17- β HSD/17KSR) (Dufau *et al.*, 1997; O'Shaughnessy *et al.*, 2000). En general, la actividad androgénica vendrá determinada por la presencia en la molécula de un átomo de oxígeno en el C3 y un grupo hidroxilo o cetona en el C17.

La producción de testosterona está regulada, como veremos más adelante, por un sistema de feed-back negativo en el que intervienen la GnRH y la LH (Amory y Bremner, 2002). Además existen estudios que sugieren que tanto andrógenos como estrógenos podrían autorregular la expresión de sus propios receptores a través de sus mRNAs (Cordone *et al.*, 1998).

Casi el 100 % de la testosterona circulante esta unida a proteína: alrededor de un 40% se encuentra ligada a una β -globulina llamada globulina fijadora de esteroides gonadales, otro 40% va ligada a albúmina, estando así la testosterona disponible para los tejidos que la necesiten, y aproximadamente un 17 % a otras proteínas. Sólo de un 2-3% de la testosterona permanece libre, y es la responsable de su actividad biológica (Basaria y Dobs, 2001).

La inactivación de la testosterona se produce principalmente en el hígado (Jin y Penning, 2001) y consta de tres etapas: 1. Oxidación del grupo 17-OH; 2. Reducción del anillo aromático; 3. Reducción del grupo 3-ceto. Los principales productos de excreción de andrógenos en orina son, al menos en humanos, la androsterona y la eticolanolona que se excretan como conjugados glucorónicos o sulfatos.

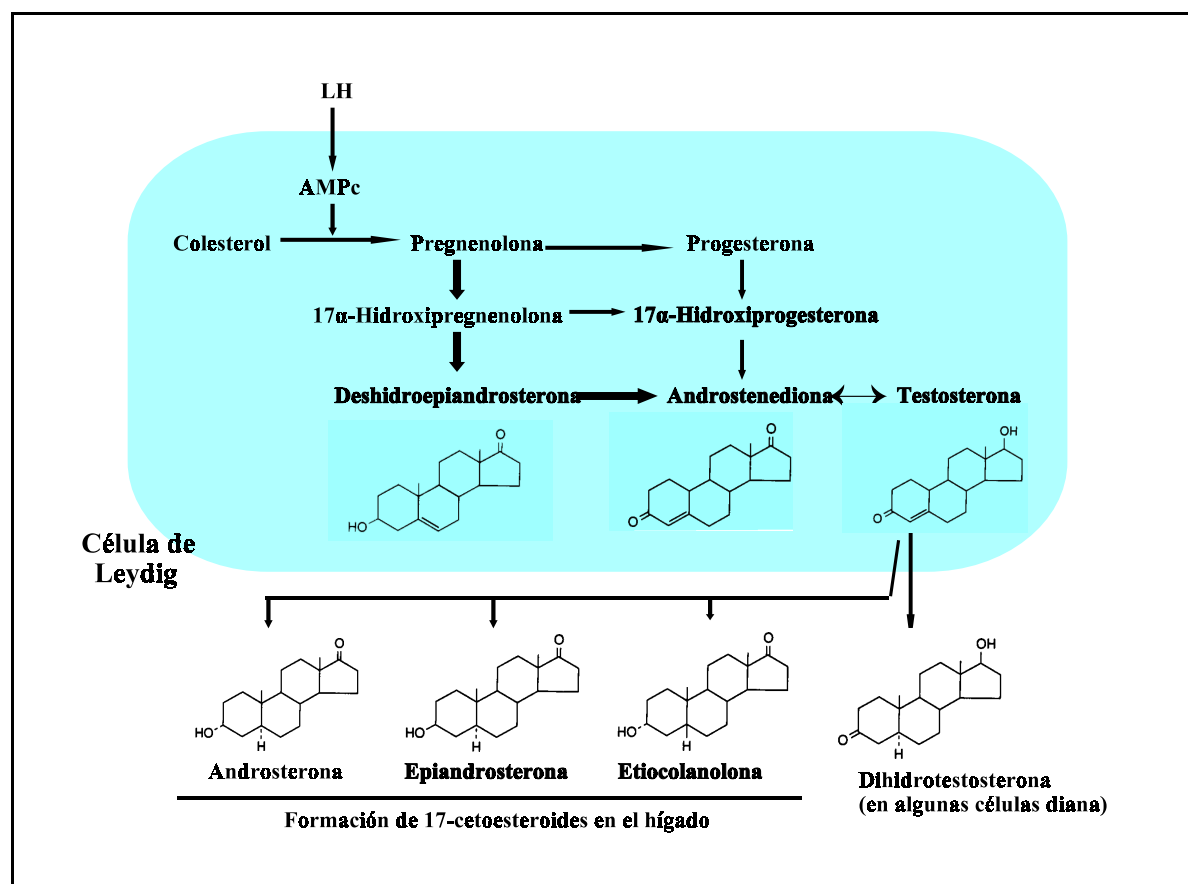


Figura H.4. Biosíntesis testicular y metabolismo hepático de la testosterona.

2.1.4. SÍNTESIS DE ESTRADIOL.

El estradiol es sintetizado en el aparato reproductor masculino por al menos 3 tipos celulares diferentes: Sertoli, Leydig y células germinales. Aunque la testosterona se considera como el principal esteroide sexual en el hombre, se producen estrógenos en cantidades elevadas en el testículo, así como en el cerebro (Simpson *et al.*, 1994; Simpson *et al.*, 1997) y se han encontrado en concentraciones extremadamente altas en el semen de varias especies (Hess, 2000). La alta concentración de estrógenos en el fluido de la rete testis de roedores, se sabe ahora que deriva de la conversión de testosterona en estradiol por la aromatasa P450 en células germinales y somáticas (células de Leydig y de Sertoli) de los testículos (Carreau *et al.*, 2001). Esta nueva fuente de estrógenos se unirían a receptores de estrógenos en el tracto reproductor del macho, en particular, los ductos eferentes, que contiene la mayor concentración de receptor α de estrógenos. Estos datos recientes dan lugar a nuevas hipótesis sobre el papel de los estrógenos en la función del sistema reproductor masculino. El receptor α de estrógenos, conocido en ratón, ha sido usado para ayudar a definir la función de los estrógenos en el macho. Se encontró que el receptor α de estrógenos es esencial para la reabsorción de fluidos en ductos eferentes y en su ausencia, el macho es infértil (Hess *et al.*, 2001).

2.1.5. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANDRÓGENOS Y RECEPTORES.

Los andrógenos realizan su función hormonal de acuerdo con el esquema clásico de acción de las hormonas esteroides; es decir, interactúan con receptores citoplasmáticos y nucleares, un mecanismo de dos fases, para estimular los procesos transcripcionales y traducionales relacionados con determinadas síntesis proteicas.

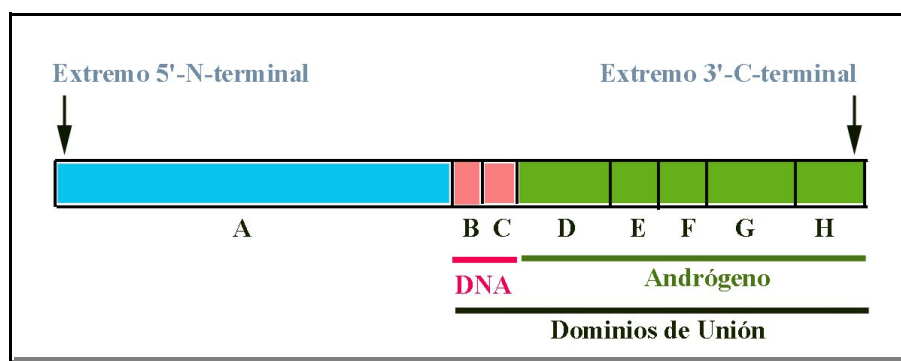


Figura H.5. Estructura esquemática del receptor de andrógenos.

Los receptores de andrógenos pertenecen a la subfamilia de receptores de hormonas esteroides, dentro de una familia mayor de proteínas nucleares que probablemente evolucionaron a partir de un gen ancestral común (Roy *et al.*, 2001). Se ha clonado y determinado el receptor de andrógenos y en el hombre se halla localizado en el cromosoma X (Brinkmann *et al.*, 1989). El gen del receptor de andrógeno está formado por ocho exones (A-H), que codifican para sus tres funciones específicas (Roy *et al.*, 2001) (*Figura H.5.*). El segmento N-terminal está codificado por el exón A y su función como “segmento transactivador” no está claramente definida, aunque se supone que optimiza la capacidad de transactivación y especifica el reconocimiento genético en la regulación transcripcional. El dominio de unión al DNA, una secuencia aminoacídica de 66-68 unidades, está codificada por los exones B y C, que codifica el primero y el segundo (C-terminales) “dedos de Zinc” respectivamente. El primer dedo de zinc especifica el reconocimiento entre el receptor y el DNA, mientras que el segundo es el responsable de la dimerización de dos moléculas de receptor durante su asociación con el DNA (Imperato-McGinley y Canovatchel, 1992; Janne *et al.*, 1993). El dominio C terminal fijador de andrógeno contiene unos 252 aminoácidos y está codificado por los exones D-H. El receptor de andrógenos presenta una gran homología en el dominio de unión al DNA y en el dominio de unión al ligando, con respecto a otros miembros de la subfamilia de receptores de hormonas esteroideas (Brinkmann y Traman, 2000). En la figura H.6. se representa un modelo para la activación del receptor por el andrógeno. El andrógeno penetra en la célula por difusión pasiva y se une al dominio fijador de andrógeno del receptor. Esta unión se cree que produce un cambio conformacional, exponiendo el dominio fijador al DNA del receptor y haciendo posible la unión con la cromatina nuclear. La unión al DNA inicia la transcripción de mRNA y por último la translación en proteínas específicas de andrógeno.

2.1.6. CONTROL HORMONAL DE LA FUNCIÓN TESTICULAR.

El control tanto de la espermatogénesis como de la síntesis de testosterona está regulado por el sistema nervioso central por un mecanismo clásico de feed back con la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) como señales hormonales principales. La LH actúa principalmente en las células de Leydig para promover la síntesis de testosterona mientras que la función principal de la FSH se realiza en las células de Sertoli y células germinales para facilitar la espermatogénesis. La secreción de FSH y LH por la hipófisis está regulada por señales hormonales tanto del sistema nervioso central como de las gónadas, incluyendo la testosterona y sus metabolitos, y la inhibina. La secreción de LH y FSH está bajo el control de la GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) (Amory y Bremner, 2002). Las hormonas gonadales pueden disminuir la liberación de gonadotropinas disminuyendo la liberación de la GnRH desde el hipotálamo y afectando a la capacidad de la GnRH de estimular la secreción de gonadotropinas desde la hipófisis. Por ejemplo, la administración de testosterona exógena da lugar a un enlentecimiento en la frecuencia de pulsos de la GnRH en hombres (Matsumoto y Bremner, 1984). La administración de testosterona también inhibe la LH y FSH mediante un efecto directo sobre

la hipófisis (Sheckter *et al.*, 1989). La regulación de la liberación de GnRH por el hipotálamo está también mediada en parte por la aromatización de testosterona a estradiol (Amory y Bremner, 2002). En los testículos, la LH estimula directamente la síntesis de una proteína (StAR) cuya función es transferir el colesterol desde fuera al interior de la membrana mitocondrial, el primer paso en la síntesis de hormonas esteroideas (Amory y Bremner, 2002).

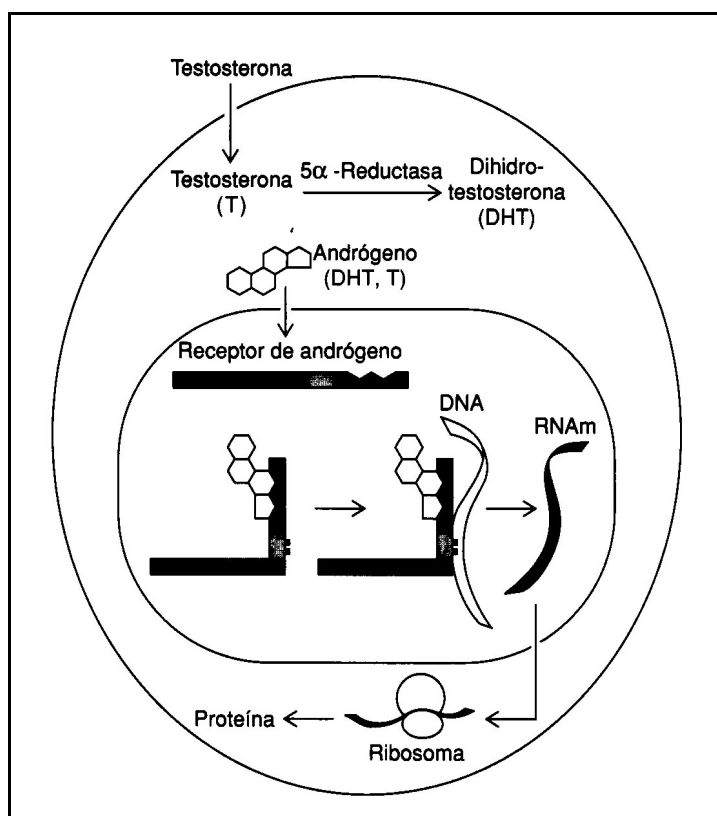


Figura H.6. Diagrama de los mecanismos de acción de los andrógenos a nivel celular.

2.2. Hormonas sexuales femeninas.

2.2.1. INTRODUCCIÓN.

Es conocido que en los mamíferos, el fenotipo femenino se desarrolla espontáneamente, en ausencia aparente de cualquier tipo de dirección hormonal gonadal (Hughes, 2001). Sin embargo, en la pubertad, es esencial la secreción de hormonas esteroideas ováricas para el establecimiento de los caracteres sexuales secundarios femeninos (Gulledge *et al.*, 2001). Además, la producción de hormonas gonadales regula la pauta cíclica de secreción de gonadotropinas hipofisarias características de las hembras y es la responsable de otros fenómenos cíclicos como la maduración de los oocitos, la ovulación y el ciclo ovárico.

Se ha sabido desde antiguo que la ovariectomía produce atrofia uterina y la pérdida de la actividad sexual y de la función reproductora. El papel de los ovarios en el control de la función reproductora se estableció en 1900 por Knauer, que demostró que el trasplante de ovarios evitaba los síntomas atróficos de la gonadectomía. Se vio que los extractos de ovarios eran capaces de mantener la integridad de las estructuras reproductoras tras la ovariectomía y Allen y Doisy demostraron que el folículo de Graaf era la fuente principal de actividad estrogénica (Allen y Doisy, 1923). Se descubrió a continuación, una sustancia en la sangre de muchos animales, que presuntamente era una hormona sexual femenina, y cuya concentración variaba con la fase del ciclo menstrual en las mujeres. Un descubrimiento adicional importante fue que esta sustancia, un esteroide, aparecía en la orina de las mujeres embarazadas en cantidades considerables. Los químicos pudieron aislar la sustancia activa de la orina en forma cristalina y determinar su estructura química. Esta hormona esteroide, el estradiol (*Figura H.7.a*), juega un papel esencial en el control de los caracteres sexuales secundarios femeninos de la mayoría de las especies de vertebrados. También se comprobó que el cuerpo lúteo del ovario segregaba otra hormona esteroide que era necesaria para el desarrollo normal del embarazo. Esta hormona, la progesterona (*Figura H.7.b*), pudo ser aislada y sintetizada en 1934.

Aunque se ha demostrado que los estrógenos y progestágenos ováricos juegan un papel esencial en la regulación de la función reproductora femenina, se ha podido comprobar que, además, son imprescindibles las acciones de otras hormonas de origen neural, adrenal y uterino-placentario para que esta función se lleve a cabo normalmente.

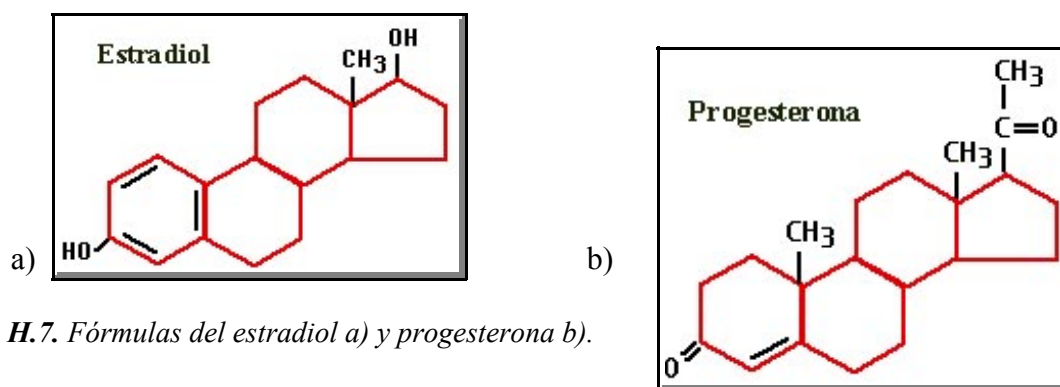


Figura H.7. Fórmulas del estradiol a) y progesterona b).

2.2.2. LOS OVARIOS.

Los ovarios poseen tanto componentes mesenquimáticos como epiteliales. Los mesenquimáticos se diferencian en tejido intersticial, que será la fuente principal de producción de estrógenos por el ovario. El tejido epitelial queda íntimamente asociado con los elementos germinales del ovario, además de proporcionar un entorno nutritivo para los oocitos, será una fuente importante de hormonas en algunas fases particulares del ciclo femenino (Auersperg *et al.*, 2001) (*Figura H.8*).

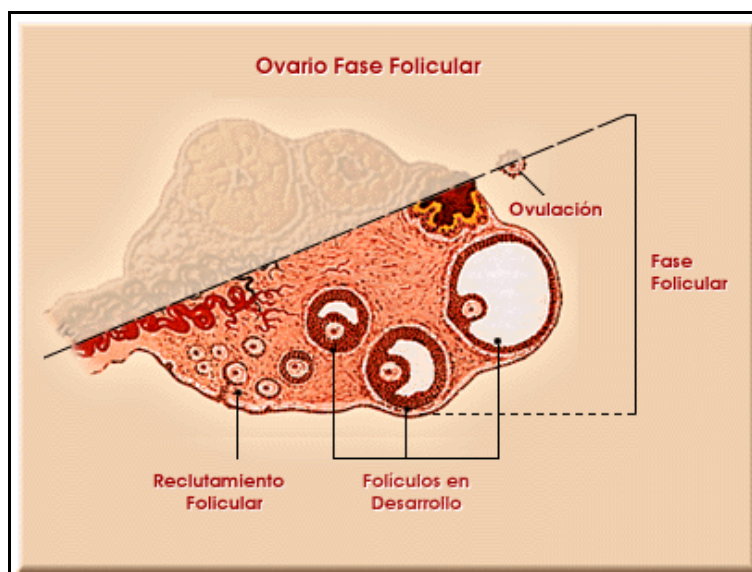


Figura H.8. Representación del ovario en fase folicular.

En el nacimiento, cada oocito se encuentra rodeado de una capa simple de células de la granulosa de origen epitelial; la estructura combinada recibe el nombre de folículos primordiales (Rankin *et al.*, 2000; Nilsson y Skinner, 2001; Epifano y Dean, 2002) (*Figura H.9.*). Sólo unos pocos folículos están destinados a la ovulación (Gosden y Telfer, 1987a;b). Estos folículos primordiales se encuentran en su mayor parte cerca de la periferia (corteza) del ovario, pero están separados unos de otros por tejido estromal (conjuntivo) y tejido intersticial. La mayor parte de ellos permanecen en un estado quiescente, que se puede mantener hasta la pubertad o la menopausia si no son seleccionados para el desarrollo y la diferenciación posterior. Existe una comunicación bidireccional entre el oocito y las células de la granulosa (Eppig, 2001). En el propio ovario embrionario los folículos primordiales inician la fase reductora de la meiosis, pero cuando se detiene la división meiótica en la profase tardía, los folículos y sus oocitos primarios pueden seguir con un aumento de tamaño notable (Picton, 2001). El desarrollo posterior de un folículo primordial requiere la transformación de las células foliculares epiteliales en una capa única de células cuboidales que recubren el oocito y esta estructura compuesta recibe el nombre de folículo primario (Matzuk, 2000).

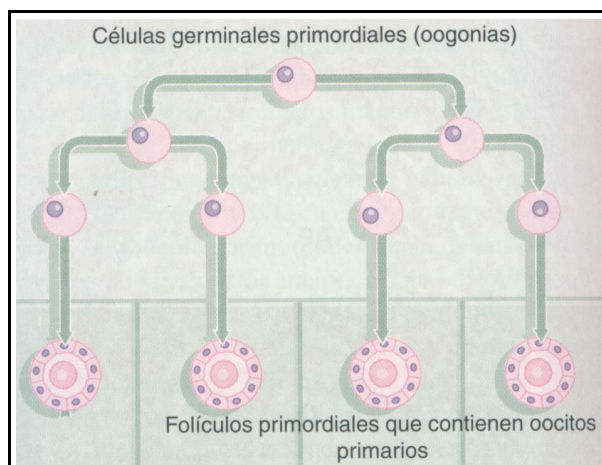


Figura H.9. Folículos primordiales en el nacimiento.

Bajo la estimulación endocrina, una vez en cada ciclo ovárico tras la pubertad, de seis a doce folículos primarios se convierten en folículos secundarios (*Figura H.10.a.*), lo que conlleva el aumento de tamaño del oocito y la proliferación en varias capas de las células de la granulosa que lo rodean. Durante la formación del folículo secundario, las células de la granulosa segregan un material mucoso que forma la zona pelúcida en torno al oocito (Rankin *et al.*, 2000); a continuación, las células de la granulosa desarrollan procesos citoplasmáticos que penetran en la zona pelúcida y establecen contacto con la membrana plasmática del oocito. A pesar de que varios folículos inician el desarrollo en cada ciclo menstrual, sólo uno alcanza la madurez, mientras que los demás, por causas que no están del todo esclarecidas, se convierten en atrésicos y desaparecen con el tiempo.

Las células de la granulosa de los folículos que experimentan el desarrollo completo hasta la maduración continúan incrementando su número. Al mismo tiempo, el tejido intersticial adyacente se organiza de forma concéntrica alrededor del folículo formando la teca (Gougeon, 1996). Las células de la teca adyacentes al folículo, la teca interna, son recubiertas con una capa adicional de células intersticiales, la teca externa, que se funde imperceptiblemente con el estroma ovárico. La teca interna permanece separada de las células de la granulosa por una lámina basal, y aunque la teca suele ser invadida por elementos vasculares ningún capilar penetra en la granulosa.

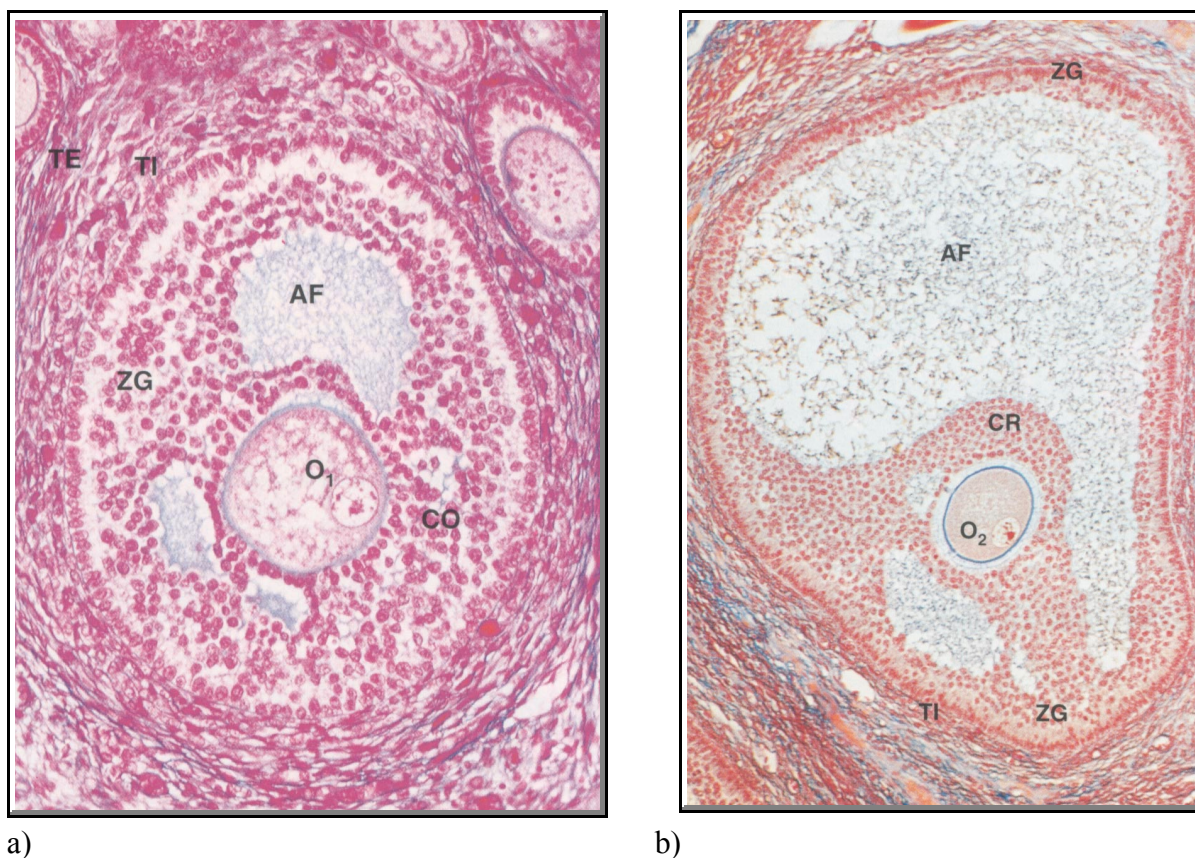


Figura H.10. a) Folículo 2º. b) Folículo de Graaf. AF: Antro folicular; CO: Cúmulo ovígero; CR: Corona radiada; O: Oocito; TE: Teca externa; TI: Teca interna; ZG: Zona granulosa.

La evolución continua de las células de la granulosa y la incorporación de las células intersticiales circundantes en la teca van acompañadas por acumulación de fluidos en los espacios o fisuras que se dan entre las células de la granulosa. A medida que el folículo crece se forma una sola vesícula o antro (Tamura *et al.*, 1992). Las células de la granulosa que permanecen unidas al óvulo son las células granulosas de la corona, mientras que las demás, que se encuentran en contacto con la teca, constituyen la membrana granulosa formando el cúmulo ovígero. Durante la ovulación esta conexión se corta y el óvulo es liberado con su capa de células de la granulosa, la corona radiada. El folículo completamente maduro se denomina folículo de Graaf (Figura H.10.b.).

El proceso de foliculogénesis también está controlado por factores de crecimiento secretados tanto por el propio oocito (Erickson y Shimasaki, 2000; Matzuk, 2000) como por las propias células de la granulosa (Erickson y Shimasaki, 2000).

Unos días antes de la ovulación, por mecanismos no totalmente aclarados, se produce un aumento en la secreción de LH (Hillier, 2001). La secreción de FSH también se va a duplicar produciéndose un pico preovulatorio de gonadotropinas regulado principalmente por el estradiol y la progesterona (Mahesh y Brann, 1998). Ambas hormonas van a provocar un aumento tal del folículo que terminará por abombar la pared externa, haciendo protusión en la superficie del ovario sobre la que aparecerá una zona avascular que terminará abriéndose gradualmente y expulsando el líquido folicular que arrastrará al óvulo rodeado de las células de la granulosa que forman el cúmulo ovígeno. En el plazo de pocas horas, van a ocurrir dos hechos trascendentes para la ovulación: La teca externa comenzará a liberar enzimas proteolíticos que disuelven la pared externa del folículo facilitando la rotura, y habrá un aumento de la vascularización hacia la pared folicular y liberación de prostaglandinas (Tsafriri y Reich, 1999). Ambos efectos producen edematización del folículo e hinchazón.

Aunque varios folículos pueden iniciar la maduración en cada ciclo ovárico, típicamente sólo uno mantiene su potencial gametogénico mientras que el resto se convierte en atrésicos (Amsterdam *et al.*, 1998; Driancourt, 2001). Cualquier folículo ovárico destinado a ovular se derivará de un grupo de folículos en crecimiento, que a su vez provendrá de un grupo de folículos primordiales que no se encontrarán proliferando y que se formaron durante el desarrollo fetal. Las gonadotropinas hipofisarias mantienen la progresión de la maduración folicular, y el 99.9 % de todos los folículos ováricos se pierde espontáneamente por atresia. Según las especies, unos pocos del grupo, o sólo uno, consiguen escapar a la atresia en los distintos estadios de la maduración llegando a convertirse en el óvulo fertilizable. Esta reducción sucesiva de los folículos potencialmente ovulables durante cada ciclo ovárico, hasta un número característico de la especie, sugiere que existe algún tipo de selección. Este proceso resulta particularmente evidente en los primates superiores, incluyendo a las mujeres, donde el proceso de foliculogénesis conducente a la producción de un gameto único en cada ciclo menstrual, es un proceso regulado con un alto nivel de precisión (Irianni y Hodgen, 1992).

Se cree que el folículo que alcanza la madurez y ovula es aquel en el que las células de la granulosa adquieren más rápidamente elevados niveles de aromatasa y de receptores de LH en respuesta a la elevación intercíclica de FSH, es decir, el que presenta un nivel mayor de sensibilidad a la FSH (Macklon y Fauser, 2001). Estudios tanto en primates (Zelevnik y Kubik, 1986) como en humanos (Fauser y Heusden, 1997), apuntan a que la concentración en plasma de FSH es esencial para la selección de un solo folículo que será el que ovule (Zelevnik, 2001). Durante la fase folicular media, este folículo incrementa la secreción de estradiol y el esteroide retroacciona regulando negativamente la secreción de FSH hipofisaria. Esto produce una

reducción progresiva de los niveles circulantes de FSH por lo que se limita el desarrollo del resto de los folículos que presentaban una sensibilidad menor para la hormona. De este modo sólo un folículo alcanza la madurez al estar protegido de la caída de los niveles de FSH por la respuesta, relativamente más elevada, de sus células de la granulosa a las gonadotropinas (Hillier, 1990).

A modo de conclusión se puede decir que se han propuesto seis funciones de los folículos ováricos (Irianni y Hodgen, 1992):

1. Proteger al oocito en su interior.
2. Madurar al oocito en el momento óptimo.
3. Producir el medio hormonal que asegure un endometrio adecuado.
4. Liberar el oocito exactamente a tiempo.
5. Asegurar su implantación.
6. Mantener las condiciones hormonales necesarias para la gestación hasta que el metabolismo fetoplacentario sea el adecuado.

Tras la rotura del folículo maduro y la liberación del óvulo durante la ovulación, el folículo se llena rápidamente de sangre, formando lo que se llama cuerpo hemorrágico. Las células de la granulosa y las teca proliferan inmediatamente y la sangre coagulada se absorbe, mientras que los elementos vasculares de la teca penetran en la granulosa. Las células de ésta última comienzan a captar grandes cantidades de colesterol; este proceso llamado luteinización, permite la formación del cuerpo lúteo (Rossmanith, 1993) (*Figura H.11.*). En algunas especies el cuerpo lúteo maduro parece contener varios tipos celulares. Algunas células derivadas de la teca interna emigran a las zonas derivadas de la granulosa del tejido luteal tras la ovulación y dan lugar a células luteales pequeñas, células luteínicas de la teca y fibroblastos. Las células luteales grandes parecen diferenciarse de la membrana granulosa. Aunque está aceptada la heterogeneidad de las células luteales, el origen definitivo de cada tipo celular y sus funciones individuales en el funcionamiento del cuerpo lúteo durante el embarazo no están completamente aclarados. Al final de la fase lútea, si no se produce fertilización, el cuerpo lúteo sufre regresión asociada con una disminución en la cantidad de progesterona en sangre (Johnson y Everitt, 1995).

Al igual que los testículos, los ovarios también tienen dos funciones distintas pero interrelacionadas: la gametogénesis y la hormonogénesis. En esta memoria nos vamos a centrar en la segunda de estas funciones.

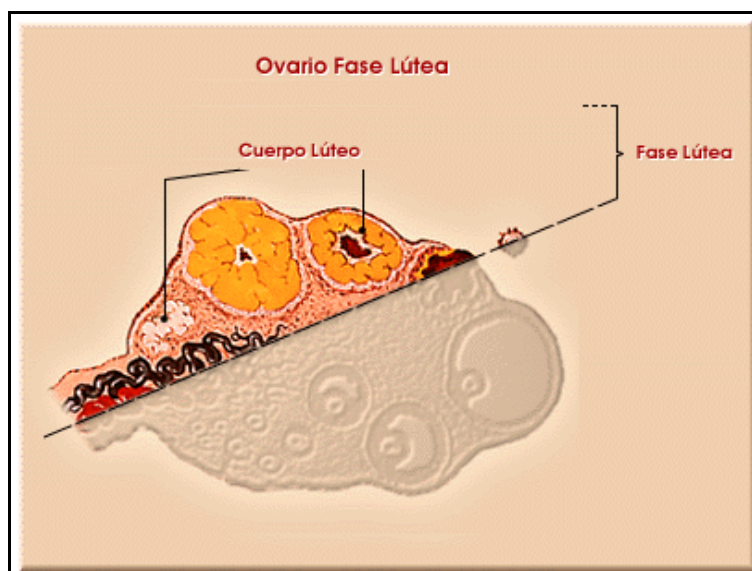


Figura H.11. Ovario en fase lútea.

2.2.3. HORMONAS ESTEROIDES OVÁRICAS.

El folículo ovárico es la fuente de tres tipos de hormonas esteroideas: progestágenos, andrógenos y estrógenos. La cantidad relativa de cada tipo varía a lo largo del ciclo ovárico y, particularmente durante la gestación. En la fase folicular del ciclo ovárico la hormona dominante segregada por el ovario, es el estradiol, mientras que durante la fase luteínica y durante el embarazo la hormona dominante es la progesterona.

2.2.3.1. Síntesis de estrógenos.

Bajo la estimulación de LH (Erickson y Shimasaki, 2001), las células de la teca producen andrógenos que son transportados a las células de la granulosa donde, bajo el control de la FSH cuyos receptores sólo se encuentran en estas células (Simoni *et al.*, 1997; Findlay y Drummond, 1999), son aromatizados a estrógenos (Dorrington y Armstrong, 1979; Richards, 1994; Filicori y Cognigni, 2001). Esta teoría, llamada *teoría de las dos células* (Figura H.12.), se apoya en el hecho de que las células de la granulosa de varias especies, las cuales poseen toda la maquinaria bioquímica para la esteroidogénesis (Yong *et al.*, 1994; de Moura *et al.*, 1997; Flores *et al.*, 1999;

Silva y Price, 2000; Howles, 2000), segregan estrógenos si se les proporciona un sustrato de andrógeno (Adashi, 1996; Bonser *et al.*, 2000), y en que, además, las células de la teca producen grandes cantidades de andrógenos (Hansel y Fortune, 1978; Dieleman *et al.*, 1983). Por otro lado, las células de la granulosa tienen poca o nula capacidad para producir andrógenos C-19 a partir de esteroides C-21 pero, sin embargo, tienen un sistema aromatasa activo. Existen pruebas de que, a medida que avanza la maduración folicular, la capacidad de aromatización de andrógenos de las células de la granulosa se incrementa también. La secreción de estrógenos por parte del folículo aumenta durante la fase preovulatoria, y alcanza su máximo en el momento del pico de LH/FSH. Antes de la exposición a niveles muy altos de LH, predominan los estrógenos y los andrógenos; tras la exposición al pico de LH y durante toda la fase luteal del ciclo la progesterona es el principal esteroide producido. Un sistema complejo de interacciones que involucra a las gonadotropinas, estrógenos, andrógenos y progesterona, está sin duda, en la base del cambio de síntesis de estrógenos a progesterona (Simone y Mahesh, 1993).

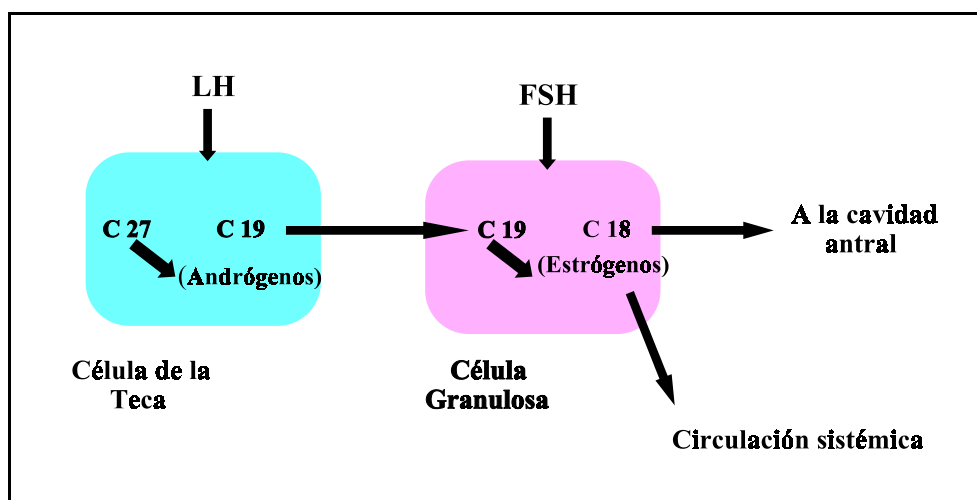


Figura H.12. Teoría de las dos células.

Una versión modificada de la teoría de las dos células sugiere que la LH estimula la producción de andrógenos en las células teca, parte de los andrógenos producidos se aromatizarán en las propias células de la teca, mientras que otra parte pasaría a la granulosa para su aromatización a estrógenos. En este caso, los estrógenos producidos en las células de la teca constituirían el origen principal de los estrógenos circulantes, mientras que los sintetizados en la granulosa tendrían una acción local, posiblemente relacionada con la maduración del óvulo. Las células de la granulosa están reguladas a través de la producción del AMP_c al ser estimuladas por la FSH y la inducción y activación posterior del sistema de aromatasa.

El estradiol se oxida a estrona en el hígado, que puede ser posteriormente hidratada a estriol (Figura H.13.). Estos tres estrógenos aparecen después en la orina como glucoronidos o sulfatos. Durante el embarazo la placenta es una fuente adicional de estrógenos. De hecho, la formación de estos esteroides no se limita a la placenta, ovarios o adrenales, sino que se ha visto que algunos tejidos periféricos como el tejido adiposo, son capaces de producir cantidades significativas de estrógenos a partir de esteroides precursores (MacDonald *et al.*, 1967;1978; Ackerman *et al.*, 1981; Nelson y Bulun, 2001; Bulun *et al.*, 2002). La aromatización de androstenediona y de testosterona en los tejidos es la fuente principal de estrógenos en hombres y en mujeres postmenopáusicas.

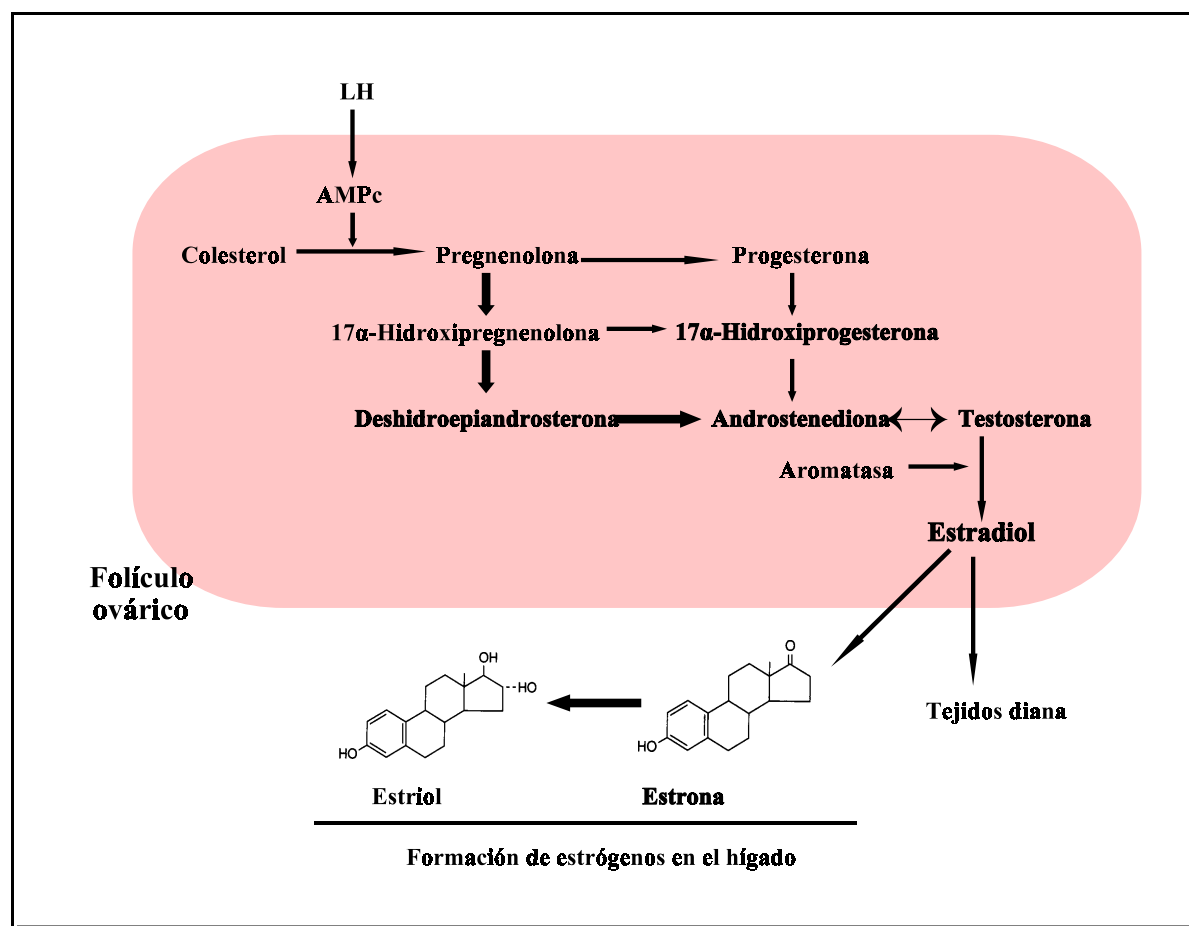


Figura H.13. Biosíntesis y metabolismo del estradiol.

2.2.3.2. Síntesis de progesterona.

El crecimiento de los folículos preovulatorios en el ovario depende de que ambas gonadotropinas actúen a la vez. La FSH promueve el crecimiento folicular (Erickson y Shimasaki, 2001) actuando sobre las células de la granulosa y estimulando el sistema aromatasas que se necesita para convertir los andrógenos en estrógenos; esta acción de la FSH se encuentra reforzada inicialmente por los andrógenos, que han sido producidos por las células de la teca bajo el control de la LH (Filicori y Cognigni, 2001). Mientras que los receptores para la FSH están presentes solamente en las células de la granulosa, y los de LH se encuentran inicialmente sólo en las células de la teca, en los últimos estadios del desarrollo preovulatorio estos últimos aparecen en las células de la granulosa (Schipper *et al.*, 1993) y probablemente se acoplan al mismo sistema de segundo mensajero que los de FSH. Durante el pico de gonadotropinas preovulatorio, la LH actuando directamente sobre las células de la granulosa inicia la luteinización, dando como resultado una reducción o la abolición de la actividad del sistema aromatasas (Fortune y Vicent, 1983; Billig *et al.*, 1993; Gore-Langton y Armstrong, 1994; Greenwald y Roy, 1994; Erickson, 1995; Kaipia y Hsueh, 1997), dependiendo de las especies, y la activación de la síntesis y secreción de progesterona (Cigliano *et al.*, 2001), con lo que las células de granulosa luteinizadas forman el cuerpo lúteo (Richards y Hedin, 1988).

La síntesis de progesterona es uno de los primeros pasos en la síntesis de andrógenos y estrógenos en el interior de las células de la teca. Sin embargo, la producción de progesterona por estas células no está considerada como importante en el mantenimiento de los niveles circulantes de la hormona, sino que el cuerpo lúteo es el origen principal de los niveles de progesterona circulante (Chabbert-Buffet *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001). Durante la fase folicular, estas células que no poseen el retículo endoplasmático liso característico de las células secretoras de esteroides, pueden usar un sustrato androgénico para su aromatización a estrógeno, como ya se ha comentado. En algunas especies, se inicia la biosíntesis de progesterona en las células de la granulosa inmediatamente antes del pico de LH/FSH. El hecho de que estas células se luteinicen espontáneamente en cultivos *in vitro*, pero sean incapaces de hacerlo en presencia de fluido de folículos inmaduros, sugiere que en este fluido puede encontrarse algún inhibidor de la luteinización, que funcionaría impidiendo la secreción prematura de las células de la granulosa. Las células luteinizadas contienen grandes cantidades de colesterol y se ha demostrado que estas células en la rata, emplean preferentemente, y dependen casi exclusivamente, de los complejos plasmáticos de lipoproteínas de baja densidad. Las células luteales son la fuente principal de progesterona circulante tras el proceso de luteinización.

2.2.3.3. Síntesis de andrógenos.

Con el inicio de la síntesis de estrógenos en la pubertad, los ovarios segregan también androstenediona y testosterona, precursores de los estrógenos (Simone y Mahesh, 1993). El desarrollo de los caracteres sexuales secundarios durante el proceso puberal parece depender casi completamente de la acción de los estrógenos.

2.2.4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES OVÁRICAS.

Los esteroides ováricos, estradiol y progesterona, regulan todos los aspectos de la reproducción en hembras, desde el comportamiento sexual, hasta el embarazo y la lactancia. Estas hormonas actúan principalmente regulando la transcripción de algunos genes diana. Esta actividad transcripcional está mediada por receptores específicos nucleares (O'Malley y Tsai, 1992). Estos receptores nucleares son factores de transcripción cuya actividad está regulada por la unión de esteroides específicos. La señal por estrógenos está mediado por uno de los dos receptores para estrógenos, ER α y ER β (Enmark y Gustafsson, 1999). La señal por progesterona está mediado por su receptor PR, el cual posee dos isoformas (PRA y PRB) (Lydon *et al.*, 1996). Los receptores nucleares representan una gran familia de factores de transcripción. Estos factores comparten una estructura similar (Evans, 1988; Tsai y O'Malley, 1994; Ribeiro *et al.*, 1995; Mangelsdorf *et al.*, 1995; Perlmann y Evans, 1997; Parker, 1998). Al igual que se vio para el receptor de andrógenos, los receptores para esteroides ováricos tienen tres dominios funcionales principales: el dominio de unión al ligando (LBD), localizado en el extremo carboxi-terminal, el dominio de unión al ADN (DBD), y el dominio de activación (AF) (deMayo *et al.*, 2002).

El mecanismo molecular por el que las hormonas esteroideas ováricas regulan la transcripción de genes a través de sus receptores ha sido activamente investigado en los últimos 30 años (O'Malley y Tsai, 1992; Tsai y O'Malley, 1994; Parker, 1998). En ausencia de ligando, el receptor está asociado a chaperones, y es transcripcionalmente inactivo. Estos receptores pueden ser activados por dos mecanismos: el primero, el tradicional ligando-dependiente, mediante el cual los receptores pueden ser activados mediante la unión de la hormona al ligando (LBD). El segundo mecanismo por el que el receptor puede ser activado es a través de un mecanismo ligando-independiente (Power *et al.*, 1991;1992). Una vez activado el receptor, éste sufre un cambio conformacional que da lugar a la dimerización del receptor, así, el receptor es capaz de unirse al ADN, y con ayuda de coactivadores, provocar la transcripción. Estos coactivadores además de unir el receptor con la maquinaria transcripcional de la célula, facilitan la transcripción mediante modificaciones de la estructura de la cromatina, permitiendo una mayor accesibilidad del promotor del gen diana al receptor y a la maquinaria transcripcional (deMayo *et al.*, 2002).

2.2.5. CICLO REPRODUCTOR.

Las hembras de muchas especies de vertebrados se encuentran sujetas a cambios cíclicos en su actividad reproductora (Bennett, 1991). En la mayoría de los mamíferos no primates las hembras experimentan periodos recurrentes de excitación sexual o estro, durante los cuales son fisiológicamente y psicológicamente receptivas al macho. Por tanto, se puede definir el ciclo sexual o estral como el intervalo entre dos celos y por consiguiente entre dos ovulaciones.

La duración y evolución del ciclo estral difiere notablemente de una especie a otra en los animales domésticos. En cualquier caso se acostumbra a dividirlo en cuatro fases:

1. Proestro: Es un periodo en el que se desarrollan en el ovario uno o varios folículos y aparece una secreción creciente de estrógenos.
2. Estro o celo: se corresponde con la maduración y dehiscencia del folículo así como con la máxima secreción de estrógenos. La duración del celo y el momento en que se produce la ovulación difiere según las distintas especies. En el ratón, el estro tiene una duración aproximada de 10 horas y la ovulación se produce 2-3 horas después de iniciarse el estro.
3. Metaestro o fase luteínica: Después de la ovulación se desarrolla el cuerpo lúteo a partir de los restos del folículo roto, alcanzando posteriormente la categoría de glándula endocrina en funcionamiento. Sin embargo, su futuro está condicionado por el óvulo, si el óvulo es fecundado y se desarrolla el embrión, el cuerpo lúteo mantiene su actividad e impide la maduración de nuevos folículos. Si no ha habido fecundación, el cuerpo amarillo se retrae.
4. Diestro o regresión del cuerpo lúteo. Corresponde a la vuelta a la normalidad del aparato genital en el caso de no existir fecundación.

El ciclo estral de los ratones tiene una duración aproximada de 4 días.

A lo largo del ciclo sexual se observan modificaciones estructurales y fisiológicas en todos los órganos del aparato genital femenino. La relación estrecha entre todas estas estructuras se lleva a cabo mediante control neurohormonal. Así, el hipotálamo produce GnRH que actúa directamente sobre la hipófisis anterior que libera gonadotropinas (FSH y LH) (Kraus *et al.*, 2001; Shacham *et al.*, 2001). Descargas puntuales de FSH y el incremento de pulsos de LH actúan a nivel folicular provocando la maduración de un folículo, el cual incrementa su capacidad de síntesis y secreción de estradiol (Erickson y Shimasaki, 2001). A través del hipotálamo se establece un sistema de retroalimentación positivo entre el estradiol y LH, respondiendo ambos con mayores pulsos a medida que el folículo va alcanzando su estadio preovulatorio de LH, de gran concentración y corta duración que se ubica aproximadamente al comienzo del celo.

La acción de la LH sobre el folículo preovulatorio provoca la descarga y la formación del cuerpo lúteo, a partir de las células de la teca y la granulosa se segrega progesterona y provoca por una retroalimentación negativa un bloqueo de la secreción de FSH y LH manteniéndose el resto del ciclo en un nivel basal. Si tras la ovulación no se produce gestación, se segrega a nivel del útero una hormona denominada prostaglandina $F_{2\alpha}$ que provoca la lisis del cuerpo lúteo (Hoyer, 1998), con lo que los niveles de progesterona disminuyen a niveles basales y por tanto se produce un desbloqueo hipotalámico y la consiguiente reanudación del ciclo (*Figura H.14.*).

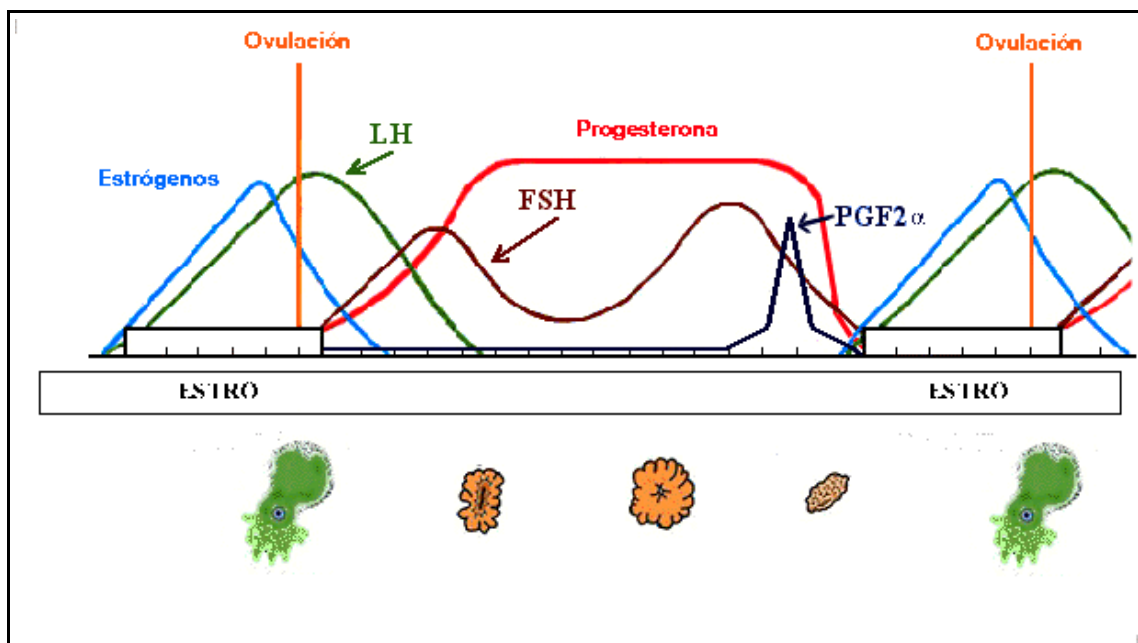


Figura H.14. Variaciones hormonales durante el ciclo del estro.

3. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GLÁNDULAS ADRENALES.

3.1. Introducción.

El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) integra los sistemas endocrino, nervioso e inmune (Ferrari *et al.*, 2001), y como su nombre indica, consiste en un bucle de retroalimentación que incluye al hipotálamo, la hipófisis y las glándulas adrenales (*Figura E.1.*). Además de estas estructuras, el eje recibe regulación importante desde el hipocampo, la amígdala, núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) y el núcleo paraventricular (PVN) (Varghese y Brown, 2001).

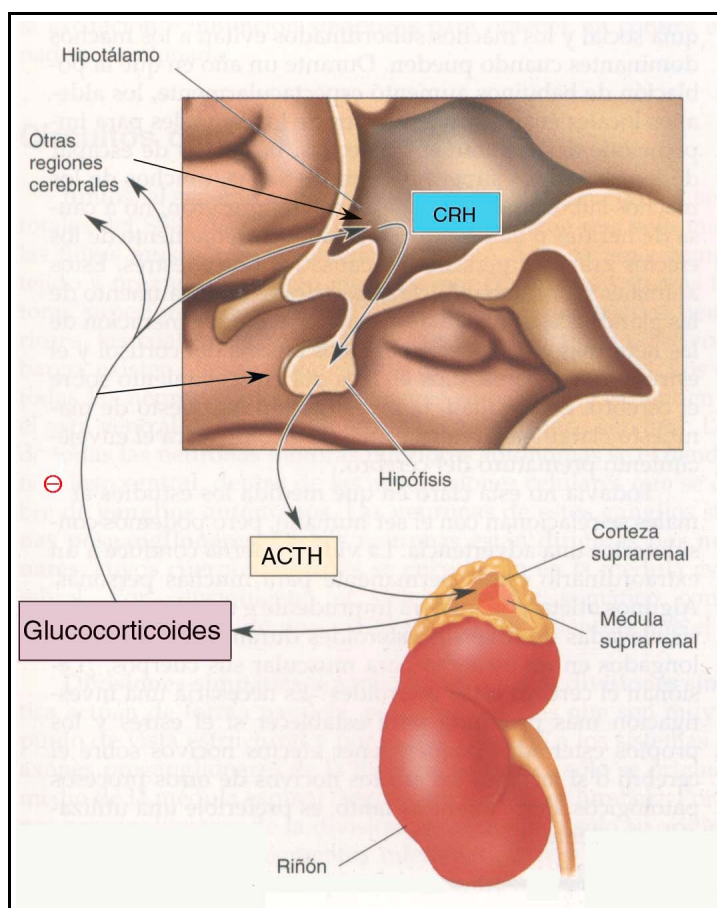


Figura E.1. Esquema del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

El eje HHA es sensible a factores estresantes tanto físicos como emocionales (McCormick *et al.*, 1998). Los principales reguladores del eje HHA son la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina-vasopresina (AVP), secretados por las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo hacia el sistema porta-hipofisario (Owens y Nemeroff, 1988). La CRH, también llamada factor liberador de corticotropina, es un péptido de 41 aminoácidos distribuido en diferentes localizaciones del sistema nervioso central. Es considerado como el regulador primario de la respuesta al estrés en mamíferos (Coplan *et al.*, 1996). Su expresión es autocontrolada y regulada por un mecanismo de retroalimentación positiva ultracorta (McCann *et al.*, 2000). La CRH y la AVP actúan sinérgicamente sobre la hipófisis anterior favoreciendo e incrementando la liberación de adrenocorticotropina (ACTH) (Scott y Dinan, 2002). Esta hormona es transportada por la sangre hasta la corteza adrenal e interactúa con receptores de células adrenocorticales que estimulan la producción y liberación de glucocorticoides (cortisol y corticosterona). Bajo ciertas condiciones, la liberación de ACTH también puede verse incrementada por la oxitocina (McCann *et al.*, 2000). Los glucocorticoides actúan por un proceso de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la hipófisis (McCann *et al.*, 2000).

3.1.1. EL EJE HHA Y EL SISTEMA REPRODUCTOR.

Existen diferencias sexuales en el eje HHA (Canny *et al.*, 1999) a diferentes niveles. Así, se han encontrado diferencias sexuales a nivel de los receptores I y II de glucocorticoides en el hipotálamo e hipocampo (Turner y Weaver, 1985; Carey *et al.*, 1995; MacLusky *et al.*, 1996); en la expresión de la CRH y de la AVP en el hipotálamo (Vamvakopoulos y Chrousos 1993; Paulmyer-Lacroix *et al.*, 1996; Viau y Meaney, 1996), en la secreción de ACTH en la hipófisis anterior (Critchlow *et al.*, 1963; Gallucci *et al.*, 1993; McCormick *et al.*, 1998), y en el potencial esteroidogénico de las glándulas adrenales (Kitay, 1961; Gaskin y Kitay, 1970; Roelfsma *et al.*, 1993; El-Migdadi *et al.*, 1995). Se cree que estas diferencias entre machos y hembras, son reflejo de los efectos diferenciales de los esteroides sexuales sobre el eje HHA, ya que la actividad de muchas proteínas que regulan en eje, están directamente reguladas por los esteroides sexuales, habiéndose descrito la existencia de receptores de estos esteroides en muchos niveles del eje (Hirst *et al.*, 1992; Herbison, 1995; Bethea *et al.*, 1996; Madigou *et al.*, 1996). Además, la interacción entre los ejes gonadal y adrenal es en gran parte debida a los efectos interactivos de los esteroides sexuales y glucocorticoides, explicando de este modo por qué varias enfermedades ligadas al estrés son dependientes del sexo (Viau, 2002).

Varios componentes del eje HHA ejercen efectos inhibitorios en el sistema reproductor femenino (Magiakou *et al.*, 1997; Chrousos *et al.*, 1998) y masculino (Berga, 1997). Estos efectos incluyen la inhibición de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) (Petraglia *et al.*, 1987), y de LH (Gindoff y Ferin, 1987) por la CRH, la vasopresina (Heisler *et al.*, 1994) y los glucocorticoides (Dubey y Plant, 1985) y la secreción de LH inducida por LHRH a través de los glucocorticoides (Rosen *et al.*, 1988). También se han observado inhibición en la producción de

esteroides gonadales por la CRH y los glucocorticoides (Welsh *et al.*, 1982; Calogero *et al.*, 1996), y un descenso de la sensibilidad gonadal a la LH inducida por la ACTH (Mann *et al.*, 1987). Las neuronas hipotalámicas liberadoras de CRH inervan e inhiben directa o indirectamente, a través de las neuronas proopiomelanocorticotropas, el centro controlador hipotalámico del eje gonadal (Rivest y Rivier, 1995). Además, los glucocorticoides secretados por la corteza adrenal, actúan a nivel del hipotálamo, de la hipófisis, de las gónadas, y de otros tejidos diana que suprimen el eje gonadal (*Figura E.2.*).

Los estrógenos ováricos activan al eje HHA (Handa *et al.*, 1994; Young, 1995), mientras que por el contrario, los andrógenos tienen efectos inhibitorios (McCormick *et al.*, 1998).

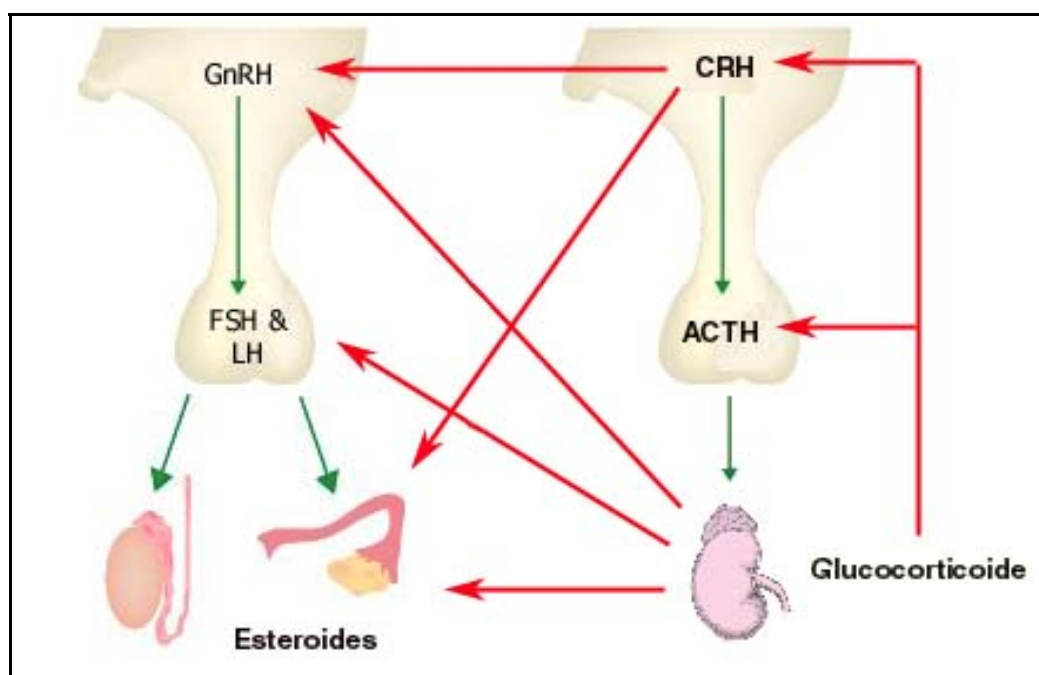


Figura E.2. Influencia del eje HHA sobre el eje gonadal.

3.1.2. EL EJE HHA COMO REGULADOR DE LA PRESIÓN SANGUÍNEA.

Es bien conocido que el eje HHA desempeña una función importante en la regulación de la presión sanguínea (Rosmond y Bjorntorp, 1998). El mantenimiento de la función cardiovascular así como de la homeostasis de fluidos requiere mecanismos que regulen la cantidad de agua y sodio en el organismo y su distribución. La mayoría de estos mecanismos están mediados por el eje HHA. La hiperactividad del eje HHA incrementa la presión sanguínea, así, como hemos visto anteriormente, la CRH y la AVP dan lugar a un incremento en la ACTH (Whitnall, 1993), y esta a su vez, a un aumento en la liberación de glucocorticoides y probablemente de aldosterona (Lumbers, 1999), lo cual provoca un aumento en la presión sanguínea (Watt *et al.*, 1992; Filipovsky *et al.*, 1996; Stolk *et al.*, 1996; Walker *et al.*, 1998; Kelly *et al.*, 1998; Fraser *et al.*, 1999; Reynolds *et al.*, 2001).

El sistema renina-angiotensina (SRA) está involucrado en la regulación de la presión sanguínea y en la homeostasis de fluidos. Las neuronas liberadoras de Ang II del hipotálamo podrían jugar un papel importante ya que este péptido está presente en la sangre portal y tiene capacidad intrínseca de estimular a las neuronas corticotropas (Franci *et al.*, 1997). Así la administración in vivo de Ang II actúa estimulando la secreción de CRH (Ganong y Murakami, 1987). También existen receptores para estos péptidos en las células de la hipófisis. La Ang II es una hormona importante que se libera cuando existe una disminución en el volumen de sangre circulante y esto está asociado con la liberación de ACTH (Franci *et al.*, 1997). En cambio, el péptido natriurético atrial (ANP) tiene efectos contrarios liberándose en casos de expansión del volumen y causando diuresis y natriuresis (Franci *et al.*, 1997; Gutkowska *et al.*, 1997). Otro péptido efector del SRA es la angiotensina III (Ang III), la cual posee la mayoría de las propiedades de la Ang II y comparte los mismos receptores. Este péptido es particularmente importante en el cerebro y especialmente en la hipófisis desempeñando un papel importante en la secreción de AVP (Ardaillou, 1997), implicada también en la regulación de la presión sanguínea (Szczepanska-Sadowska, 1996).

Los efectos anteriormente descritos de los esteroides sexuales sobre el eje HHA, podrían explicar las diferencias que muestran machos y hembras en cuanto a su presión sanguínea tanto en humanos como en animales (Masubuchi *et al.*, 1982; Chen y Meng, 1991; Ashton y Balment, 1991; Rowland y Fregly, 1992).

3.1.3. EL EJE HHA Y LAS ENCEFALINAS.

Los péptidos opioides han estado implicadas en un amplio rango de procesos fisiológicos, pero es su papel en el comportamiento, la neuroendocrinología y en la transmisión del dolor donde está mejor documentado (Hertz, 1993; De Gandarias *et al.*, 1997). El sistema de péptidos opioides participan en la mediación, modulación y regulación de la respuesta al estrés a través del eje HHA (Drolet *et al.*, 2001; Coventry *et al.*, 2001).

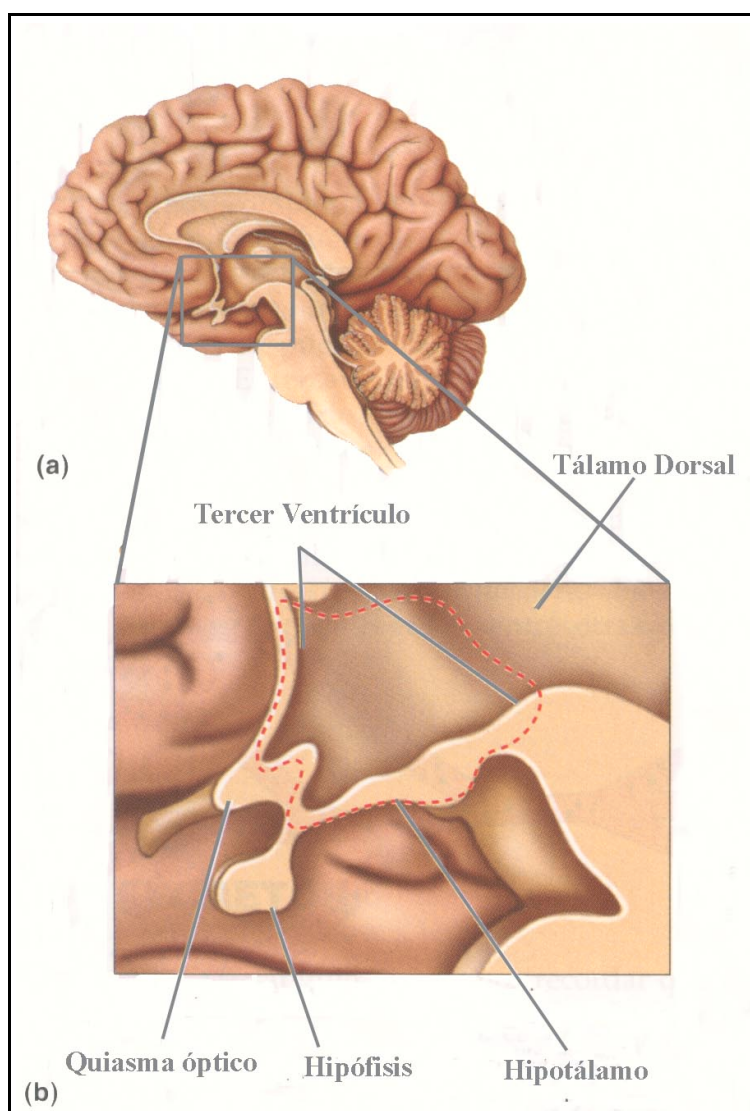
Las ENKs y sus receptores podrían ejercer su acción en el eje HHA y en el sistema nervioso autónomo, dos de los principales sistemas que mantienen la homeostasis durante la exposición a agentes estresantes (Howlett y Rees, 1986; Szekely, 1990; Katoh *et al.*, 1990; Przewlocki *et al.*, 1991; Katoh *et al.*, 1992; Pechnick, 1993). Las ENKs y otros opioides son capaces de modificar la síntesis y liberación de agentes de liberación hipotalámicos como la CRH (Szekely, 1990; Borsook e Hyman, 1995). Existe un papel importante de las ENKs en la regulación neuroendocrina, y particularmente a nivel del núcleo paraventricular del hipotálamo, siendo este un importante centro de regulación y coordinación de la respuesta al estrés, ya que libera la CRH que a su vez libera ACTH en la hipófisis anterior (Swanson *et al.*, 1986; Sawchenko, 1986; Palkovits, 1987; Swanson *et al.*, 1987; Sawchenko *et al.*, 1993). El núcleo paraventricular también recibe aferencias del comportamiento, emociones y del sistema cardiovascular (Sawchenko, 1986; Swanson *et al.*, 1986; Beaulieu *et al.*, 1987; Palkovits, 1987; Swanson *et al.*, 1987; Cunningham y Sawchenko, 1988; Cunningham *et al.*, 1990; Sawchenko *et al.*, 1993).

Existen evidencias que demuestran que la respuesta neuroendocrina al estrés es diferente dependiendo del sexo, y por tanto depende de la presencia de esteroides gonadales (Burgess y Handa, 1992; Viau, 2002). Así por ejemplo, el sistema de ENK de la hipófisis anterior está regulada por estrógenos circulantes. La ovariectomía causa un aumento en el contenido de ENK, y este aumento se previene mediante el tratamiento con estrógenos. La administración de estrógenos disminuye el contenido de ENK en la hipófisis anterior de ratas macho normales (Hong *et al.*, 1985).

3.2. Hipotálamo.

El hipotálamo es la parte basal del diencefalo que se sitúa por debajo del tálamo, como su nombre indica (Swaab *et al.*, 1993). El hipotálamo forma las paredes y la parte inferior del tercer ventrículo cerebral, y está estrechamente conectado con la hipófisis por medio del sistema porta hipofisario (*Figura E.3.*).

Figura E.3. Localización del hipotálamo y la hipófisis. a) corte sagital medio. b) Obsérvese que el hipotálamo forma la pared del tercer ventrículo y se localiza debajo del tálamo dorsal. La línea de puntos indica el límite aproximado del hipotálamo.



El hipotálamo endocrino está compuesto por neuronas neurosecretoras cuya actividad secretora proporciona las neurohormonas (factores hipofisotrópicos) que regulan la función adenohipofisaria (Childs *et al.*, 1991). Estas neuronas son los elementos del sistema neurosecretor parvocelular y se distinguen del sistema magnocelular de neuronas neurosecretoras que componen las neuronas supraópticas y paraventriculares que sintetizan oxitocina y vasopresina. Las neuronas del sistema neurosecretor parvocelular convergen hacia el tallo hipofisario para formar el tracto tuberoinfundibular. Estas neuronas terminan sobre el endotelio del plexo primario del sistema porta de la eminencia media. Los métodos inmunocitoquímicos han demostrado factores hipofisiotrópicos (hipofisotropinas) en el interior de estas neuronas (Liposits, 1993). Los estudios de microscopía electrónica proporcionan pruebas de que estas células liberan sus mensajeros químicos en el sistema porta hipofisario.

El hipotálamo endocrino está conectado al resto del sistema nervioso central mediante contactos sinápticos con otros elementos neuronales. El flujo de información de otros centros del cerebro sufre un relevo en las neuronas parvocelulares hipotalámicas, que, a su vez, secretan sus hipofisotropinas en los vasos portales hipofisarios de la eminencia media. Por tanto, la eminencia media, puede ser considerada el punto final de convergencia del SNC sobre el sistema endocrino periférico, además de que constituye el puente tanto estructural como funcional entre hipotálamo e hipófisis, con lo que la eminencia media se considera también importante en los procesos regulatorios neuroendocrinos (Kiss, 1997). El sistema porta-hipofisario proporciona una unión vascular restringida entre las células neurosecretoras del hipotálamo y la glándula hipofisaria anterior.

La prueba más sólida de que el hipotálamo libera realmente hormonas en el sistema porta hipofisario para regular la función hipofisaria sería la demostración de que tales hormonas se encuentran en los vasos portales en concentraciones superiores a las de la circulación sistémica. La utilización de métodos que incluyen la encanulación del sistema porta hipofisario y la recolección selectiva de sangre portal han verificado esta tesis (Porter *et al.*, 1970;1980; Paradisi *et al.*, 1993). Se ha demostrado que todas las hipofisotropinas están en la sangre portal; la concentración de estas hormonas se ve aumentada después de la estimulación de ciertos lugares hipotalámicos. Además la perfusión de hipofisotropinas mediante encanulación portal induce la secreción de hormonas hipofisarias.

3.2.1. HORMONAS HIPOFISOTRÓPICAS.

Los factores estimuladores e inhibidores de origen hipotalámico están implicados en el control de la secreción de hormonas hipofisarias (Schwartz y Cherny, 1992). Se tienen claras evidencias de la existencia de una hormona liberadora de gonadotropinas, una hormona liberadora de tirotrópina y una hormona liberadora de corticotropina. De todas estas hormonas, en la presente memoria nos vamos a centrar en la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

y la hormona liberadora de tirotropina (TRH) puesto que son susceptibles de ser hidrolizadas por aminopeptidasas.

3.2.1.1. Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).

Una gran cantidad de resultados experimentales establecieron que el hipotálamo regula la secreción de gonadotropinas (McCann *et al.*, 1960; Conn y Crowley, 1991). Finalmente se vio la implicación de la GnRH, sintetizada por neuronas del hipotálamo (Silverman *et al.*, 1987), en la secreción de las gonadotropinas. La GnRH, hormona liberadora de gonadotropinas o también conocida como hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), estimula la liberación de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo estimulante (FSH) por la hipófisis anterior (Everett, 1994). La estructura de este decapeptido (*Figura E.4.*) fue determinada en 1971, en los laboratorios de Guillemin (Amoss *et al.*, 1971) y Schally (Schally *et al.*, 1971; Matsuo *et al.*, 1971), y el gen para su propéptido fue secuenciado por Seeburg y Adelman en 1984 (ver también Seeburg *et al.*, 1987). La mayoría de estas neuronas se proyectan hacia la eminencia media y terminan alrededor de los capilares de la circulación portal hipofisaria (Silverman *et al.*, 1987; Merchenthaler *et al.*, 1989). La GnRH es liberada a la sangre portal hipofisaria y llega a la hipófisis anterior, donde se une a receptores acoplados a la proteína G para estimular la liberación de gonadotropinas (Schally *et al.*, 1971; Conn, 1994; Stojilkovic *et al.*, 1994; Kasier *et al.*, 1997). La estructura primaria de la GnRH parece ser similar entre especies de mamíferos.

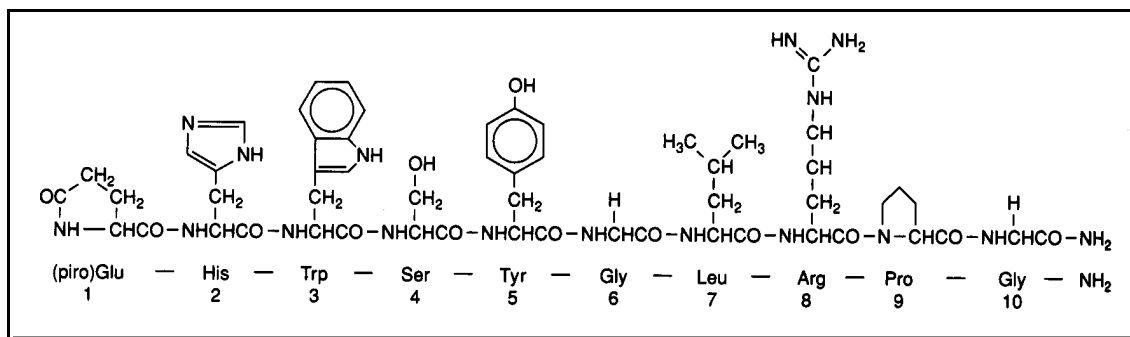


Figura E.4. Estructura primaria de la hormona liberadora de gonadotropina de mamífero (GnRH).

El papel de la GnRH en el control de la secreción de gonadotropinas por la hipófisis se confirmó mediante la utilización de técnicas de inmunización. Las inyecciones de anticuerpos para la GnRH iban seguidas por la atrofia testicular en machos. De forma similar, cuando se inyectaba antisero de GnRH por la mañana en ratas hembra en proestro, el pico de liberación de LH que normalmente ocurre durante la tarde no tenía lugar y se impedía la ovulación.

Además, la administración de suero anti-GnRH a ratas normales o castradas disminuye los niveles de LH y FSH, revelando, de esta forma, el papel central de la hipofisotropina en el mantenimiento de la secreción de las dos gonadotropinas. Uno de los modos en los que actúa la GnRH para la liberación de gonadotropinas es a través de la regulación de la transcripción de los genes de dichas gonadotropinas (Dalkin *et al.*, 2001).

La liberación de GnRH a la sangre portal ocurre de modo pulsátil (Dierschke *et al.*, 1970; Carmel *et al.*, 1976; Eskay *et al.*, 1977; Neill *et al.*, 1977; Sherwood y Fink, 1980; Ramírez y Dluzen, 1987; Tse e Hille, 1992) uniéndose a sus receptores en las gonadotropas hipofisarias y regulando la liberación de LH y FSH, así como otros aspectos de la función de las células gonadotropas incluyendo, significativamente, la regulación positiva de sus propios receptores (Conn *et al.*, 1987a,b). La generación de pulsos puede funcionar autónomamente, pero, normalmente, está modulada por esteroides ováricos, neuropéptidos y neurotransmisores. La administración constante de esta hormona puede dar lugar a una desensibilización o regulación “decreciente” de los procesos responsables de la liberación de gonadotropinas (Ortmann y Diedrich, 1999).

La GnRH se une a un receptor acoplado a proteína G, que activa a la fosfolipasa C. Esta enzima da lugar a varios segundos mensajeros. Entre estos se encuentran el diacilglicerol (DG) y el inositol 1,4,5-tri-fosfato (IP₃). El DG da lugar a la activación de la proteína cinasa C y el IP₃ libera Ca²⁺ desde el retículo endoplasmático. Ambos eventos dan lugar a la síntesis y secreción de LH y FSH (Ortmann y Diedrich, 1999).

Las células gonadotropas incluyen un 60% de células multihormonales (liberan tanto FSH como LH), y un 18% y 22% de células que contienen sólo LH y FSH respectivamente (Shacham *et al.*, 2001). Como hemos señalado, la LH y FSH se pueden sintetizar en la misma célula gonadótropa tras la estimulación con GnRH y la modulación por hormonas gonadales. La capacidad de sintetizar y secretar preferentemente una gonadotropina difiere en las gonadótropas de diferentes tamaños y puede ser alterada por la estimulación previa o por el cebado, de modo que aunque ambas gonadotropinas pueden estar en la misma célula, existe una regulación divergente en la síntesis y secreción de LH y FSH (Leung *et al.*, 1988). Por ejemplo, la síntesis de FSH está regulada, además de por esteroides sexuales, por activina, inhibina y folistatina (Dalkin *et al.*, 1989; Dalkin *et al.*, 1990; Besecke *et al.*, 1996; Kretser y Phillips, 1998). La frecuencia de la estimulación por GnRH puede ser el mayor factor regulador de las proporciones relativas de FSH y LH sintetizadas y secretadas, de forma que los pulsos menos frecuentes de GnRH conducen a la secreción preferencial de FSH y los pulsos más frecuentes a la secreción de LH (Jayes *et al.*, 1997). Dentro de la gonadótropa, la velocidad a la que se sintetizan las subunidades α y β está regulada por la cantidad de RNAm traducible y la cantidad real de RNAm de la subunidad β puede ser la etapa limitante en la síntesis de gonadotropinas (Beitins y Padmanabhan, 1991).

Varios transmisores y neuropéptidos participan en la regulación de la secreción de gonadotropinas y de la propia GnRH (Weiss y Jameson, 1993; Reis *et al.*, 2000). El patrón pulsátil secretor de GnRH es fuertemente modificado por dos neuropéptidos hipotalámicos, neuropéptido Y (NPY) y galanina (Genazzani *et al.*, 2000), que son secretados concomitantemente con la GnRH y amplifican el pico preovulatorio de LH. La secreción de éstos neuropéptidos aumenta por el estradiol y la progesterona, que, como veremos, parecen no poder afectar a las neuronas liberadoras de GnRH directamente. Esto relega a los esteroides ováricos a proporcionar un ambiente óptimo para la hipersecreción de GnRH, NPY y galanina, más que para un aumento directo de la síntesis o liberación de GnRH. Éste ambiente óptimo incluye no sólo la activación de señales excitatorias (NPY, galanina, óxido nítrico (NO)...) sino también la desinhibición de señales inhibitorias (opioides y GABA), permitiendo una coordinación para aumentar la secreción de GnRH y LH al final del proestro (Kalra y Kalra, 1994).

La GnRH puede modular su propia liberación a través de un mecanismo de retroalimentación de bucle ultracorto (autorregulación) (Hyyppa *et al.*, 1971). Contactos de tipo sináptico entre neuronas productoras de GnRH proporcionan las bases anatómicas para la interacción de las neuronas hipotalámicas (Leranth *et al.*, 1985). Se estudia también la posibilidad de que además de que la GnRH regule su propia expresión, regule igualmente la expresión de sus receptores en el hipotálamo y en el ovario (Roth *et al.*, 2001).

Un factor importante en la regulación de GnRH es la inhibición ejercida por los opioides. La β -endorfina ha sido encontrada en la sangre portal y su concentración está inversamente relacionada con la liberación preovulatoria de LH (Hulse *et al.*, 1984). La β -endorfina suprime la liberación de GnRH a la sangre portal inhibiendo así tanto la liberación pulsátil como la liberación preovulatoria de gonadotropinas. Se han visto receptores para opioides en neuronas liberadoras de GnRH, por lo que estos opioides podrían actuar directamente sobre estas neuronas suprimiendo la liberación del decapeptido (Leranth *et al.*, 1988; Maggi *et al.*, 1995). La inhibición por opioides puede ser activada por aspartato, que tiene un efecto inhibitorio en la liberación de GnRH (Giri *et al.*, 1996). La norepinefrina (NE) es también un potente estimulador de los pulsos de GnRH y la liberación pulsátil de NPY y NE coincide o precede a los pulsos de GnRH. La NE (Rettori *et al.*, 1993; Canteros *et al.*, 1995; Canteros *et al.*, 1996; Rettori y McCann, 1998) y glutamato (Dhandapani y Brann, 2000) estimulan la liberación de GnRH a través de la liberación de NO. El NO también amplifica la magnitud y duración del pico de LH inducido por estrógenos a través del NPY (Bonavera *et al.*, 1996). La melatonina, producida por la glándula pineal por la noche, inhibe la liberación de LH inducida por la GnRH (Vanecek y Klein, 1995), aunque al parecer no directamente (Malpaux *et al.*, 1999), explicando el efecto depresivo de la melatonina en la reproducción. Así se ha visto que la acción de los esteroides también se ve modificada por la duración del día en hámster (Tamarkin *et al.*, 1976; Turek, 1977) y por el estado nutricional en una amplia variedad de especies (Pirke y Spyra, 1981). El neuropéptido colecistocinina (CCK) ha sido implicado en la regulación del comportamiento reproductivo y en el control de la secreción de

gonadotropinas (Hashimoto y Kimura, 1986; Kimura *et al.*, 1987; Babcock *et al.*, 1988; Bloch *et al.*, 1989). Existen evidencias de la implicación de las catecolaminas en la regulación de la secreción de LH in vivo, presumiblemente a través de su acción en la secreción de GnRH (Ramírez *et al.*, 1984; Kordon *et al.*, 1994). En el control de la hormona liberadora de gonadotropinas también participan la noradrenalina (Herbison, 1997; Ponzo *et al.*, 2000), la hormona liberadora de corticotropina, la angiotensina II (Phillips *et al.*, 1995) etc. El papel estimulador de las neuronas noradrenérgicas que inervan el hipotálamo en la liberación de GnRH ha sido bien documentado (Gallo y Drouva, 1979; Ramírez *et al.*, 1984; Pau y Spies, 1986). Las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas son claramente estimuladoras de la secreción de GnRH por la neuronas parvocelulares.

Los esteroides gonadales participan en la regulación de la liberación tanto de GnRH como de gonadotropinas (Shupnik, 1996). Los mecanismos de retroalimentación por esteroides sexuales son complejos e incluyen efectos tanto a nivel hipotalámico como hipofisario y pueden ejercer tanto retroacción positiva como negativa (Demay *et al.*, 2001). Durante el ciclo del estro, la concentración de receptores hipofisarios para la GnRH y los niveles de ARNm de GnRH aumentan al principio del proestro y rápidamente disminuyen al final del proestro, coincidiendo con el pico preovulatorio de gonadotropinas. Los cambios pueden ser restablecidos mediante la administración de estradiol, indicando que la regulación de los estrógenos sobre los receptores de la GnRH es a través de cambios en los niveles del ARNm del receptor de la GnRH (Jinnah y Conn, 1988; Quinones-Jenab *et al.*, 1996). La concentración de receptores para la GnRH en machos se aproxima a la que se observa en hembras en metaestro.

En ambos sexos, la generación de pulsos de la GnRH puede verse modificada por esteroides ováricos, opioides endógenos y otros muchos factores en la hembra durante el ciclo reproductor. La liberación basal de GnRH en machos y hembras se mantiene relativamente baja debido a la retroalimentación negativa de bucle largo ejercida por los esteroides gonadales. La inhibición se ejerce, probablemente, más directamente en la hipófisis anterior, e indirectamente en el hipotálamo, ya que las neuronas secretoras de GnRH carecen de receptores para los esteroides gonadales (Shivers *et al.*, 1984; Wray y Hoffman., 1986; Fox *et al.*, 1990; Herbison y Theodosis, 1992; Watson *et al.*, 1992; Lehman y Karsch, 1993). La eliminación de esta retroalimentación negativa (como por ejemplo con una gonadectomía) provoca un aumento en la secreción de LH y FSH (Plant *et al.*, 1989). Actualmente se cree que la regulación de la secreción de la GnRH es a través de un sistema de comunicación entre el hipotálamo y la hipófisis, e incluye a otros neuropéptidos, aminoácidos, esteroides y neurotransmisores.

La ovulación en la mayoría de los mamíferos ocurre espontáneamente y es inducida por una cascada de retroalimentación positiva que incluye al ovario, al sistema nervioso central (especialmente el hipotálamo) y la hipófisis anterior. En hembras de algunas especies como roedores, conejos u ovejas, hay un pico en la liberación de GnRH justo antes de la ovulación,

seguido de una disminución rápida hacia niveles basales (Karsch *et al.*, 1997). Este aumento en la secreción de GnRH se inicia por el aumento de los niveles de estradiol al final del proestro. A la masiva liberación de GnRH le sigue un aumento brusco en los niveles de LH (Sarkar *et al.*, 1976; Levine y Ramírez, 1982), cuyo pico alcanza 100 veces los niveles basales, y es esencial para la ovulación. A la vez, las gonadotropas hipofisarias se vuelven más sensibles a la GnRH, debido al estradiol y progesterona (Keye y Jaffe, 1975; Knobil 1980; Liu y Yen, 1983; Clarke y Cummins, 1984; Stojilkovic *et al.*, 1994; Clarke, 1995; Conn *et al.*, 1995; Bauer-Dantoin *et al.*, 1995). Sin embargo en primates, hay evidencias de una disminución en la producción de GnRH junto con el pico de LH, dándole más importancia al aumento de la sensibilidad de las gonadotropas hipofisarias por la GnRH (Hall *et al.*, 1994; Ordog y Knobil, 1995). Los niveles iniciales de estrógenos durante la fase folicular temprana del ciclo ejercen una retroalimentación negativa directa sobre la secreción de gonadotropinas, mientras que cuando los niveles de estrógenos aumentan y se mantienen por encima de un nivel crítico al menos 36 horas, la retroacción se invierte y se convierte en positiva, lo que produce el pico preovulatorio de gonadotropinas. Parece ser que estos efectos positivos de los estrógenos sobre la liberación de LH y FSH se deben a un aumento en el número de receptores para la GnRH (Karsch, 1987).

El pico preovulatorio de la LH es un evento endocrino singular que implica como hemos visto, un cambio desde una retroalimentación negativa a positiva por parte de los estrógenos, cambio que involucra tanto al hipotálamo como a la hipófisis. Esto implica una desinhibición de las conexiones inhibitorias hacia las neuronas liberadoras de GnRH y una activación de las conexiones excitatorias. La retroalimentación positiva de estradiol en proestro, y la retroalimentación negativa de una acción sinérgica de estradiol, progesterona y opioides en la fase lútea, está integrada y sincronizada como los impulsos neuronales que le llegan a las neuronas liberadoras de GnRH en una cascada de retroalimentación positiva y negativa que regula la secreción de GnRH.

En machos no hay un pico de LH porque los incrementos de estradiol producidos por el macho son muy bajos como para estimular al hipotálamo, y, además, los machos han sido expuestos a andrógenos durante el periodo crítico del desarrollo. En general, los esteroides neonatales determinan si el patrón de secreción de gonadotropinas será cíclico, produciendo los picos de LH periódicos que dan lugar a la ovulación en hembras, o relativamente constantes, como ocurre en machos (Barraclough, 1979; Gerall y Givon, 1992).

La gonadectomía de un animal, da lugar a un aumento en la secreción de gonadotropinas (Emanuele *et al.*, 1996), ya que se incrementa la frecuencia de pulso de la GnRH (Clarke y Cummins, 1985) y disminuye la retroalimentación negativa de los esteroides sobre la hipófisis, desencadenando en un incremento de LH (Marshall *et al.*, 1991). Este aumento provocado por la gonadectomía puede prevenirse con la administración de testosterona y estradiol en machos y hembras respectivamente (Clayton, 1993). Por contra, la gonadectomía produce una disminución

en los niveles de GnRH en la eminencia media (Advis *et al.*, 1980; Gross, 1980; Oslon y Blake, 1991), y el tratamiento con esteroides sexuales a estos animales gonadectomizados reemplaza los niveles de GnRH (Dziedzic y Walczewska, 1997). Se han descrito otras muchas formas de regulación hipotálamo-hipofisaria a través de los esteroides gonadales, entre las que se encuentran los cambios en los niveles de ARNm de GnRH y de sus receptores, cambios en el número de receptores, e incluso se han descrito efectos indirectos de los esteroides sexuales sobre la GnRH a través de neuronas vecinas (Martínez de la Escalera y Clapp, 2001).

Además del papel de la GnRH a nivel de la hipófisis, la GnRH está implicada como regulador autocrino/paracrino de varios tejidos extrahipofisarios, incluyendo las gónadas (Leung y Steele, 1992; Peng *et al.*, 1994; Tsafiriri y Adashi, 1994; Olofsson *et al.*, 1995; Bauer-Dantoin y Jamenson, 1995). Durante las primeras etapas de la maduración folicular, la GnRH ejerce efectos antigonadotróficos inhibiendo la diferenciación de las células de la granulosa induciendo apoptosis de las células de la granulosa, provocando la atresia folicular (Billig *et al.*, 1994). Durante el periodo preovulatorio, la GnRH parece jugar un papel importante en la ruptura del folículo y en la ovulación (Nathwani *et al.*, 2000). No se conoce claramente el papel funcional de la GnRH durante la fase lútea.

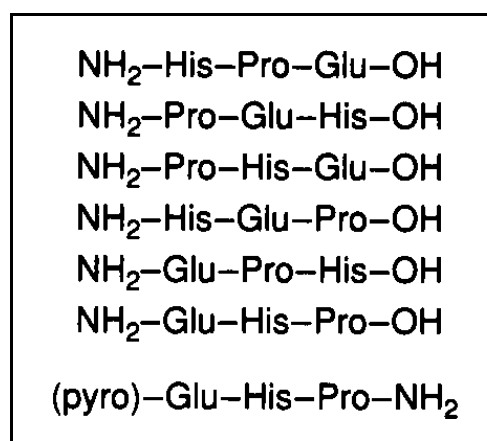
3.2.1.2. Hormona liberadora de tirotropina (TRH).

La estructura de la hormona hipotalámica que controla la secreción de tirotropina (TSH) fue determinada independientemente por Guillemin y Schally y colaboradores en 1969. Por este trabajo y por la elucidación de las estructuras de la hormona inhibidora de la liberación de la hormona de crecimiento y la hormona liberadora de gonadotropinas, estos investigadores recibieron el premio Nobel en Fisiología y Medicina en 1977. La tarea de descubrir la estructura de la TRH no fue tarea fácil, pero su determinación final proporcionó aportaciones importantes a los métodos actuales de investigación endocrina (Wade, 1978).

La TRH fue inicialmente aislada y caracterizada a partir de fragmentos hipotalámicos porcinos (Boler *et al.*, 1969) y ovinos (Burgus *et al.*, 1969). Estas preparaciones purificadas, que estimulaban la liberación de TSH en la hipófisis de forma extremadamente potente, tanto *in vivo* como *in vitro*, consistían en un único péptido compuesto de tres aminoácidos: ácido glutámico, histidina y prolina en cantidades equimoleculares. Sin embargo en primeros experimentos no se pudo demostrar cual era la secuencia exacta de aminoácidos en el péptido ya que no quedó material suficiente. Se decidió, por tanto, sintetizar los seis isómeros posibles del péptido (*Figura E.5.*). Sorprendentemente ninguno de los tripéptidos poseía las características cromatográficas o biológicas de la TRH. Se descubrió que no existía un grupo amino-terminal en el tripéptido natural; en otras palabras, el grupo amino-terminal estaba protegido de alguna manera. Entonces los péptidos fueron tratados con anhídrido acético en un intento de proteger el NH₂ libre (*Figura E.6.*). Sólo uno de los péptidos, Glu-His-Pro-OH, poseyó actividad biológica; que era, sin

embargo, menor que la de la TRH natural. Se demostró que dicha hormona natural era la pGlu-His-Pro-OH. Los grupos α -amino y el carboxilo del ácido glutámico se habían condensado para dar la forma ácido piroglutámico del péptido. Esta estructura, sin embargo, no era idéntica a la TRH natural, que era de naturaleza más básica. Se pudo obtener un compuesto más básico, menos ácido, mediante la protección del grupo carboxilo libre de la prolina. La amidación de la prolina C-terminal rindió pGlu-His-Pro-NH₂ cuya actividad era indistinguible de la TRH natural (Burgus *et al.*, 1970). Se demostró que las estructuras de la TRH porcina, ovina, bovina y humana eran idénticas.

Figura E.5. Seis péptidos sintéticos relacionados con la hormona liberadora de tiotropina (TRH).



La TRH es producida por neuronas cuyos cuerpos celulares se encuentran en el núcleo paraventricular del hipotálamo (Greer, 1957). Los axones de estas neuronas terminan en la zona externa de la eminencia media (Lechan y Toni, 1992; Fliers *et al.*, 1994) liberando la TRH tras el procesamiento de su precursor proteico de 242 aminoácidos en humanos (Yamada *et al.*, 1990) a la sangre portal hipofisaria y transportada a la hipófisis anterior (Rondeel *et al.*, 1995). El procesamiento de la proTRH produce, en humanos, 6 copias del péptido biológicamente activo (Yamada *et al.*, 1990), mientras que en ratas se encuentran 5 copias (Lechan *et al.*, 1986). Sólo las unidades repetidas que codifican al péptido y se encuentran dispersas a lo largo del precursor han sido mantenidas entre las prohormonas de mamíferos y anfibios. La conservación de este modelo a lo largo de la evolución sugiere que la capacidad de un precursor para generar múltiples péptidos bioactivos puede ser un mecanismo importante en la amplificación de la producción de una hormona (Lechan, 1987).

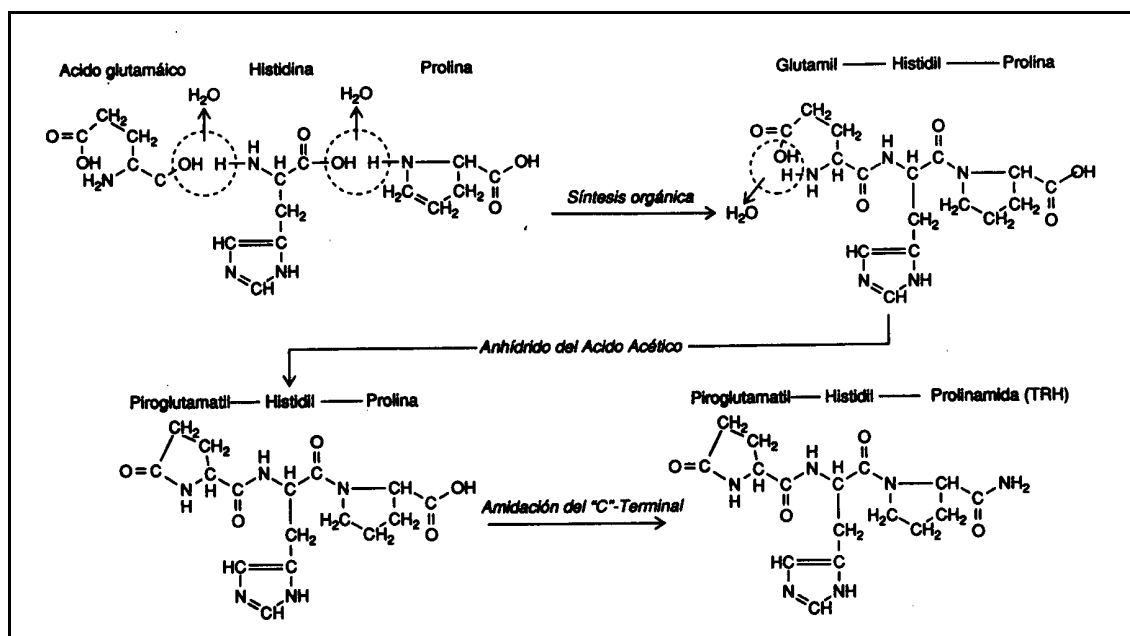


Figura E.6. Síntesis de la hormona liberadora de tirotropina.

La TRH junto con las hormonas tiroideas, regulan la liberación de la TSH (Schally *et al.*, 1969; Guillemin, 1978; Hadley, 1996). La administración de TRH tanto *in vivo* (Mueller *et al.*, 1973; Vale *et al.*, 1974; Blake, 1974; Chen y Meites, 1975; D'Angelo *et al.*, 1975; Lawson, 1979) como *in vitro* (Vale *et al.*, 1974; Haug y Gautvik, 1976; Tang *et al.*, 1986) estimula la secreción de TSH y prolactina (PRL) en la hipófisis. También se ha visto que los efectos estimuladores de la TRH sobre la TSH y la PRL pueden ser inhibidos por hormonas tiroideas (Bassiri y Utiger, 1974; Hinkle y Goh, 1982; Ikeda *et al.*, 1985).

La secreción de la TSH es pulsátil, con una frecuencia aproximada de un pulso cada 90-180 minutos en humanos (Brabant *et al.*, 1990). Esta frecuencia de pulsos es probablemente determinada por una secreción también pulsátil de la TRH hipotalámica. Los niveles bajos y constantes de TSH en personas con lesiones hipotalámicas, pueden ser restablecidos por una administración pulsátil de TRH exógena (Brabant *et al.*, 1990).

La influencia de los esteroides sexuales en la secreción de TRH ha sido objeto de numerosos estudios, sin embargo, aun queda mucho por saber. Se sabe por ejemplo que la biosíntesis de la TRH está regulada por la triyodotironina (T_3) (Segerson *et al.*, 1987; Hollenberg

et al., 1995), por el cortisol (Coiro *et al.*, 2000) y por esteroides (Akinsanya *et al.*, 1995; Wilber y Xu, 1998). Existen estudios que indican que la castración en ratas reduce los niveles hipotalámicos de TRH (Pekary y Sattin, 2001) y que en ratas jóvenes castradas, la testosterona estimula la liberación de la TRH hipotalámica (Borges *et al.*, 1998). Sin embargo, los niveles de TRH en la hipófisis posterior están negativamente relacionados con la liberación de TRH hipotalámica y los niveles de TSH periféricos, de tal forma que tras la castración, en que como hemos visto los niveles de TRH hipotalámicos disminuyen, existe un aumento en los niveles de TRH en la hipófisis posterior resultando una acumulación de TRH en axones hipofisiotrópicos, y una disminución de los niveles de TSH en la sangre periférica de ratas macho (Rondeel *et al.*, 1995). Se sabe que el estradiol aumenta la liberación in vitro de TRH por el hipotálamo en ratas (Steel y Torrie, 1960) o in vivo en el plasma portal hipofisario (Huang *et al.*, 1995). Otros estudios in vitro (Liu *et al.*, 1997) también indican que la concentración de TRH en el hipotálamo se ve aumentada por el estradiol. También se ha observado que el reemplazamiento de estradiol en ratas ovariectomizadas aumenta la liberación de TRH (Franks *et al.*, 1984) y la biosíntesis de receptores de la TRH en la hipófisis anterior (Kimura *et al.*, 1994).

Las hormonas tiroideas T_3 y T_4 (tiroxina) inhiben la liberación de TSH a través de una retroalimentación negativa (Wilber, 1970; Snyder y Utiger, 1972; Haug y Gautvik, 1976; Hadley, 1996) y también regulan la secreción de TRH (Ganong, 2000). Se ha comprobado que las hormonas esteroideas ováricas previenen el efecto inhibitorio de la T_3 en la liberación de la TRH (Liu *et al.*, 1997). Algunos estudios demuestran que la liberación de TRH aumenta con el estradiol y disminuye con la T_3 o progesterona (Liu *et al.*, 1997). Se sabe que las hormonas tiroideas disminuyen la densidad de receptores para la TRH en la hipófisis tanto vivo como en células en cultivo (DeLean *et al.*, 1977a; Gershengorn, 1978; Perrone y Hinkle 1978). Paralelamente, la respuesta de la TRH disminuye. Los estrógenos, por contra, aumentan los niveles de receptor para la TRH in vitro e in vivo, lo que podría explicar la alta sensibilidad de las células de la hipófisis a la TRH en presencia de niveles elevados de estradiol (DeLean, 1977b; Gershengorn *et al.*, 1979).

La síntesis de TRH, en las neuronas del núcleo paraventricular, está regulada por las hormonas tiroideas circulantes. Las neuronas TRH en las subdivisiones medial y periventricular del PVN contienen receptores funcionales para la hormona tiroidea que responden a la hormona tiroidea en un descenso en la expresión del gen TRH y un descenso en la síntesis de TRH. Este mecanismo de retroalimentación de la TRH por la hormona tiroidea es un efecto directo aparentemente mediado por una forma activa de la hormona triiodotironina (T_3). La T_3 también disminuye la secreción de TRH a la sangre portal hipofisaria (Wang *et al.*, 1994a). La secreción de TRH por otras neuronas PVN y por otras neuronas liberadoras de TRH del cerebro no es regulada de esta forma.

También existe un mecanismo de retroalimentación ultracorto de la TRH sobre su propia secreción (Toni *et al.*, 1990).

Las neuronas liberadoras de TRH en el PVN están apiñadas junto con otras neuronas que contienen neuropéptidos como el NPY y la somatostatina. Las neuronas liberadoras de TRH reciben densas aferencias desde otras neuronas originadas en otras zonas del cerebro que liberan catecolaminas a sus contactos sinápticos con cuerpos celulares y dendritas de neuronas que contienen TRH. Epinefrina y NE estimulan la secreción de TRH, mientras que la DA es probablemente inhibitoria. Las catecolaminas afectan principalmente tras la secreción de la TRH a los vasos portales más que actuando en la expresión del gen de la TRH. Muchos otros factores además de las hormonas tiroideas, afectan a la sensibilidad de las células de la hipófisis anterior a la TRH. La hormona de crecimiento (GH) influye sobre la respuesta de la TSH a la TRH (Rott *et al.*, 1970). Los estudios sobre los efectos de los glucocorticoides son dispares dependiendo si los experimentos se hacen *in situ* o en células en cultivo (Jackson, 1995). Sin embargo, los factores tiempo y concentración podrían ser relevantes para explicar la controversia encontrada entre *in vivo* e *in vitro* (Pérez-Martínez *et al.*, 1998).

La TRH es inactivada por la ectoenzima degradadora de TRH (TRH-DE), también llamada piroglutamil peptidasa (o aminopeptidasa) II (PP II; E.C.3.4.19.6.) (McDonald y Barret 1986; Cummins y O'Connor, 1998; Heuer *et al.*, 1998). Esta enzima es una peptidasa con un alto grado de especificidad. La TRH tiene un extremo N-terminal ciclado, un extremo C-terminal amidado, y un residuo de prolina interno y sólo la ectopeptidasa degradadora de TRH puede hidrolizar la TRH rompiendo la unión piroGlu-His (Bauer, 1995; Heuer *et al.*, 1998). En la adenohipófisis la PPII está sujeta a un riguroso control: positivo por hormonas tiroideas y negativo por la TRH (Joseph-Bravo *et al.*, 1998). También parece estar influenciada por estrógenos ya que, en ratas ovariectomizadas existe un incremento en la actividad adenohipofisaria del enzima, disminuyendo de nuevo con la administración de estradiol (Bauer *et al.*, 1988). Existen estudios que confirman el hecho de que el estradiol inhibe la PPII hipofisaria, descenso que va precedido por una disminución en los niveles de ARNm, sugiriendo que el enzima puede ser regulada a nivel pretranslacional (Schomburg y Bauer, 1997). Incluso se han observado cambios en la actividad del enzima en la hipófisis a lo largo del ciclo estral de la rata, aunque parece ser que estas fluctuaciones no están en fase con los niveles de estradiol, y la actividad de la enzima no se vio modificada durante la lactancia (Uribe *et al.*, 1991).

3.2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS HIPOFISOTRÓPICAS.

Los intentos por determinar los mecanismos de acción de las hormonas hipofisotrópicas son complicados, debido a la heterogeneidad de la población de células de la hipófisis. Sin embargo, se ha demostrado la acción directa de las hipofisotropinas sobre las células hipofisarias (Taraskevich y Douglas, 1977; Hsiung *et al.*, 1993). La aplicación de TRH mediante micropipeta

a células disociadas de la hipófisis anterior desencadenó potenciales de acción en células que previamente estaban en reposo y aumentó la frecuencia de dichos potenciales en células que ya eran activas espontáneamente. Las células que responden representan probablemente a las tirotropas. La despolarización de las células tirotropas inducida por TRH es dependiente de Ca^{2+} lo que sugiere que el factor hipofotrópico estimula la secreción de tirotropina a través de un mecanismo de acoplamiento estímulo-secreción (Taraskevich y Douglas, 1977).

También se ha comprobado que las metilxantinas y los derivados del adenosín monofosfato cíclico (AMPC) estimulan la secreción de todas las hormonas hipofisarias. De esta forma, se ha considerado que el AMPC es uno de los mensajeros intracelulares que regulan la secreción de hormonas por la adenohipófisis en respuesta a los factores hipofisotrópicos.

3.3. Hipófisis.

La glándula hipofisaria (también conocida como pituitaria) se compone de tejidos que derivan de dos orígenes distintos (Green, 1951). El conocimiento del origen y del desarrollo de la hipófisis resulta crítico para llegar a comprender las relaciones estructura-función de esta glándula endocrina. Los primeros anatomistas creían que los componentes estructurales de la glándula hipofisaria se encargaban de retirar la flema o moco de las cavidades del cerebro.

La hipófisis se compone de una adenohipófisis (hipófisis glandular, epitelial o hipófisis anterior) y una neurohipófisis (o hipófisis posterior) (Dorton, 2000) (*Figura E.7.*). En la presente memoria nos centraremos en la neurohipófisis puesto que las hormonas producidas por ella son posibles sustratos de las aminopeptidasas.

A diferencia de la adenohipófisis, que deriva de una evaginación ascendente del epitelio oral, la hipófisis posterior se desarrolla a partir de un crecimiento descendente del ectodermo neural. La hipófisis posterior está compuesta principalmente por células de tipo glial denominadas pituicitos, que no secretan hormonas, sino que actúan simplemente como estructura de soporte para un gran número de fibras nerviosas terminales y de terminaciones nerviosas de haces nerviosos que se originan en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo. Estos haces pasan a la neurohipófisis a través del tallo hipofisario. Las terminaciones nerviosas son botones bulbosos que contienen numerosos gránulos neurosecretores situados sobre la superficie de los capilares, a los que secretan las dos hormonas de la hipófisis posterior, la hormona antidiurética (ADH), también denominada vasopresina (VP) o arginina vasopresina (AVP), y la oxitocina (OT). Al proceso de formación de los gránulos y a su liberación se denomina neurosecreción (Scharrer, 1987).

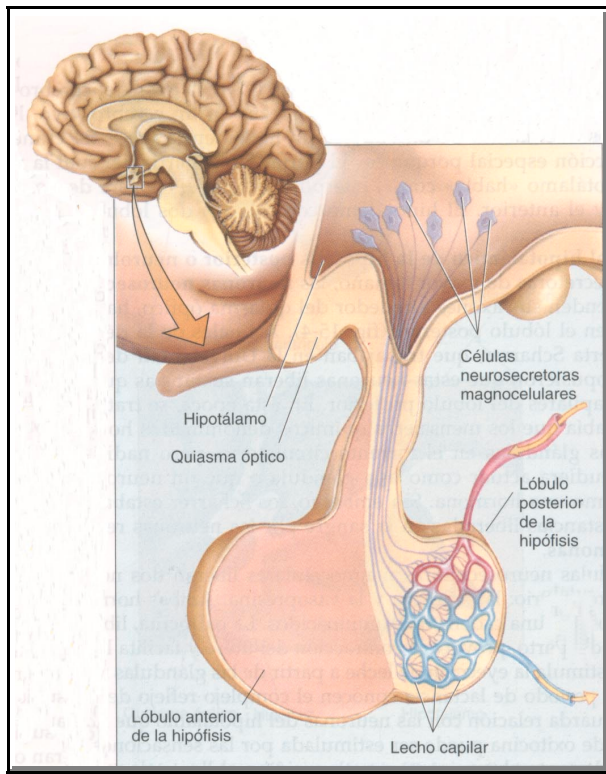
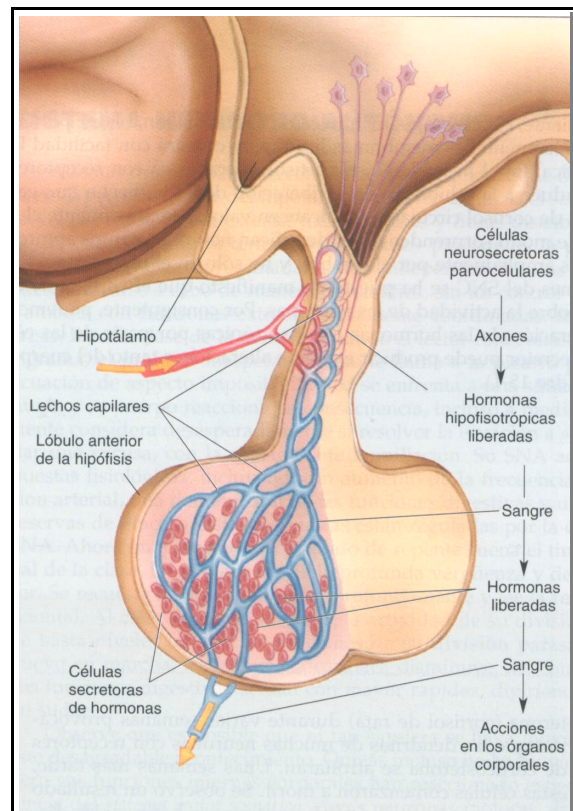


Figura E.7.a. Células neurosecretoras magnocelulares del hipotálamo. En esta figura se muestra una visión sagital media del hipotálamo y la hipófisis. Las células neurosecretoras magnocelulares segregan oxitocina y vasopresina directamente en los capilares del lóbulo posterior de la hipófisis (neurohipófisis).

Figura E.7.b. Células neurosecretoras parvocelulares del hipotálamo. Las neuronas neurosecretoras parvocelulares segregan hormonas hipofisiotrópicas en los lechos capilares especializados de la circulación portal hipotálamo-hipofisaria. Estas hormonas viajan hasta el lóbulo anterior de la hipófisis, donde desencadenan o inhiben la liberación de hormonas hipofisarias a partir de las células secretoras (adenohipófisis).



3.3.1. HORMONAS DE LA NEUROHIPÓFISIS.

En 1895 se descubrió que los extractos de hipófisis inyectados en animales, provocaban un rápido aumento en la presión sanguínea (Oliver y Schafer, 1895). El descubrimiento posterior realizado por Howell de que el principio presor de los extractos de la hipófisis residía en el lóbulo posterior supuso un avance importante (Howell, 1898). Dale, un eminente farmacólogo inglés, fue el primero en observar que extractos de hipófisis bovinas secas provocaban la contracción del útero además de un aumento de la presión sanguínea (Dale, 1906). En 1909 se utilizaron por primera vez en obstetricia clínica extractos de hipófisis posterior para tratar a mujeres con hemorragia postparto (Blair Bell, 1909) y para inducir el parto (Theobald *et al.*, 1969). En los años posteriores se descubrió que los extractos del lóbulo posterior provocaban una liberación rápida de leche. En 1913 se demostró que una respuesta a las inyecciones de extractos de hipófisis posterior era la antidiuresis. Las inyecciones reducían el flujo de orina, aumentaban su osmolalidad y aliviaban la sed. Los extractos de neurohipófisis se convirtieron en el método clínico para controlar la poliuria de la diabetes insípida, aunque la etiología del síndrome todavía no se conocía.

Desde los años 50 se conocen dos nonapéptidos la OT y la VP (Katsoyannis y Du Vigneaud, 1958). Estas hormonas neurohipofisarias están estrechamente relacionadas estructuralmente, pero desempeñan papeles fisiológicos bastante diferentes. Así, la OT controla la liberación de leche de la glándula mamaria y la contracción del útero, mientras que la VP está implicada en el equilibrio hídrico (Higuchi y Okere, 2002).

Las hormonas de la neurohipófisis están formadas por nueve aminoácidos organizados en un anillo mediante un puente disulfuro entre las posiciones 1 y 6 de la molécula (Dawood *et al.*, 1985), dejando una cadena tripeptídica terminal (*Figura E.8.*). La VP se diferencia de la OT en que posee una fenilalanina y una arginina en las posiciones 3 y 8 de la molécula respectivamente (Barberis *et al.*, 1998).

Las hormonas neurohipofisarias son sintetizadas por neuronas individuales que secretan sólo un tipo de hormona, cuyos cuerpos celulares se encuentra entremezclados principalmente en los núcleos supraóptico (SON) y paraventricular (PVN) del hipotálamo y cuyos axones terminan en la hipófisis posterior (El-hajdoubi *et al.*, 2000).

Existen evidencias que muestran que la OT y la VP, además de ejercer como hormonas peptídicas, también actúan como neurotransmisores/neuromoduladores. Ambas hormonas además de ser sintetizadas por células hipotálamo-hipofisarias, también pueden ser sintetizadas por otros cuerpos celulares de otras zonas del hipotálamo e incluso de fuera del hipotálamo, cuyos axones se proyectan hacia el sistema límbico y la médula espinal (Raggenbass, 2001). Tanto la oxitocina como la vasopresina, no son sólo liberadas de la neurohipófisis hacia la circulación

general, sino también son liberadas intracerebralmente. Así, estudios recientes han comprobado patrones de liberación diferentes de ambos péptidos hacia tejidos cerebrales en respuesta al estrés, comprobando también que la liberación de los nonapéptidos por parte de sus neuronas, puede realizarse desde diferentes lugares de la superficie de la neurona (soma/dendritas frente terminal axónico). Incluso, a este nivel, se puede igualmente conocer otras funciones que desempeñan tanto oxitocina como vasopresina sobre tejidos cerebrales (Engelmann, 2000). También se ha visto que pueden ser liberadas por otros órganos periféricos (Mohr y Schmitz, 1991).

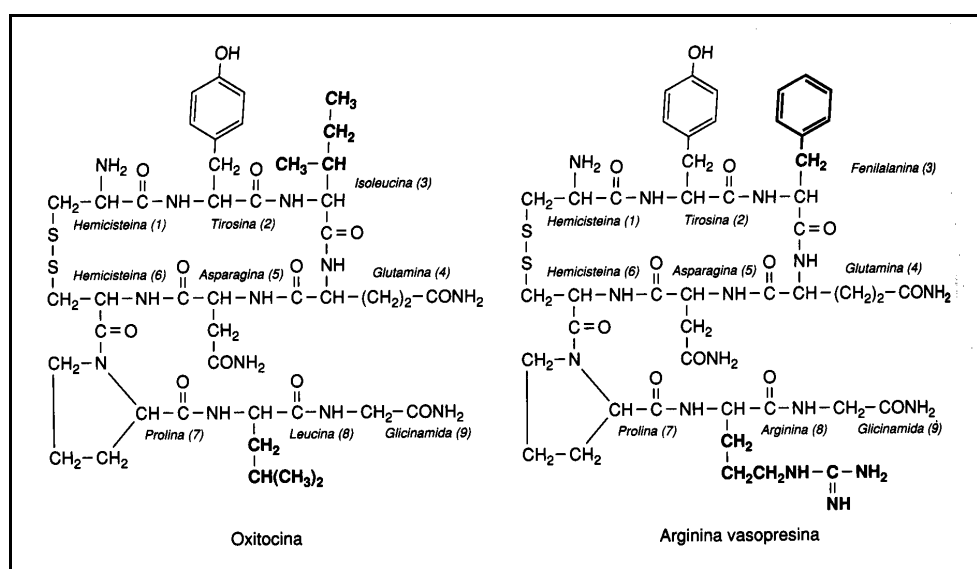


Figura E.8. Estructuras primarias de la oxitocina y la vasopresina. Se numeran los aminoácidos individuales por el método convencional.

Cada hormona se encuentra estrechamente asociada con una proteína mayor, conocida como neurofisisina. Hay una neurofisisina específica para cada hormona (Kazmierkiewicz et al., 1997), neurofisisina de OT (oxifisisina o neurofisisina I) y neurofisisina de VP (presofisisina o neurofisisina II). Las neurofisisinas y sus hormonas asociadas derivan del procesado postraduccional de las proteínas precursoras prooxifisisina y propresofisisina (de Bree, 2000). Los inhibidores de la formación de neurofisisinas también reprimen la formación de las hormonas asociadas.

Se han encontrado estas dos neurofisinas en la neurohipófisis de todos los mamíferos, de ahí su nombre. La molécula precursora, con los enzimas proteolíticos asociados, está presente en los gránulos de las células neurosecretoras. Estos enzimas pueden ser necesarios para escindir la neurofisina de la molécula precursora, dado que este proceso ocurre dentro del gránulo después de que comience la migración desde las regiones correspondientes a los orgánulos de Golgi en el pericarión situado en el hipotálamo hacia las terminaciones axónicas del lóbulo neural. La VP y la OT se unen no covalentemente y de forma específica a las neurofisinas de las hormonas neurohipofisarias. Las neurofisinas de mamíferos contienen varias uniones disulfuro y cualquier alteración en la estructura o conformación de la neurofisina podría alterar la unión y la actividad de la endopeptidasa responsable de la separación de la molécula activa. Estas neurofisinas probablemente aseguren la correcta conformación que permite el acceso de enzimas específicos. Igualmente, podrían proteger a la hormona activa de la destrucción enzimática (Legros y Geenen, 1996). La neurofisina se secreta junto con la hormona al torrente circulatorio en respuesta a la estimulación fisiológica. Las neurofisinas secretadas se considera que funcionan sólo como proteínas transportadoras intraneuronales para las hormonas y que carecen de cualquier función sistémica de tipo hormonal/fisiológico.

3.3.1.1. Control de la secreción de hormonas neurohipofisarias.

Los estímulos recibidos por los receptores sensoriales del pecho o del sistema vascular ocasionan la liberación de OT o VP en la hipófisis, respectivamente. Las aferencias nerviosas a la médula espinal conectan con otras vías nerviosas hasta los cuerpos celulares neurosecretores localizados en los núcleos paraventriculares y supraópticos del hipotálamo. Las neuronas neurosecretoras están en contacto sináptico con neuronas de estas rutas aferentes. Pueden existir conexiones excitadoras (colinérgicas) e inhibitoras (noradrenérgicas) desde el cerebro medio anterior hasta las neuronas neurosecretoras. También pueden existir interneuronas que sincronicen la actividad de las neuronas neurosecretoras en los núcleos hipotalámicos. La liberación de un neurotransmisor excitador de las neuronas aferentes sobre las neuronas neurosecretoras conduce a la despolarización de estas últimas células. Los potenciales de acción pueden registrarse a partir de células neurosecretoras de los núcleos supraópticos y paraventriculares de mamíferos. La pauta de disparo de las células de OT puede distinguirse de la de las células secretoras de VP durante la estimulación apropiada, como la succión o la hemorragia, respectivamente (Poulain *et al.*, 1977). Las presuntas células secretoras de VP muestran una descarga rítmica de tipo pulsátil que aumenta como consecuencia de una presión osmótica alta mientras que las células que producen OT parece que descargan continuamente y de una forma aleatoria.

La despolarización de los cuerpos celulares neurosecretores se propaga a lo largo de los axones del tracto hipotálamo-hipofisario hasta las terminaciones neuronales en la pars nervosa. Los iones calcio entran en las células neurosecretoras durante la despolarización, y son

necesarios para el proceso secretor, ya que la secreción de hormonas neurohipofisarias se ve inhibida en ausencia de Ca^{2+} . Los gránulos de neurosecreción se funden con la membrana plasmática de las células y su contenido sale mediante exocitosis vesicular. La hormona secretada y su neurofisisina asociada entran al torrente circulatorio en los vasos que irrigan la neurohipófisis.

Se ha demostrado, mediante estudios electrofisiológicos, un efecto facilitador específico de la OT sobre su propia liberación en las neuronas de los núcleos supraópticos y paraventriculares. Además, el hallazgo morfológico de sinápsis oxitocinérgicas que afectan a neuronas de OT en los núcleos supraópticos proporcionan pruebas de una acción facilitadora de la OT sobre la liberación de la propia OT. Este efecto estimulador sobre la liberación de OT podría tener un significado funcional como un mecanismo para intensificar las descargas pulsátiles bajo condiciones de demanda de OT (Falke, 1989). La prolactina también está implicada en el control de la liberación de OT durante la succión. De hecho, se ha demostrado que existe contacto sináptico entre neuronas que liberan el péptido liberador de prolactina (PrRP) y los cuerpos celulares de los núcleos hipotalámicos paraventricular y supraóptico. Se pudo ver un aumento de los niveles de oxitocina y vasopresina en ratas hembra tras la administración de PrRP, aunque en machos, sólo la oxitocina se vio aumentada (Maruyama *et al.*, 1999). La liberación de ATP, co-secretado junto con vasopresina y oxitocina, podría jugar un papel importante en la regulación del estímulo-secreción en la neurohipófisis (Lemos y Wang, 2000). Estudios en los que se eliminaba la hipófisis, se pudo observar un efecto inhibitorio de la glándula pineal sobre la síntesis y liberación de oxitocina (Bojanowska *et al.*, 1999). Recientemente, se ha visto la implicación del óxido nítrico en la regulación de hormonas neurohipofisarias (Kadekaro y Summy-Long, 2000; Stern y Ludwig, 2001; Nysel *et al.* 2001) habiéndose visto un efecto inhibidor sobre el sistema hipotálamo-neurohipofisario en respuesta a estímulos osmóticos (Laycock y Hanoune, 1998). Se ha estudiado también, el papel de péptidos opioides sobre células de los núcleos supraóptico y paraventricular. Por ejemplo, se ha demostrado que la endomorfin 1, inhibe directamente a células productoras de OT e indirectamente a células productoras de VP (Doi *et al.*, 2001).

En la rata se ha demostrado que las hormonas ováricas influyen sobre los niveles de hormonas neurohipofisarias. Los estrógenos pueden modular directamente a la OT y VP. En este sentido existen evidencias que apuntan a una localización del receptor β de estrógenos en los núcleos paraventricular y supraóptico de la rata (Alves *et al.*, 1998). La frecuencia de disparo de las neuronas paraventriculares se incrementa durante el proestro y el estro y tras el tratamiento con estrógenos en ratas ovariectomizadas. El tratamiento con estrógenos también facilita la activación de grupos de células secretoras y la liberación refleja de OT mediante estimulación del tracto genital. El estradiol aumenta la secreción de OT a la circulación (Richard y Zingg, 1990; Mohr y Schimitz., 1991) e igualmente, aumenta la expresión génica de OT en el útero de la rata (Burbach y Adan, 1993).

3.3.1.2. Oxitocina.

La OT actúa en el control de la eyección de la leche después del parto. Durante la lactancia, las neuronas que contiene OT en los núcleos SON y PVN experimentan un breve disparo eléctrico durante 2-4 segundos (Wakerley *et al.*, 1973) dando lugar a un aumento en la concentración de OT en plasma (Higuchi *et al.*, 1985) y a una contracción del mioepitelio de la glándula mamaria para inducir la eyección de leche. La importancia biológica de la liberación de OT para la lactancia fue puesta de manifiesto mediante estudios en los que o bien se inyectaban anticuerpos en ratas para neutralizar la actividad de la OT (Higuchi *et al.*, 1986) o se eliminaba el gen de la OT en ratones (Nishimori *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1996) lo que daba lugar a un fracaso en la lactancia. Las terminaciones nerviosas sensoriales que se localizan en las areolas y los pezones de los pechos, son estimuladas por la succión y estos estímulos son conducidos a la neurohipófisis por vías nerviosas aferentes (Lincoln y Wakerley, 1974; Crowley y Armstrong, 1992). A partir de estudios con diferentes animales se han caracterizado los distintos componentes de estas vías nerviosas, que son ipsolaterales a la mama que es succionada. Los impulsos nerviosos conducidos a través de las neuronas sensoriales entran en la médula espinal y ascienden, vía tractos espinotalámicos dorsales, laterales y ventrales, hasta el mesencéfalo. Estos estímulos se transmiten por una ruta diencefálica hasta el hipotálamo. Se han determinado las vías nerviosas que controlan la secreción de OT mediante estimulación con electrodos y experimentos en los que se provocaban lesiones (Tindal y Knaggs, 1971). La estimulación del diencefalo ventral en animales anestesiados daba lugar a la eyección de la leche. Por el contrario, las lesiones de los núcleos paraventriculares de animales que amamantaban provocaban una marcada disminución en la cantidad de leche eyectada de la glándula mamaria. A partir de registros electrofisiológicos de presuntas neuronas oxitocinérgicas en ratas sin anestesiarse y que se movían libremente se estableció que la actividad eléctrica que muestran estas neuronas magnocelulares, unos 10 a 12 segundos antes de la eyección de la leche, es responsable de la liberación de OT bajo condiciones fisiológicas normales.

El principal órgano diana de la OT es la glándula mamaria de la hembra gestante. La OT liberada de la pars nervosa produce la contracción de las células mioepiteliales (Richardson, 1949; Linzell, 1961; Soloff *et al.*, 1980; Wagner *et al.*, 1997), elementos celulares semejantes a los musculares, que ocasiona un aumento de presión intramamaria y la salida de leche desde los alveolos y conductos hacia el exterior a través de las mamas. Es fácil demostrar el efecto de la OT sobre la liberación de leche de tejido aislado de glándula mamaria *in vitro* (Bisset, 1974). Se ha comprobado que en las fracciones de membrana de la glándula mamaria de rata lactante están presentes lugares de alta afinidad que unen OT marcada con tritio (H^3) (Soloff *et al.*, 1979).

Existen evidencias que apoyan el importante papel de la OT en la iniciación del parto. En primer lugar, la OT es el agente más común utilizado para estimular las contracciones uterinas en mujeres durante la última fase de la gestación (Shojo y Kaneko, 2000). Este patrón

inducido por la OT es indistinguible del patrón del parto espontáneo normal. En segundo lugar, en varias especies, incluyendo humanos, la concentración de OT durante el parto es mayor que antes del parto (Hirst *et al.*, 1993). En tercer lugar, algunas evidencias en ratas (Chan *et al.*, 1991; Fejgin *et al.*, 1994; Antonijevic *et al.*, 1995), en primates no humanos (Honnebier *et al.*, 1989; Wilson *et al.*, 1990; Hirst *et al.*, 1991) y en humanos (Akerlund *et al.*, 1987; Goodwin *et al.*, 1994) demuestran que antagonistas de la OT pueden inhibir las concentraciones uterinas al final del embarazo y podría interferir en el proceso del parto. Por último, el número de receptores de OT en el útero aumenta significativamente durante el parto en humanos (Fuchs *et al.*, 1982) y en ratas (Soloff *et al.*, 1979; Fang *et al.*, 1996). Con la demostración de las propiedades contráctiles en el útero de la rata de la OT, muchos investigadores intentaron establecer a la OT como el mayor factor de iniciación del parto. Sin embargo, la mayoría de los resultados apuntaban más a la importancia de la OT en la etapa de expulsión en el parto y a la involución del útero. Muchos investigadores no detectaron un aumento de OT en suero materno hasta después de iniciado el parto (Chard, 1989; Hirst *et al.*, 1993; Douglas *et al.*, 2001). El pico de concentración ocurre durante la expulsión del feto (Fitzpatrick, 1961; Dawood *et al.*, 1978a). Además, mujeres con disfunción en la hipófisis posterior presentaban partos normales (Chard, 1989), y algunos estudios en los que se utilizaban anticuerpos para la OT, vieron que se bloqueaba la eyección de leche durante la lactancia, pero tenía poco o nulo efecto sobre el desarrollo normal del parto (Higuchi *et al.*, 1986; Kumaresan *et al.*, 1971). Así, a pesar de la teoría importante del papel de la OT en el inicio del parto, las evidencias experimentales dieron lugar a una gran controversia. Esta controversia podría ser el resultado, en algunos casos, de dificultades técnicas a la hora de medir la concentración de OT en suero durante el parto (Mitchell *et al.*, 1998). Sin embargo, incluso con la utilización de técnicas sensibles y específicas, algunos autores no detectaron un aumento en la concentración de OT hasta la expulsión del feto o de la placenta (Higuchi *et al.*, 1985; Higuchi *et al.*, 1986; Thornton *et al.*, 1992). Por el contrario, otros detectaron un aumento en la concentración de OT o en su frecuencia de pulso al principio del parto (Dawood *et al.*, 1978a; Otsuki *et al.*, 1983; Fuchs *et al.*, 1991).

Se sabe que el feto humano sintetiza OT al final del embarazo (Khan-Dawood y Dawood, 1984; Chard *et al.*, 1971; Dawood *et al.*, 1978b; 1979; Dawood, 1983). Por tanto, algunos investigadores han considerado el papel de la OT fetal en el inicio del parto (Chard, 1989).

Así, algunos investigadores concluyeron que el papel de la OT en el parto era al menos facilitadora y que la hormona podría tener un papel más importante en la prevención de la hemorragia postparto y en la eyección de leche durante la lactancia. Sin embargo, más tarde, se volvió a abrir el debate, ya que se observó que el parto era precedido de incrementos nocturnos de contracciones uterinas en varias especies incluyendo algunos primates (Rhesus monkey) (Ducsay *et al.*, 1983; Honnebier *et al.*, 1989) y humanos (Zahn, 1984; Seron-Ferre *et al.*, 1991). Estas contracciones se relacionaban con la concentraciones de OT en el suero materno tanto en estos

primates (Honnebier *et al.*, 1989; Hirst *et al.*, 1991; Seron-Ferre *et al.*, 1991) como en humanos (Fuchs *et al.*, 1982). Así, el debate aún sigue abierto.

Algunos aspectos que provocaban más controversia en cuanto al papel de la OT en el parto, podrían ser algunos estudios que demuestran la expresión del gen de la OT en tejidos periféricos, lo que sugiere un papel autocrino o paracrino más que, o además de, un papel endocrino de la OT durante el parto. Chibbar *et al.* (1993) demostraron la síntesis del ARNm de OT en tejidos intrauterinos en humanos durante las últimas etapas de la gestación y que esta síntesis aumentaba durante el inicio del parto. Varios estudios en ratas han demostrado un patrón similar de aumento en la síntesis de ARNm que codifica para la OT y la propia OT en tejidos intrauterinos al final de la gestación (Lefebvre *et al.*, 1992; 1993). Estas investigaciones estimaron que el total de ARNm que codifica para la OT en tejidos intrauterinos era aproximadamente 70 veces mayor que en la neurohipófisis.

Uno de los descubrimientos en el estudio del parto en varias especies, es el aumento en los receptores de OT antes del inicio del parto. Este aumento fue descrito primero en ratas (Soloff *et al.*, 1979) y más tarde en humanos (Fuchs *et al.*, 1982). Tanto en rata (Pliska, 1988; 1991) como en mujeres, embarazadas o no (Fuchs *et al.*, 1982; Maggi *et al.*, 1990; Maggi *et al.*, 1992; Kimura *et al.*, 1996) se han visto receptores para la OT en el útero. La sensibilidad del útero por la OT es dependiente de la densidad de receptores, así, un aumento en la cantidad de receptores uterinos para la OT provoca un aumento en la respuesta del miometrio a la OT (Zeeman *et al.*, 1997). Existe una respuesta del miometrio a la OT máxima en los momentos inmediatos al parto (Soloff, 1985; Gimpl y Fahrenholz, 2001), por lo que se sugiere que este aumento de la sensibilidad del miometrio uterino a la hormona, podría jugar un papel importante en el parto.

Tanto en ratas como en humanos, los receptores para la OT se encuentran tanto en el endometrio como en el miometrio (Chan, 1980; Fuchs *et al.*, 1982). La estimulación de los receptores de OT en el miometrio por parte de la OT da lugar a un inmediato influjo de Ca^{2+} al interior del citoplasma del miocito desde ubicaciones bien extracelulares (Shimamura *et al.*, 1994) o intracelulares (Phaneuf *et al.*, 1993; Challis *et al.*, 2000). Sin embargo, la OT también podría estimular el endometrio de la rata (Chan, 1980) o las células deciduales humanas (Fuchs *et al.*, 1981; Pasetto *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 1988) para producir prostaglandinas (PG) con acciones uterotrópicas (Ludwig *et al.*, 1998; Burns *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2001). Además, otros estudios (Alexandrova y Soloff, 1980; Chan *et al.*, 1988) en ratas sugieren que las PG son importantes estimuladoras de la síntesis de los receptores de OT. Además es posible que exista un sistema de feedback positivo entre los receptores de OT y las PG en el útero gestante que aumente la contractibilidad miometrial durante el parto.

El receptor de la OT es un receptor de membrana clásico con siete dominios transmembrana enlazados mediante un complejo de proteína G, a un sistema de transducción

fosfolipasa C- protein cinasa C (Phaneuf *et al.*, 1993) (*Figura E.9.*). La inhibición de la salida de Ca^{2+} y la captación concomitante del catión, prolonga el aumento de Ca^{2+} intracelular. Además, el IP_3 producido mediante la fosfolipasa C por acción de la OT (Marc *et al.*, 1986; Carsten y Miller, 1987; Rivera *et al.*, 1990; Sanborn *et al.*, 1998), provoca la liberación de Ca^{2+} de las reservas internas de las células miométriales (Zeeman *et al.*, 1997; Challis *et al.*, 2000). El aumento de Ca^{2+} citoplasmático junto con la calmodulina, incrementan la enzima MLCK (myosin light chain kinase) (Mitchell *et al.*, 1998), que finalmente interviene en el cambio conformacional de las moléculas actina y miosina necesario para la contracción del miometrio (Challis *et al.*, 2000).

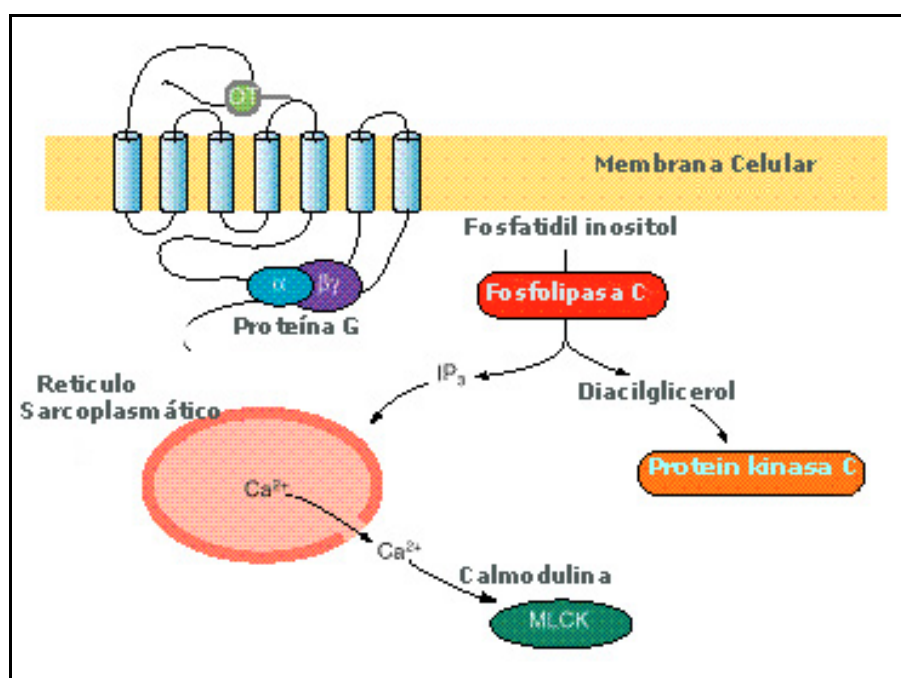
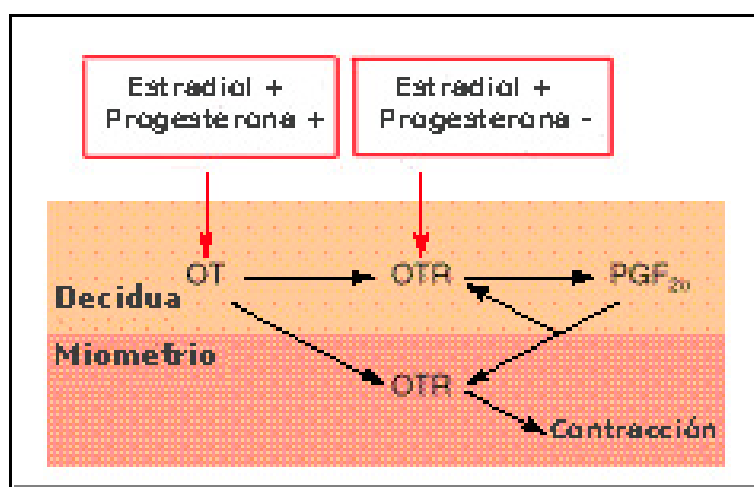


Figura E.9. Mecanismo de acción de la oxitocina sobre el miometrio.

Aunque no existen muchos datos en cuanto a la regulación de la OT intrauterina y la expresión del gen del receptor de la OT, parece ser que tanto estrógenos como progesterona son importantes reguladores. Parece ser que ambos esteroides sexuales tienen efectos positivos sobre la oxitocina (Mitchell *et al.*, 1998), aunque esto varía en cuanto a su acción sobre los receptores de OT, ya que los estrógenos aumentan el número de sus receptores en el útero, mientras que la progesterona inhibe el efecto de los estrógenos (Soloff *et al.*, 1975; Soloff *et al.*, 1983; Adachi y Masataka, 1995). En ratas (Dukes *et al.*, 1974) y en otras especies (Csapo, 1977; Romero *et al.*, 1988; Challis y Lye, 1994), el desencadenante del parto es la disminución de la progesterona en sangre debido a la regresión del cuerpo lúteo, mientras que en humanos no se ha determinado un

descenso de la progesterona (Gimpl y Fahrenholz, 2001) aunque sí se ha visto que la administración de un antagonista del receptor de la progesterona da lugar a un aumento en la actividad uterina y por tanto a la inducción del parto (Avrech *et al.*, 1991). La progesterona suprime la aparición de receptores para OT uniéndose con alta afinidad a ellos (Grazzini *et al.*, 1998). La progesterona podría contribuir a la quiescencia del útero (Burger *et al.*, 1999), que junto con la inhibición por opioides, NO y GABA en neuronas liberadoras de OT, se evita la liberación de OT. Una disminución en la síntesis de progesterona puede, por tanto, aumentar indirectamente la producción de receptores de OT (Figura E.10.).

Figura E.10. Regulación de las hormonas ováricas sobre la pared del útero.



En mamíferos, además de la implicación de la OT en el parto y la lactancia en hembras, en machos, la OT interviene en la eyaculación (Ivell *et al.*, 1987; Ivell *et al.*, 2001) y en la espermatogénesis (Harris y Nicholson, 1998).

3.3.1.3. Vasopresina.

La VP tiene dos acciones fisiológicas principales: como vasopresor, de ahí su nombre, y como hormona antidiurética, promoviendo el movimiento de agua (y Na^+) a través de los tejidos epiteliales que responden a esta hormona (Holmes *et al.*, 2001). Por técnicas de radioinmunoensayo de VP circulante, bajo varias condiciones experimentales y estados fisiopatológicos, se ha obtenido información detallada sobre el papel de la VP en el control del equilibrio hídrico (Robertson *et al.*, 1977). Otras funciones atribuibles a la VP son la estimulación de la glucogenólisis en el hígado y la modulación de la liberación de hormonas adrenocorticotropas desde la hipófisis (Morel *et al.*, 1992).

Como ya se ha comentado, una de las funciones de la VP es su participación en los procesos de osmorregulación. Cuando disminuye la osmolalidad del fluido corporal, los niveles de VP disminuyen, lo que provoca la excreción de agua libre a través de una orina hipotónica. Por el contrario, cuando la osmolalidad del fluido corporal aumenta, se libera AVP, estimulando la retención de agua libre y la excreción de una orina hipertónica (Harris *et al.*, 1991). La osmolalidad del plasma es importante en el control de la secreción de AVP (Robertson *et al.*, 1976; 1977), y las inyecciones de pequeños volúmenes de una solución hipertónica en la arteria carótida del perro provocan la antidiuresis inmediata. Aunque Verney en 1947 (Verney, 1947) postuló osmorreceptores en el hipotálamo, no existe aun consenso sobre su localización. Probablemente existen osmorreceptores en el SON que median en los procesos osmóticos (Andersson, 1971) y podría haber otros osmorreceptores adicionales en otras regiones del SNC, por ejemplo, en órganos circunventriculares (McKinley, 1985; Thrasher, 1985) y en órganos periféricos especialmente en el lecho vascular portal del hígado (Haberich, 1968; Bourque *et al.*, 1994). Actualmente se cree que la función osmorreceptora no es realizada por las células neurosecretoras. Sólo se evoca una respuesta antidiurética cuando se infunden pequeños volúmenes de solución salina hipertónica en lugares situados a cierta distancia de los núcleos supraópticos. La realización de pequeñas lesiones en el área preóptica media del hipotálamo, que no involucran a la neurohipófisis impide la secreción de VP en respuesta a la falta de fluidos. Además, en la hipernatremia adipsica, un síndrome clínico raro, los pacientes presentan una ausencia total de secreción de VP mediada osmóticamente, pero secretan VP en respuesta a estímulos hemodinámicos (barorreceptores). En humanos, los osmorreceptores parecen ser, por tanto, totalmente distintos de las células neurosecretoras y, aparentemente, no son un componente integral de las vías por las que la secreción de VP es afectada por variables hemodinámicas (Robertson *et al.*, 1977).

En resumen, el mecanismo de control de los osmorreceptores está cerca de los cuerpos celulares de las neuronas neurohipofisarias, aunque no es idéntico ni se encuentra entremezclado con ellos. Dado que la liberación de VP mediada osmóticamente puede ser completamente eliminada sin alterar de ninguna forma la respuesta hormonal a la hipotensión, queda excluida la posibilidad de que se transmitan estímulos hemodinámicos a la neurohipófisis mediante neuronas osmorreceptoras. Posiblemente las células neurohipofisarias secretoras de VP son heterogéneas; es decir, están divididas en diferentes grupos que reciben aferencias de los sistemas osmorregulador y barorregulador. Si fuera así, cabría esperar que la función de un grupo no tuviera efecto sobre el otro. Este no es el caso. Además, los registros electrofisiológicos de células neurosecretoras del hipotálamo anterior y lateral revelaron que las frecuencias de disparo podían ser alteradas tanto por estímulos de volumen como por estímulos osmóticos.

En los individuos normales el osmostato parece estar ajustado de forma que la secreción de VP se suprime hasta niveles bajos o indetectables siempre que la osmolalidad del plasma baja a niveles de 280 mOsm/Kg o inferiores (Robertson *et al.*, 1976; Kumar y Berl, 1998). Por encima

de esta concentración la secreción de VP aumenta en proporción directa con la osmolalidad, ejerciendo una antidiuresis máxima a una osmolalidad en plasma de 295 mOsm/Kg. Cambios en la osmolalidad del plasma del orden del 1% aumentarán o disminuirán los niveles de VP en plasma y afectarán la osmolalidad urinaria, lo que sugiere que los osmorreceptores son extraordinariamente sensibles a los cambios en la concentración de electrolitos en sangre. Los osmorreceptores muestran especificidad por ciertos solutos. Por ejemplo, una solución hipertónica salina o de sacarosa induce una respuesta antidiurética mientras que una de urea o glucosa no la provoca. Dado que el Na^+ contribuye normalmente en un 90 % de la actividad osmótica del plasma, cabe esperar que los osmorreceptores funcionen principalmente en la detección de cambios en la osmolalidad del Na^+ (Robertson *et al.*, 1977).

Por otro lado, la VP también participa en la regulación del volumen-presión de la sangre, causando vasoconstricción y aumentando la presión sanguínea (Reid y Schwartz, 1984). De hecho, los cambios en el volumen y presión sanguínea afectan la secreción de VP (Chauvet *et al.*, 1991). Las influencias hemodinámicas se ejercen vía aferencias nerviosas originadas en receptores sensibles a la presión (barorreceptores) localizados en la aurícula izquierda del corazón, el arco aórtico y el seno carotídeo (Yamashita, 1977). Los estímulos aferentes en respuesta a un cambio en el volumen o la presión de la sangre alcanzan el tallo cerebral a través de los nervios vago y glossofaríngeos (Robertson y Berl, 2000). No se han identificado las vías centrales que integran estas señales, pero pueden involucrar una sinapsis medial posterior del hipotálamo.

En ratas, no se han detectado aumentos significativos en la VP plasmática hasta que el volumen sanguíneo se reduce en más de un 8 %. La relación entre la VP y el volumen sanguíneo en humanos sigue un modelo exponencial similar al de las ratas. Bajo condiciones menos fisiológicas como una hemorragia, la VP causa una antidiuresis máxima y puede ejercer importantes efectos presores sobre ciertos lechos vasculares (Fox, 1988). En humanos y otros animales existe una relación exponencial entre los niveles plasmáticos de VP y el grado de hipotensión producida. Tras una reducción en la presión arterial media del orden de un 5 % sobreviene una intensificación en la secreción de VP. El volumen y la concentración de Na^+ también puede afectar la secreción de esta hormona a través del sistema renina-angiotensina. La angiotensina II puede actuar sobre el cerebro para estimular la secreción de VP (Kadekaro *et al.*, 2001). Por tanto, un complejo conjunto de factores controla la secreción de la hormona y por tanto, el equilibrio de agua y electrolitos.

La VP central puede desempeñar un papel en el control de la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca tanto en animales normotensos como hipertensos (Robinson y Fitzsimmons, 1993). La administración de VP en el SNC produce cambios en la presión arterial y la frecuencia cardíaca que pueden ser revertidos por antagonistas competitivos de los receptores. La VP también es un potente factor de liberación de corticotropina (Antoni, 1993; Aguilera, 1994) y corticosterona (van-Acker *et al.*, 2002) que a su vez, también actúa sobre el sistema cardiovascular

(Mircic *et al.*, 1998). La administración central de VP produce respuestas cardiovasculares atribuibles a la estimulación de la eferencia simpática (Hasser *et al.*, 1997). La hormona puede, en los primeros momentos de la hipertensión, alterar las salidas simpáticas a través de un efecto sobre estructuras nerviosas centrales que controlan el SNC. La administración central de VP también provoca un incremento en la frecuencia cardíaca; de este modo, el péptido parece superar la capacidad del reflejo barorreceptor para tamponar cambios en la presión arterial (Duflot *et al.*, 1997). La VP puede, por lo tanto, participar en el reajuste del reflejo barorreceptor en la hipertensión y alterar la salida simpática mediante efectos sobre el sistema del reflejo barorreceptor (Bern *et al.*, 1985).

Los receptores de vasopresina muestran diversidad en sus propiedades farmacológicas, funcionales y biológicas. Se distinguen cuatro subtipos de receptores en base a sus propiedades funcionales y/o farmacológicas (Morel *et al.*, 1993). El receptor renal de VP (tipo V_2) que media la respuesta antidiurética (Birnbaumer, 2001) fue uno de los primeros receptores en los que se demostró un acoplamiento con la adenilato ciclasa. Los receptores de VP hepáticos y vasculares (tipo V_{1a}) (Inoue *et al.*, 2001) y de la adenohipófisis (tipo V_{1b}) (Morel *et al.*, 1992) y los receptores de OT (Thibonnier *et al.*, 1998) del útero y de la glándula mamaria actúan a través del aumento en el recambio de inositol para movilizar calcio intracelular (Barberis *et al.*, 1993). La señalización transmembrana inmediata de los receptores vasculares V_1 de VP implica la formación del complejo ligando-receptor; la movilidad lateral del receptor y su incorporación por endocitosis, el acoplamiento a una proteína G_q ; la activación de las fosfolipasas A_2 , C y D; la translocación y activación de proteincinasa C; la producción de IP_3 y DG; la movilización de Ca^{2+} intracelular; la alteración de pH intracelular con activación del intercambiador Na^+/K^+ ; la activación de la calmodulina y la fosforilación de la cadena ligera de miosina (Teitelbaum, 1992; Birnbaumer, 2001). Los mecanismos secundarios de señal nuclear desencadenados por la activación de receptores vasculares de VP V_1 incluyen la fosforilación de la tirosina, la inducción de expresión génica y la síntesis de proteína (Thibonnier, 1992).

Datos obtenidos de distintas especies animales indican y concluyen que la vasopresina participa en la regulación tanto de la corteza como de la médula adrenal, una influencia que puede estar mediada por la VP liberada en la hipófisis, o por la liberada en la propia glándula adrenal. Una de las formas de regulación es mediante el diacil glicerol, el cual activa a la proteína cinasa C que, junto con el calcio, es responsable de la secreción de esteroides (Gallo-Payet y Guillon; 1998).

La VP y la OT tienen propiedades farmacológicas que se solapan. Por tanto, el empleo de agonistas más específicos es útil para determinar si los receptores de OT o los de VP pueden estar implicados en una determinada respuesta biológica. Independientemente de las propiedades farmacológicas de un receptor de VP, éste sólo puede ser clasificado definitivamente basándose en el segundo mensajero celular que evoca su activación. Aunque se dispone de varios

antagonistas específicos, estos raramente son útiles por sí solos para identificar tipos de receptores. Sin embargo, mediante la utilización de antagonistas se pueden ver diferencias, entre receptores, que no quedan claras en los estudios que utilizan sólo agonistas. Por ejemplo, uno de estos estudios mostró que los receptores V_{1b} de las células adenohipofisarias difieren farmacológicamente de los receptores V_{1a} de los hepatocitos o de las células musculares lisas vasculares, aunque tienen un sistema de segundo mensajero similar (Sawyer y Manning, 1989).

Los receptores V_2 de la vasopresina están localizados principalmente en la membrana basolateral de las células del túbulo colector del riñón (Carmichael y Kumar, 1994). La unión de vasopresina a estos receptores dan lugar a la activación de la adenilato ciclasa y consecuentemente a la generación de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Knepper, 1997; Inoue *et al.*, 2001). El efecto principal de la vasopresina en el riñón, un descenso en la eliminación de agua debido a un aumento en la permeabilidad (Handler *et al.*, 1965; Grantham y Burg, 1966), se consigue mediante el transporte de los canales de agua aquaporina 2 desde vesículas citoplasmáticas hacia la membrana apical del túbulo colector donde son insertados (Nielsen *et al.*, 1995). En la membrana apical, estos canales de agua facilitan el transporte de agua a través de las células del túbulo colector en respuesta a gradientes osmóticos (Kalra *et al.*, 2001). Además la vasopresina aumenta la síntesis de los canales de agua aquaporina 2 (Terris *et al.*, 1996) (Figura E.11.).

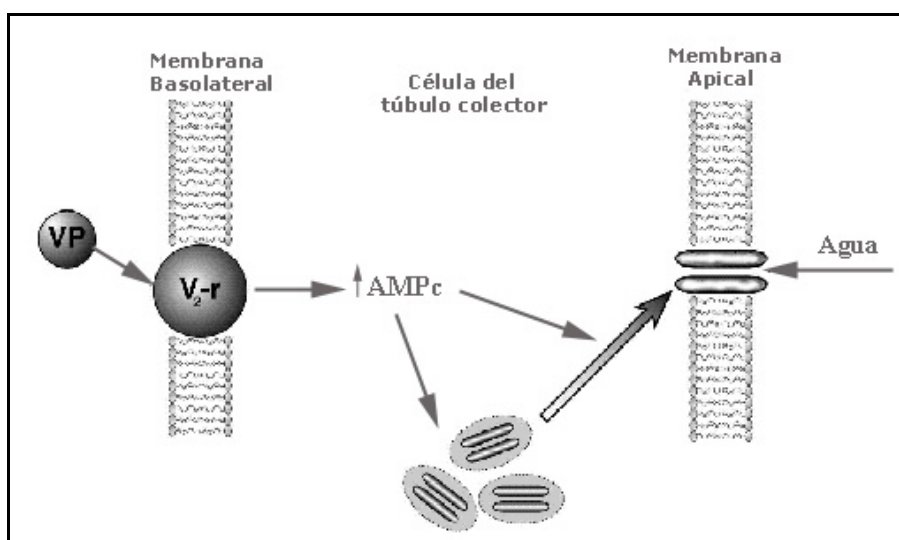


Figura E.11. Efecto de la vasopresina sobre los canales de agua aquaporina 2.

La VP tiene otros efectos en el riñón, aumentando la reabsorción de urea en la porción final del túbulo colector en la zona medular, y de sodio en el segmento cortical (Reif *et al.*, 1986; Sands *et al.*, 1987; Ecelbarger *et al.*, 2001) (*Figura E.12.*).

Se ha comprobado que la vasopresina en circulación influye directamente en la síntesis de receptores V_2 en las células de los túbulos colectores, de modo que en ausencia de vasopresina, hay un descenso en el número de receptores V_2 (Laycock y Hanoune. 1998).

Experimentos realizados mediante gonadectomía y reemplazamiento selectivo hormonal, mostraron la existencia de diferencias sexuales debidas al estradiol, el cual atenúa la acción antidiurética de la VP, mientras que la progesterona y los esteroides masculinos parecen no influenciar en esta acción (Wang *et al.*, 1994b; Wang *et al.*, 1995; Bankir *et al.*, 2001).

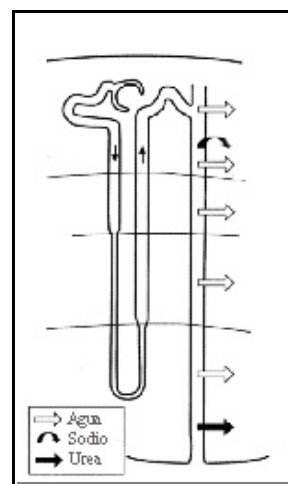
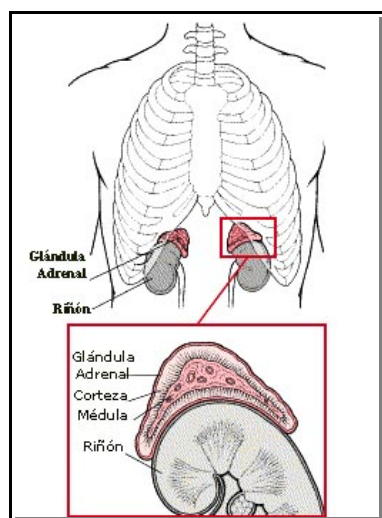


Figura E.12. Efectos de la vasopresina en el túbulo colector de mamíferos.

3.4. Glándulas adrenales.



Las glándulas adrenales se encuentran situadas sobre la superficie superior de cada riñón. Están formadas por tejido esteroidogénico y por tejido cromafín. En muchos mamíferos, el tejido esteroidogénico forma una masa cortical que rodea un componente medular interior de tejido cromafín. Tanto en humanos como en otros animales, estos componentes tisulares reciben los nombres de corteza adrenal y médula adrenal respectivamente (*Figura E.13.*). Sin embargo, en muchos vertebrados, incluidos algunos mamíferos, ambos tejidos se encuentran mezclados y en otros forman masas tisulares totalmente independientes (Holmes y Phillips, 1976; Callard y Callard, 1978).

Figura E.13. Localización general anatómica de las glándulas adrenales humanas.

3.4.1. SÍNTESIS DE HORMONAS ADRENALES.

El colesterol, un esteroide de 27 átomos de carbono, es el precursor de la biosíntesis tanto de los esteroides gonadales como de los adrenales (Parker y Schimmer, 1993). La esteroidogénesis requiere la síntesis de la proteína StAR (steroidogenic acute regulatory protein) cuya función es transportar colesterol desde el exterior al interior de la membrana mitocondrial de células esteroidogénicas (Christenson y Strauss, 2001). Esta proteína es expresada en tejidos esteroidogénicos en respuesta a agentes que estimulan la producción de esteroides (Stocco, 2001). La primera etapa de la vía biosintética de la esteroidogénesis requiere la escisión de los seis carbonos terminales de la cadena lateral de colesterol, dando pregnenolona como resultado. El sistema desmolasa (citocromo P450_{scc}), también llamado más recientemente CY11A1, es necesario para la escisión de la cadena lateral. Esta transformación es un paso importante en el control de la actividad de las hormonas suprarrenales. Desde la pregnenolona, diversas vías (Manson, 1993) conducen a la formación de metabolitos intermediarios, que dan lugar, finalmente a las hormonas características de la especie (*Figura E.14.*). Las hormonas esteroides de las glándulas adrenales pueden catalogarse en tres grupos funcionales: glucocorticoides, mineralcorticoides y hormonas sexuales (andrógenos, estrógenos y progestágenos).

La mayor parte del colesterol adrenal se obtiene a partir del colesterol plasmático, en lugar de por síntesis intracelular como se creía antiguamente (Brown *et al.*, 1979). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son los mayores complejos de transporte de colesterol en el plasma humano (Liu *et al.*, 2000). Los ésteres de colesterol, junto con triglicéridos se empaquetan en partículas lipoproteicas donde forman un centro hidrófobo rodeado de una capa de fosfolípidos polares y una pequeña cantidad de proteínas llamadas apolipoproteínas. Estas se unen a los receptores LDL de las células diana adrenales, que pueden estimular la endocitosis y el transporte de las lipoproteínas al interior de las células, un hecho que se refuerza por la ACTH. Tras la unión al receptor, las lipoproteínas son introducidas por endocitosis mediada por el receptor y catabolizadas por lisosomas (Grossman y Wilson, 1992). El número de lugares de unión para LDL es máximo en las membranas de la corteza adrenal y en el cuerpo lúteo ovárico, dos tejidos que sintetizan esteroides y que, por ello, requieren grandes cantidades de colesterol.

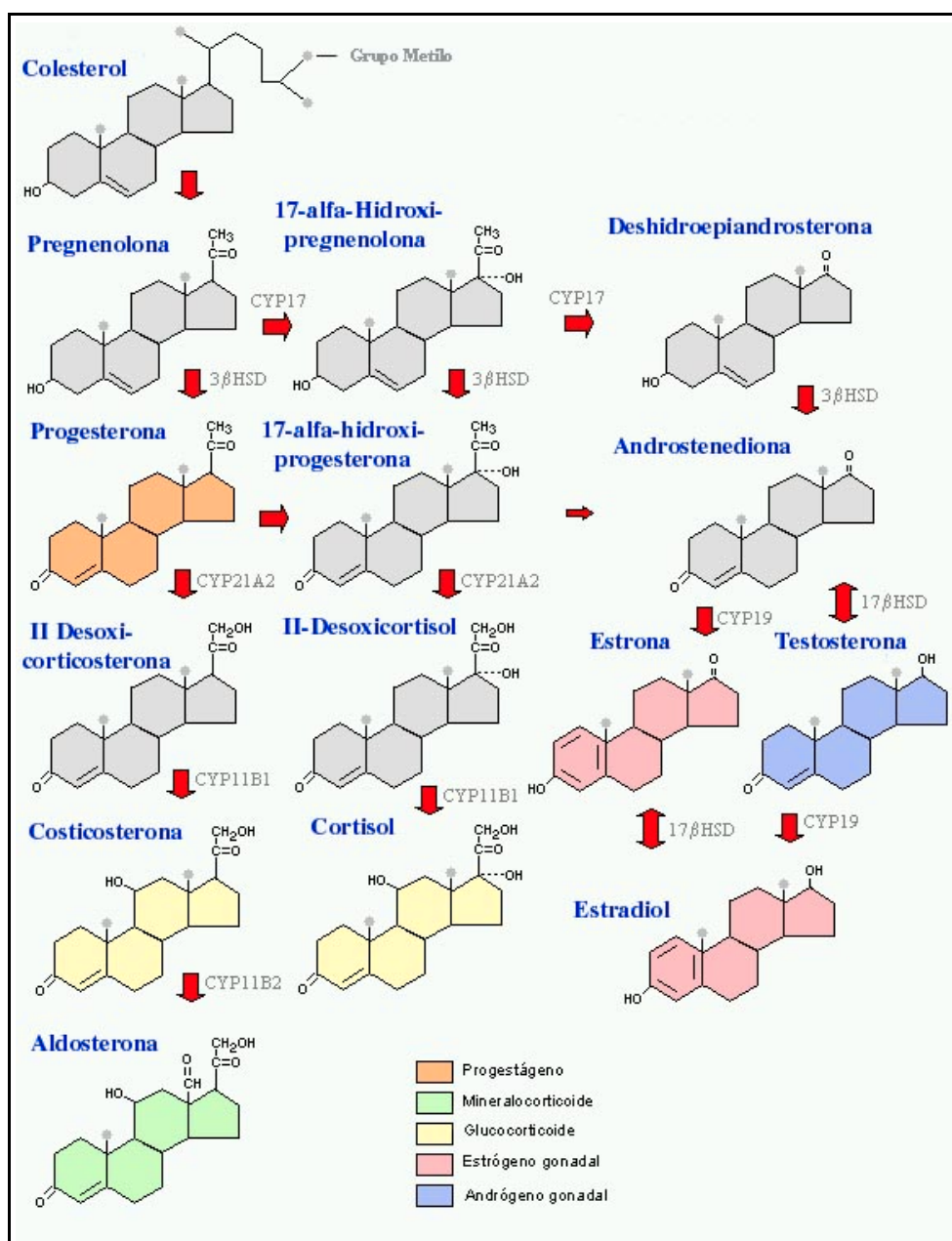


Figura E.14. Vías biosintéticas de las hormonas esteroides. (CYP11A1: Desmolasa; 3β-HSD: 3-β-OH-Deshidrogenasa; CYP17: 17α-Hidroxilasa; CYP21A2: 21-Hidroxilasa; CYP11B1: 11-β-Hidrolasa; CYP11B2: Aldosterona sintasa.).

En 1973, Brown, Goldstein y colaboradores, trabajando con fibroblastos humanos en cultivo demostraron que la endocitosis mediada por receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) constituye el elemento regulador de la homeostasis celular del colesterol. La secuencia completa de los eventos metabólicos asociados con la unión, captación y degradación de estas partículas proteicas ricas en colesterol por las células de mamífero se ha llamado la “vía del receptor LDL” (Brown *et al.*, 1979). Este proceso es muy importante porque suministra el esteroide a las células mediando en la eliminación de la circulación de las lipoproteínas ricas en él. Además protege a las células de su acumulación excesiva, ya que el que deriva de la hidrólisis lisosomal de sus ésteres LDL ejerce una serie de mecanismos de control por retroacción diseñados para mantener un nivel constante de colesterol en la célula. Así, concentraciones extracelulares de LDL altas reducen la síntesis celular de colesterol, suprimiendo las actividades de la 3-hidroxi-, 3-metil-glutaril-CoA sintasa y de la reductasa (enzimas limitantes en la síntesis del esteroide), estimulan la reesterificación, y disminuyen el número de receptores de LDL evitando la entrada de colesterol a la célula (Schneider, 1990). En estado basal, la cantidad de colesterol que recibe la célula gracias a las LDL se compensa con la conversión de éste a hormonas esteroideas que se segregan a continuación. La reserva metabólicamente activa de colesterol libre se obtiene de la internalización de LDL, de la síntesis endógena (a través de acetil CoA) y de la hidrólisis de sus ésteres. En la respuesta a la ACTH se produce un incremento de la síntesis intracelular de colesterol conjuntamente con la hidrólisis de sus ésteres presentes, observándose un aumento de la esteroidogénesis (Imai *et al.*, 2001). Las reservas endógenas de colesterol esterificado son limitadas, y la síntesis endógena de colesterol vuelve aparentemente pronto a los niveles basales; en consecuencia, las lipoproteínas extracelulares deben proporcionar el colesterol necesario para el mantenimiento de la biosíntesis continua de hormonas esteroideas. Esto puede conseguirse, aparentemente, mediante un incremento de los receptores para LDL (Figura E.15.).

La biosíntesis de hormonas esteroideas está íntimamente regulada por hormonas de la hipófisis y por otros estímulos esteroidogénicos. Por ejemplo, se ha visto un incremento significativo en la esteroidogénesis en la corteza adrenal con el aumento de la expresión de LH (Kero, 2000). También se ha observado que hormonas como la ACTH y otras gonadotropinas, inducen la esteroidogénesis a través de la inducción de AMPc, que a su vez estimula la actividad de CYP11A1 y de la proteína StAR (Miller y Strauss, 1999).

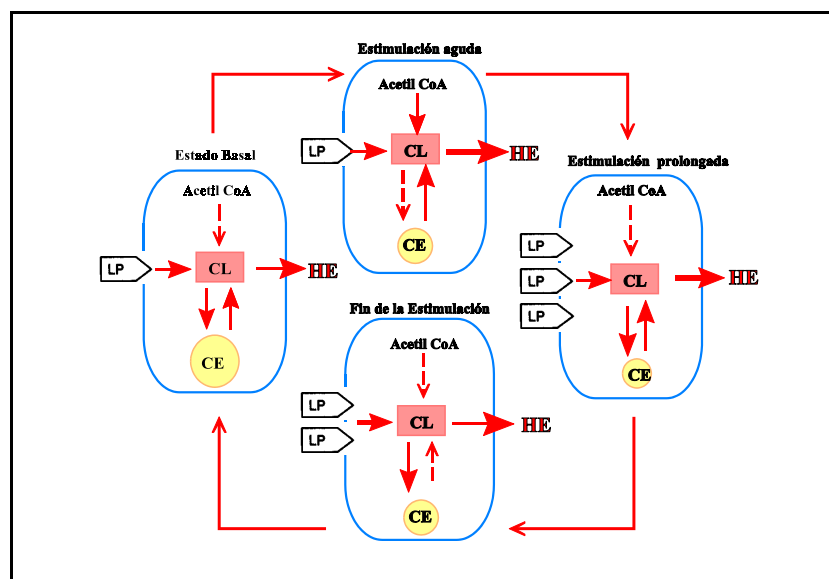


Figura E.15. Modelo para la homeostasis del colesterol en las adrenales. CE: Colesterol esterificado; CL: Colesterol libre; HE: Hormonas esteroides; LP: Lipoproteína.

En la presente memoria nos centraremos únicamente en aquellas hormonas relacionadas con las aminopeptidasas.

3.4.2. ALDOSTERONA.

Durante muchos años se sabía que la insuficiencia adrenal estaba asociada con hipovolemia y colapso circulatorio, pero no fue hasta 1953 cuando Simpson (Simpson, 1953) describió por primera vez una nueva hormona adrenal que retenía sales, la aldosterona (*Figura E.16.*). Ésta se sintetiza a partir del colesterol mediante una serie de hidroxilaciones y oxidaciones (Boon *et al.*, 1997). Estudios *in vitro* demostraron que la aldosterona es secretada en la zona glomerulosa de la corteza adrenal (Giroud *et al.*, 1956; Ayres *et al.*, 1956; Foster *et al.*, 1997). El control de la secreción de aldosterona es complicado y están involucrados tanto hormonas como electrolitos (Lumbers, 1999). La angiotensina II (Ang II) (Granger y Schnackenberg, 2000; Takada *et al.*, 2001), los niveles de ACTH (Muller, 1998), la DA (Bek *et al.*, 2001), el péptido natriurético atrial (ANP) (Ganguly y Davis, 1994; Lumbers, 1999) y otros péptidos hipofisarios, así como las concentraciones plasmáticas de Na^+ y K^+ (Brochu *et al.*, 1998; Lumbers, 1999) son algunos de los numerosos factores que intervienen en la regulación de la secreción de aldosterona.

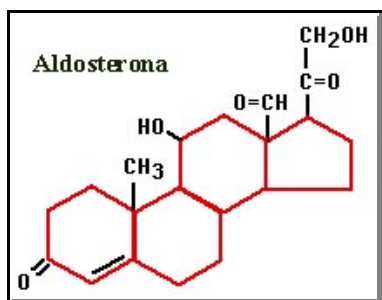


Figura E.16. Fórmula de la aldosterona.

La Ang II es el principal regulador de la secreción de aldosterona a través del sistema integrado renina-angiotensina-aldosterona. La Ang II, es un octapéptido que a su vez deriva de un decapeptido, angiotensina I, mediante la acción de un enzima de conversión (ACE; EC: 3.4.15.1.), una zinc metaloproteínasa que hidroliza el dipéptido carboxiterminal His-Leu (Johnston, 1990). La angiotensina I deriva de una proteína precursora, el angiotensinógeno (o sustrato de la renina), que se origina en el hígado (Boon *et al.*, 1997). La conversión del angiotensinógeno a angiotensina I se produce por la acción de un enzima, la renina (EC: 3.4.23.15) (Peart, 1969), que se libera por unas células granulares especiales, las células yuxtaglomerulares que se encuentran situadas en la pared de la arteriola eferente del polo vascular del glomérulo renal. Aunque clásicamente se ha considerado la Ang II como el péptido efector del RAS, no es el único péptido activo. Varios de sus productos de degradación, incluyendo la angiotensina III (Ang III) y la angiotensina IV (Ang IV) también poseen funciones biológicas (Ramírez-Expósito *et al.*, 2001). Estos péptidos se forman por la actividad de varias aminopeptidasas (Chansel y Ardaillou, 1998). Así, la Ang III se obtiene por la ruptura del residuo aspártico N-terminal por la glutamil aminopeptidasa (GluAP) y la aspártico aminopeptidasa (AspAP). Ambas son conocidas como aminopeptidasa A (APA) o angiotensinasa. La Ang III es rápidamente transformada en Arg IV por la arginil aminopeptidasa (ArgAP o APB) o alanil aminopeptidasa (AlaAP o APM) (McDonald y Barret, 1986; Ward *et al.*, 1990). Algunas endopeptidasas se encargan de eliminar residuos de la Ang IV produciendo fragmentos peptídicos más pequeños y constituyentes aminoacídicos (Unger *et al.*, 1988; Saavedra, 1992; Radhakrishnan y Sim, 1995; Chalas y Conway, 1996)(Figura E.17).

Se han descrito fuentes extrarrenales de renina en cerebro, útero, glándulas adrenales (Phillips *et al.*, 1993) y placenta (Lumbers, 1999). El enzima que convierte la angiotensina I se ha podido localizar en distintos lechos vasculares, lo que sería indicativo de un papel de las angiotensinas en la regulación de los flujos sanguíneos a nivel local. Estos lugares de producción extrarrenal de angiotensina forman los llamados sistemas de angiotensinogenasa tisular (Ganong, 1993; Guillery y Robillard, 1993).

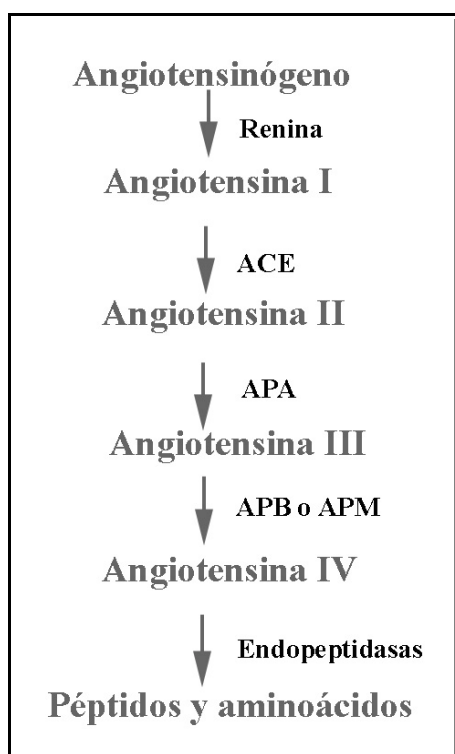


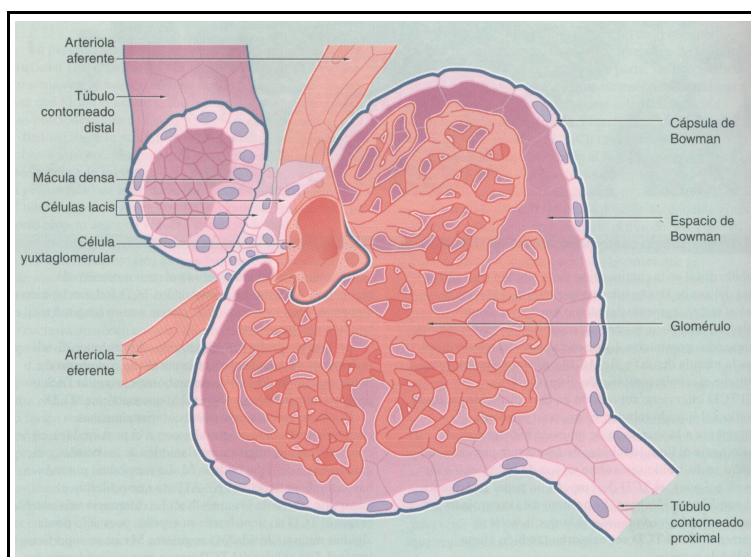
Figura E.17. Metabolismo de la angiotensina.

Los constituyentes del sistema renina-angiotensina (RAS) han sido localizados en tejidos cerebrales (Fisher-Ferraro *et al.*, 1971; Ganten y Speck, 1978; Phillips *et al.*, 1979; Ganten *et al.*, 1983; Ganong, 1984; Moffett *et al.*, 1987; Phillips, 1987; Phillips *et al.*, 1993). Dado que el angiotensinógeno, Ang I, Ang II y Ang III no atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica (Van Houten *et al.*, 1983; Printz, 1988; Harding *et al.*, 1988), estas moléculas no parecen proceder del RAS periférico. El RAS cerebral y el sistema angiotensina de la hipófisis (Ganong *et al.*, 1989; Deschepper, 1991; Saavedra, 1992; Ganong, 1993) influyen significativamente en la regulación de la homeostasis cardiovascular y de fluidos, la ciclicidad

de las hormonas reproductivas y el comportamiento sexual, y la liberación de VP (Phillips, 1987; Lind, 1988; Unger *et al.*, 1988; Ferguson y Wall, 1992; Wright y Harding, 1992; Hogarty *et al.*, 1994; Raizada *et al.*, 1994; Fitts y Thunhorst, 1996; Phillips, 1996).

la renina se secreta como respuesta a la hipovolemia o a un incremento de la osmolaridad de la sangre (Hackenthal *et al.*, 1990). Se cree que el aparato yuxtaglomerular (*Figura E.18.*) actúa a la vez como barorreceptor y como quimiorreceptor, controlando la presión arterial a través de la secreción de renina por las células yuxtaglomerulares (Churchill, 1988; Carey *et al.*, 1997). Estas células se encuentran en un lugar idóneo para vigilar la presión arterial sistémica, cuya caída determina la producción de renina. El descenso de la presión arterial reduce la filtración glomerular y, por tanto, la concentración de iones de sodio que llega al túbulo contorneado distal. Actuando como quimiorreceptores, las células de la mácula densa estimulan de alguna forma la secreción de renina (Lumbers, 1999) (*Figura E.19.*). El aparato yuxtaglomerular consta de tres componentes, la mácula densa del túbulo contorneado distal, las células yuxtaglomerulares secretoras de renina de la arteriola eferente y las células mesangiales extraglomerulares.

Figura E.18. Localización del aparato yuxtaglomerular.



La secreción de renina está regulada, también por el sistema nervioso autónomo (SNA). La secreción de renina se incrementa como respuesta a la estimulación nerviosa simpática (Dibona, 2001), y las catecolaminas estimulan la liberación de renina en láminas de riñón incubadas *in vitro*. Bajas concentraciones de noradrenalina estimulan directamente la liberación de renina por las células yuxtaglomerulares mediante la activación de β -adrenoceptores, mientras que altas concentraciones de noradrenalina inhiben la liberación de renina por la actuación de los $\alpha 1$ -adrenoreceptores (Takagi *et al.*, 1992).

La contracción de fibras musculares lisas vasculares, la liberación de aldosterona por la glándula adrenal y la reabsorción de Na^+ en el túbulo renal fueron las primeras acciones biológicas atribuidas a la angiotensina II (Luft, 2001). En el interior del riñón la Ang II actúa como vasoconstrictor (Badzyska *et al.*, 2002). Tanto la resistencia de la arteriola aferente como la de la eferente están moduladas por ella, y estas acciones afectan a la tasa de filtración glomerular.

Es bien conocida la presencia de un completo RAS en la glándula adrenal, probablemente involucrado en la regulación local paracrina de la secreción de aldosterona (Mulrow, 1992; Vinson, 1995; Mulrow y Franco-Sáez, 1996; Mazzocchi *et al.*, 2000).

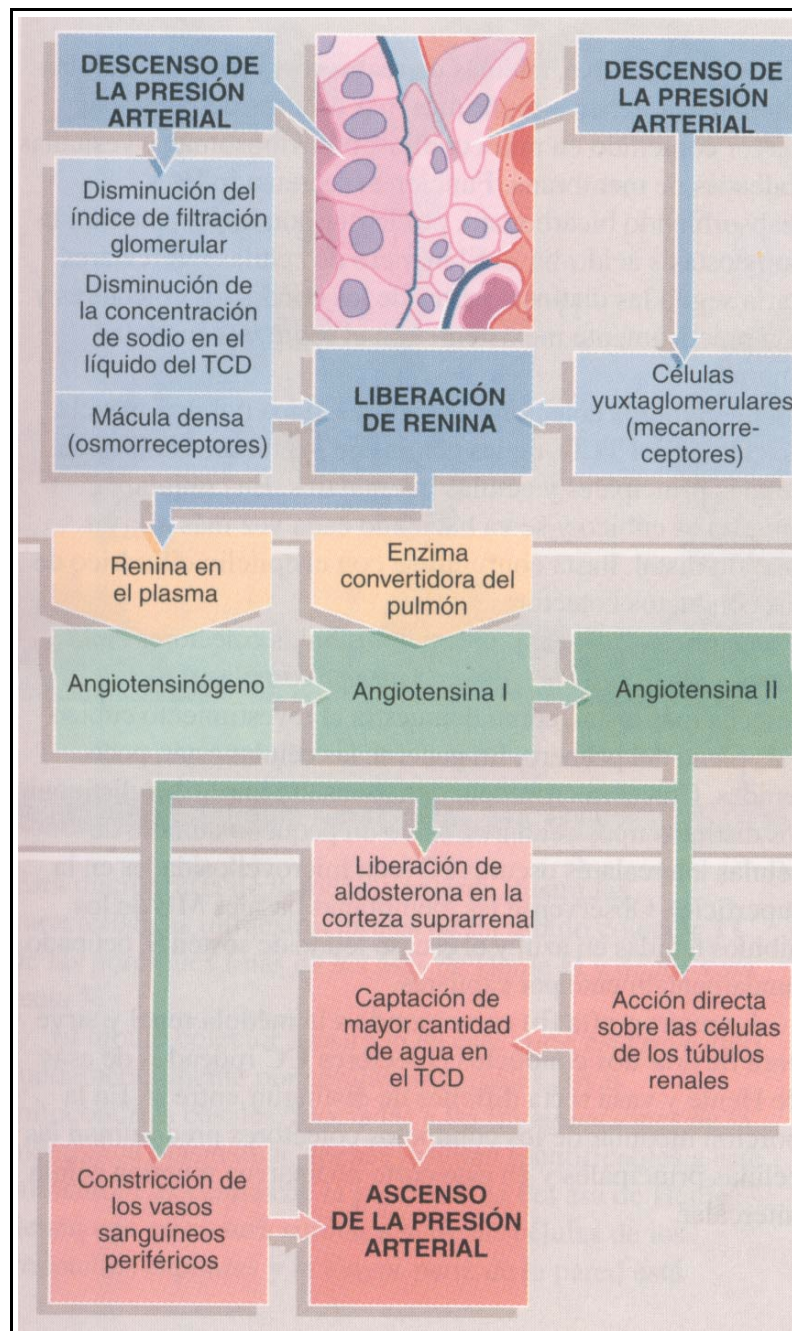


Figura E.19. Sistema de control de la presión arterial. TDC: Túbulo contorneado distal.

La aldosterona actúa a nivel de los túbulos contorneados distales y posiblemente, pero en menor grado, en los conductos colectores corticales del riñón (Ichikawa y Harris, 1991). La concentración de aldosterona en plasma está en relación inversa a la de Na^+ (Mulrow, 1999). Si la concentración de Na^+ aumenta, la de aldosterona disminuye y se excreta Na^+ . Si por el contrario, el Na^+ del organismo disminuye, la aldosterona aumenta, incrementándose la reabsorción de Na^+ por parte de las células renales epiteliales (Al-Baldawi *et al.*, 2000). Por lo tanto, aumenta la osmolaridad sanguínea, lo que a su vez, estimula la secreción de VP y la recuperación renal de agua, aumentando el volumen plasmático y la perfusión renal, que frenará la producción de renina por parte de las células yuxtaglomerulares. El incremento de las concentraciones plasmáticas de Na^+ puede ser un estímulo inhibitorio directo de la secreción posterior de aldosterona (Hollenberg *et al.*, 1974). El K^+ plasmático se comporta de manera opuesta al Na^+ (Boyd *et al.*, 1973). Pequeños aumentos en su concentración desencadenan la secreción de aldosterona de forma directa e independiente de la concentración de Na^+ . El descenso del K^+ plasmático inhibe la secreción de aldosterona, por tanto, una concentración alta de K^+ es un estímulo directo para la secreción de aldosterona (Lumbers, 1999; Booth *et al.*, 2002). Además de su acción sobre las células de la zona glomerulosa, la Ang II estimula la vasoconstricción, y esta respuesta vasopresora, adaptativa, provoca la elevación de la presión sanguínea. Neuronas sensoriales aferentes responden ante la vasoconstricción y, mediante un mecanismo reflejo, inhiben la estimulación simpática de la secreción de renina. La ACTH modula la secreción basal de aldosterona de forma permisiva al activar el paso de colesterol a pregnenolona, como ya se vio para la síntesis de hormonas esteroideas en general (Foster *et al.*, 1997; Miller y Strauss, 1999).

3.4.3. MECANISMO DE ACCIÓN.

3.4.3.1. Aldosterona.

Se ha comprobado que la aldosterona, al igual que otras hormonas esteroideas como los estrógenos, regulan el transporte de iones en las células del túbulo contorneado distal (Reilly y Ellison, 2000). Tanto el riñón como la vejiga urinaria de sapo se han usado en estudios sobre el mecanismo de acción de la aldosterona (Minuth *et al.*, 1988).

La aldosterona es la principal hormona que regula el balance de Na^+ , el volumen extracelular y la presión sanguínea (Funder, 1993; Barbry y Lazdunski, 1996; Garty y Palmer, 1997). La aldosterona incrementa la tasa de reabsorción de Na^+ en el epitelio de la nefrona distal, colon distal y en los conductos de glándulas exocrinas incrementando el transporte a través del canal epitelial de Na^+ , uno de las principales dianas fisiológicas de la aldosterona (Rossier, 1997; Verrey, 1999). La regulación de los canales epiteliales de Na^+ por la aldosterona ha sido profusamente estudiada en la línea celular renal A6 (May *et al.*, 1997; Narikiyo *et al.*, 2002). Poco es conocido sobre el mecanismo de acción de la aldosterona excepto que se requiere de la expresión génica

y de la síntesis proteica y que el resultado final es un aumento en el transporte de Na^+ (Blazer-Yost *et al.*, 1982; Garty y Edelman, 1983; Mintz *et al.*, 1986). Ha habido muchas sugerencias sobre modificaciones postranslacionales inducidas por la aldosterona y según algunos resultados (Stockand *et al.*, 1999a; b; Becchetti *et al.*, 2000) una de ellas resulta particularmente interesante. Algunos resultados (Sariban-Sohraby *et al.*, 1984) demostraron que la aplicación de aldosterona da lugar a metilación de las proteínas y lípidos de membrana y que las metiltransferasas intracelulares inducidas por aldosterona podrían ser responsables de la metilación y de modular los canales de Na^+ . La metilación proteica resulta ser esencial para el transporte (Al-Baldawi *et al.*, 2000). La aldosterona también estimula la síntesis de ácidos grasos y la renovación de los lípidos de membrana en la vejiga urinaria del sapo. La alteración de los componentes lipídicos de las membranas por la aldosterona puede ser un componente importante de su mecanismo de acción (Goodman *et al.*, 1971; Goodman *et al.*, 1975; Wiesmann *et al.*, 1985; Mrnka *et al.*, 2000). También se ha demostrado que la VP posee acciones en el riñón tanto antidiuréticas (Grantham y Burg, 1966; May *et al.*, 1997) como antinatriuréticas (Grantham y Burg, 1966; Reif *et al.*, 1984; Wittner *et al.*, 1991).

3.4.3.2. Angiotensina II.

La Ang II ejerce su acción en sus órganos diana mediante receptores en la membrana plasmática (Catt *et al.*, 1993). La disponibilidad reciente de antagonistas puros de la angiotensina II ha permitido establecer, por lo menos, dos tipos de receptores de angiotensina, los tipos AT_1 (con dos subtipos: AT_{1A} y AT_{1B}) (Kambayashi *et al.*, 1993; Mukoyama *et al.*, 1993) y AT_2 (Wong *et al.*, 1992; Timmermans *et al.*, 1993). Además, otros receptores para la angiotensina han sido identificados que podrían reconocer otros fragmentos del péptido angiotensina; sin embargo, sólo los receptores AT_1 y AT_2 han sido clonados y secuenciados (Murphy *et al.*, 1991; Sasaki, 1991). La mayoría de las acciones mejores descritas para la angiotensina II, como la secreción de aldosterona desde la adrenal, respuestas presoras y taquicárdicas, incremento de la ingestión de agua y contracción de la fibra muscular lisa de algunos vasos, son mediados por el receptor AT_1 (Dihn *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 2001). En general, la mayoría de las acciones biológicas de la Ang II están mediadas por el receptor AT_1 y probablemente a través de AT_{1A} excepto en las glándulas adrenales, donde el control de la secreción de aldosterona parece estar mediado por el AT_{1B} (Gigante *et al.*, 1997). Poco es conocido sobre la función del receptor AT_2 , pero estudios recientes sugieren que podría jugar un papel importante en antiproliferación, diferenciación celular, apoptosis, vasodilatación (Dihn *et al.*, 2001) y en general, en etapas fetales (Lumbers, 1999).

**II. HIPÓTESIS Y
PLANTEAMIENTO.**

El eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales es uno de los sistemas reguladores neuroendocrinos más importantes, y como su nombre indica, consiste en un bucle de retroalimentación que incluye al hipotálamo, la hipófisis y las glándulas adrenales. El eje está sujeto a una influencia de los esteroides sexuales, como indican las diferencias sexuales encontradas tanto en las funciones basales del eje como en las funciones relacionadas con el estrés, así como por las neuropatologías asociadas a las disfunciones del eje. Por tanto, las diferencias observadas entre machos y hembras reflejan diferentes efectos de las hormonas esteroideas sobre los distintos niveles del eje. Las aminopeptidasas son enzimas proteolíticos encargados de la inactivación de diversos péptidos activos con importantes funciones neurotransmisoras/neuromoduladoras, dando lugar a su inactivación o a la formación de otros péptidos, también con actividad biológica. La actividad de estos enzimas se ha demostrado regulada por las hormonas esteroideas.

Por lo tanto, con el objetivo de analizar la influencia de los esteroides sexuales de machos y hembras sobre la actividad de diversas aminopeptidasas, y con ello, sobre los sustratos endógenos a los que regulan, en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales, se han llevado a cabo los siguientes experimentos:

1. Análisis de la actividad AlaAP en el hipotálamo, hipófisis y glándulas adrenales, en su fracción soluble y de membrana, en ratones macho controles, orquidectomizados y orquidectomizados tratados subcutáneamente durante 10 días con 3 mg/Kg, 6 mg/Kg o 12 mg/Kg de testosterona, y en ratones hembra controles, ovariectomizados y ovariectomizados tratados subcutáneamente durante 10 días con 10 mg/Kg, 20 mg/Kg o 40 mg/Kg de estradiol, 100 mg/Kg, 200 mg/Kg o 400 mg/Kg de progesterona o 10 mg/Kg más 100 mg/Kg, 20 mg/Kg más 200 mg/Kg o 40 mg/Kg más 400 mg/Kg de estradiol más progesterona.
2. Análisis de la actividad ArgAP en el hipotálamo, hipófisis y glándulas adrenales, en su fracción soluble y de membrana, en ratones macho controles, orquidectomizados y orquidectomizados tratados subcutáneamente durante 10 días con 3 mg/Kg, 6 mg/Kg o 12 mg/Kg de testosterona, y en ratones hembra controles, ovariectomizados y ovariectomizados tratados subcutáneamente durante 10 días con 10 mg/Kg, 20 mg/Kg o 40 mg/Kg de estradiol, 100 mg/Kg, 200 mg/Kg o 400 mg/Kg de progesterona o 10 mg/Kg más 100 mg/Kg, 20 mg/Kg más 200 mg/Kg o 40 mg/Kg más 400 mg/Kg de estradiol más progesterona.
3. Análisis de la actividad CysAP en el hipotálamo, hipófisis y glándulas adrenales, en su fracción soluble y de membrana, en ratones macho controles, orquidectomizados y orquidectomizados tratados subcutáneamente durante 10 días con 3 mg/Kg, 6 mg/Kg o 12 mg/Kg de testosterona, y en ratones hembra controles, ovariectomizados y

- ovaridectomizados tratados subcutáneamente durante 10 días con 10 mg/Kg, 20 mg/Kg o 40 mg/Kg de estradiol, 100 mg/Kg, 200 mg/Kg o 400 mg/Kg de progesterona o 10 mg/Kg más 100 mg/Kg, 20 mg/Kg más 200 mg/Kg o 40 mg/Kg más 400 mg/Kg de estradiol más progesterona.
4. Análisis de la actividad AspAP en el hipotálamo, hipófisis y glándulas adrenales, en su fracción soluble y de membrana, en ratones macho controles, orquidectomizados y orquidectomizados tratados subcutáneamente durante 10 días con 3 mg/Kg, 6 mg/Kg o 12 mg/Kg de testosterona, y en ratones hembra controles, ovaridectomizados y ovaridectomizados tratados subcutáneamente durante 10 días con 10 mg/Kg, 20 mg/Kg o 40 mg/Kg de estradiol, 100 mg/Kg, 200 mg/Kg o 400 mg/Kg de progesterona o 10 mg/Kg más 100 mg/Kg, 20 mg/Kg más 200 mg/Kg o 40 mg/Kg más 400 mg/Kg de estradiol más progesterona.
 5. Análisis de la actividad GluAP en el hipotálamo, hipófisis y glándulas adrenales, en su fracción soluble y de membrana, en ratones macho controles, orquidectomizados y orquidectomizados tratados subcutáneamente durante 10 días con 3 mg/Kg, 6 mg/Kg o 12 mg/Kg de testosterona, y en ratones hembra controles, ovaridectomizados y ovaridectomizados tratados subcutáneamente durante 10 días con 10 mg/Kg, 20 mg/Kg o 40 mg/Kg de estradiol, 100 mg/Kg, 200 mg/Kg o 400 mg/Kg de progesterona o 10 mg/Kg más 100 mg/Kg, 20 mg/Kg más 200 mg/Kg o 40 mg/Kg más 400 mg/Kg de estradiol más progesterona.
 6. Análisis de la actividad pGluAP en el hipotálamo, hipófisis y glándulas adrenales, en su fracción soluble y de membrana, en ratones macho controles, orquidectomizados y orquidectomizados tratados subcutáneamente durante 10 días con 3 mg/Kg, 6 mg/Kg o 12 mg/Kg de testosterona, y en ratones hembra controles, ovaridectomizados y ovaridectomizados tratados subcutáneamente durante 10 días con 10 mg/Kg, 20 mg/Kg o 40 mg/Kg de estradiol, 100 mg/Kg, 200 mg/Kg o 400 mg/Kg de progesterona o 10 mg/Kg más 100 mg/Kg, 20 mg/Kg más 200 mg/Kg o 40 mg/Kg más 400 mg/Kg de estradiol más progesterona.
 7. Análisis de la actividad LeuAP en el hipotálamo, hipófisis y glándulas adrenales, en su fracción soluble y de membrana, en ratones macho controles, orquidectomizados y orquidectomizados tratados subcutáneamente durante 10 días con 3 mg/Kg, 6 mg/Kg o 12 mg/Kg de testosterona, y en ratones hembra controles, ovaridectomizados y ovaridectomizados tratados subcutáneamente durante 10 días con 10 mg/Kg, 20 mg/Kg o 40 mg/Kg de estradiol, 100 mg/Kg, 200 mg/Kg o 400 mg/Kg de progesterona o 10 mg/Kg más 100 mg/Kg, 20 mg/Kg más 200 mg/Kg o 40 mg/Kg más 400 mg/Kg de estradiol más progesterona.

8. Análisis de la actividad TyrAP en el hipotálamo, hipófisis y glándulas adrenales, en su fracción soluble y de membrana, en ratones macho controles, orquidectomizados y orquidectomizados tratados subcutáneamente durante 10 días con 3 mg/Kg, 6 mg/Kg o 12 mg/Kg de testosterona, y en ratones hembra controles, ovariectomizados y ovariectomizados tratados subcutáneamente durante 10 días con 10 mg/Kg, 20 mg/Kg o 40 mg/Kg de estradiol, 100 mg/Kg, 200 mg/Kg o 400 mg/Kg de progesterona o 10 mg/Kg más 100 mg/Kg, 20 mg/Kg más 200 mg/Kg o 40 mg/Kg más 400 mg/Kg de estradiol más progesterona.

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. ANIMALES

En la realización del presente estudio se han utilizado 40 ratones macho, con un peso medio de 28.89 ± 0.71 gramos, y 150 ratones hembra, con un peso medio de 21.65 ± 0.68 , ambos de la variedad Balb-C.

Los animales fueron proporcionados por el Estabulario de los Servicios Técnicos de la Universidad de Jaén, y estuvieron acondicionados con un fotoperiodo día/noche de 12 horas. La temperatura ambiente se mantuvo entre 20-25 °C. En todo momento los animales dispusieron de comida y bebida *ad libitum*.

1.1. Grupos Experimentales.

Los ratones macho fueron divididos aleatoriamente en cinco grupos. Cuatro de estos grupos fueron sometidos a una orquidectomía y el quinto grupo se consideró como control. De los cuatro grupos de ratones orquidectomizados, tres fueron sometidos a tratamiento con testosterona y el cuarto se consideró como control orquidectomizado (*Figura M.1.*).

Los ratones hembra, todos ellos vírgenes, fueron divididos aleatoriamente en quince grupos de diez animales cada uno. A su vez, estos grupos se dividieron en tres subgrupos en función del tratamiento al que iban a ser sometidos (estradiol, progesterona y estradiol más progesterona). En cada subgrupo, cuatro fueron sometidos a una ovariectomía y el quinto grupo se consideró como control. De los cuatro grupos de ratones ovariectomizados, tres fueron sometidos a los correspondientes tratamientos con estradiol, progesterona y estradiol más progesterona, mientras que el cuarto grupo se consideró, en cada caso, como control ovariectomizado (*Figura M.1.*). Todos los ratones hembra control utilizados se encontraban en fase de estro. La fase del ciclo del estro fue determinada mediante un frotis vaginal (ver más adelante).

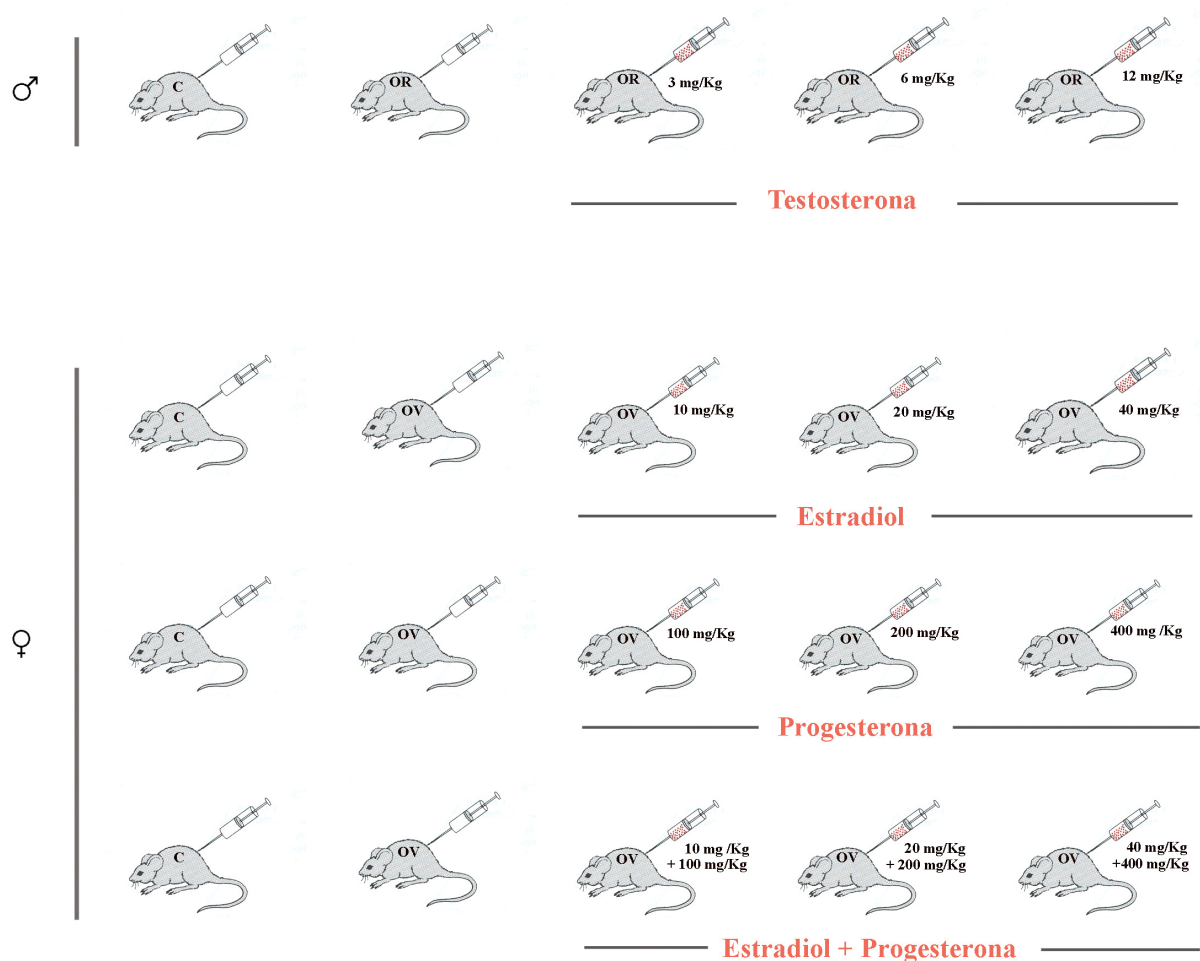


Figura M.1. Esquema de los grupos experimentales de ratones machos y hembras utilizados en el presente estudio.

2. TÉCNICAS QUIRÚRGICAS.

2.1. Orquidectomía.

Los distintos grupos de ratones orquidectomizados fueron operados el mismo día. Para ello los animales se pesaron y anestesiaron con hidrato de cloral aplicado por vía intraperitoneal, en dosis de 3.5 ml/Kg de peso (ver preparación en página 109).

Una vez anestesiados se procede a fijar al animal en posición decúbito supino. Se pela cuidadosamente la región del escroto y se desinfecta con betadine® (*Figura M.2.A*).

En caso de que los testículos estuvieran retraídos en la cavidad abdominal, se bajaron a la región del escroto mediante una leve presión sobre la pelvis. Posteriormente se realiza en la piel una incisión central, longitudinal, apareciendo el testículo. Se sujeta con cuidado y se corta el tejido conectivo que lo envolvía hasta que el testículo queda completamente libre (*Figura M.2.B*).

El cordón espermático, que comprende vasos sanguíneos, fibras nerviosas y el conducto deferente, se liga con una ligadura doble (*Figura M.2.C*) y se corta entre ambas extirpando el testículo. Después se procede de igual forma con el segundo testículo. Finalmente se sutura la piel del escroto (*Figura M.2.D*) y se vuelve a desinfectar con betadine (*Figura M.2.E*).

Finalizada la operación, los animales fueron devueltos a su jaula y se mantuvieron en estrecha vigilancia.

Los animales control sufrieron el mismo protocolo quirúrgico, exceptuando la extirpación de los testículos.

2.1.1. TRATAMIENTO CON TESTOSTERONA.

Transcurridos 15 días desde la orquidectomía, se procedió a inyectar por vía subcutánea a tres de los grupos de animales orquidectomizados, durante 10 días 3, 6 y 12 mg/Kg de testosterona disuelta en aceite de sésamo (Nyby y Simon, 1987; Li *et al.*, 1989; Thurman *et al.*, 1989; Francois *et al.*, 1990; Fujita *et al.*, 1992). Tanto al cuarto grupo de animales orquidectomizados como al grupo control se les inyectó solamente el aceite de sésamo (3 ml/Kg) que fue empleado como vehículo para disolver la testosterona.

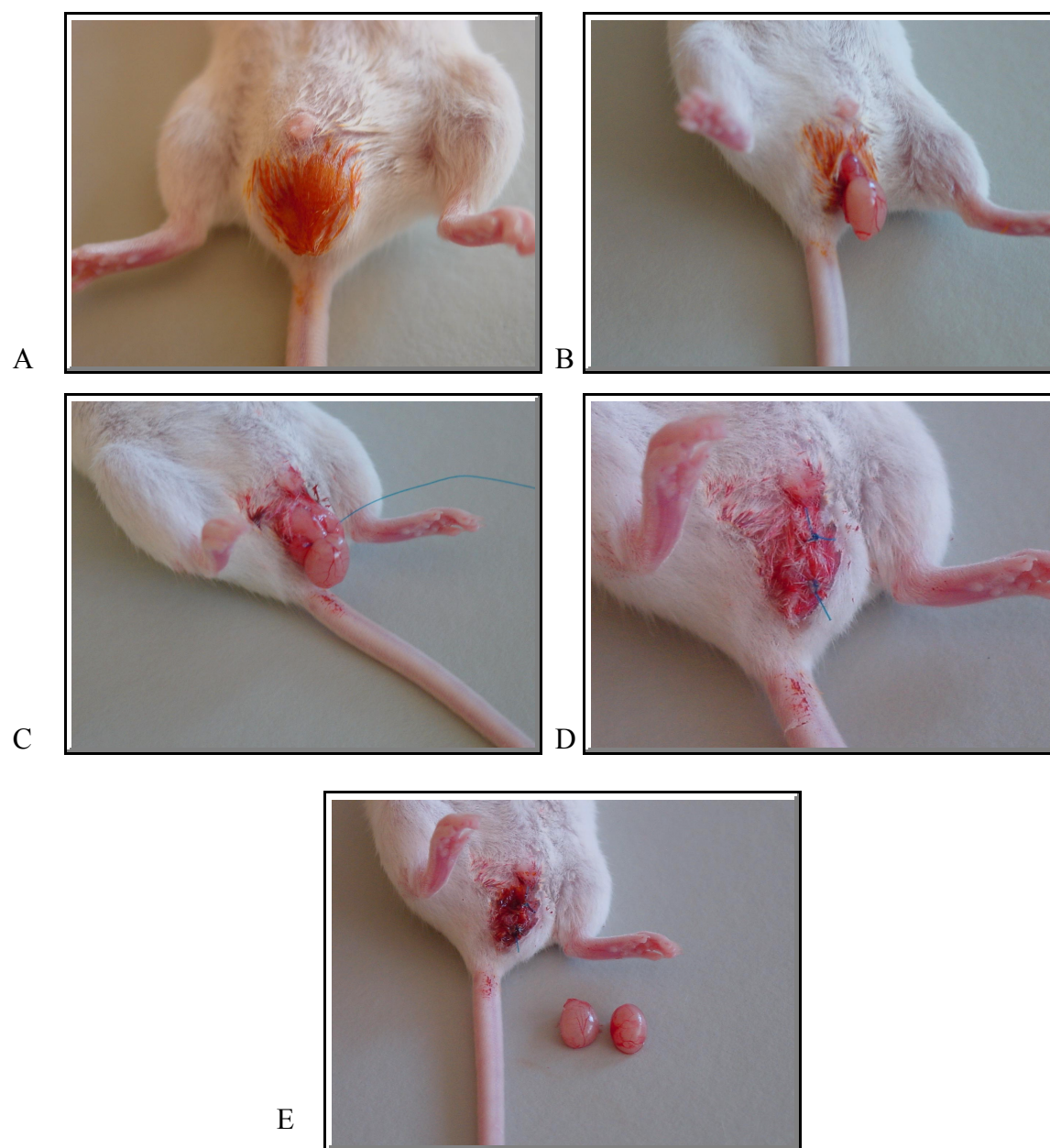


Figura M.2. Fotografías tomadas durante la realización de la orquidectomía. A: Se pela la región del escroto y se desinfecta con betadine. B: Se hace una incisión, se corta el tejido conectivo que lo envuelve, dejando un testículo libre. C: Se liga el cordón espermático con una ligadura doble, cortando entre ambas y extirpando el testículo. D: Se procede de igual forma con el segundo testículo y se sutura. E: Se desinfecta con betadine y el animal puede ser devuelto a su jaula.

2.2. Ovaridectomía.

Todos los grupos de ratones ovaridectomizados destinados al mismo tratamiento hormonal, fueron operados el mismo día. Para ello los animales se pesaron y anestesiaron con hidrato de cloral (3.5 ml/Kg de peso) aplicado intraperitonealmente (ver preparación en página 109).

Una vez anestesiados, se coloca al animal en posición decúbito prono y se localiza el lugar de incisión dorsal al nivel aproximado de la base de los riñones, aproximadamente entre las últimas costillas y la pelvis. Se corta el pelo sobre esta zona y se desinfecta con betadine (*Figura M.3.A*). Se hace una incisión longitudinal para dejar al descubierto uno de los ovarios visible por transparencia. A continuación, se separan las finas capas musculares que descansan sobre el ovario, e inmediatamente debajo de la masa muscular dorsal. Tras localizar el ovario, que se encuentra insertado en una acumulación de grasa (a veces el ovario se puede encontrar siguiendo la trompa uterina que, normalmente, se ve primero) se sujeta la grasa que lo rodea y se estira de ambas formaciones a través de la incisión (*Figura M.3.B*). Posteriormente se liga el extremo de la trompa uterina con una ligadura doble y se corta el ovario y la grasa que lo envuelve. Para finalizar, se cierra la pared abdominal mediante una sutura sencilla (*Figura M.3.C*), la incisión de la piel mediante suturas discontinuas (*Figura M.3.D*) y se desinfecta con betadine (*Figura M.3.E*). Después se procede de igual forma con el segundo ovario.

Finalizada la operación, los animales fueron devueltos a su jaula y se mantuvieron en estrecha vigilancia.

Los animales control sufrieron el mismo protocolo quirúrgico exceptuando la extirpación de los ovarios.

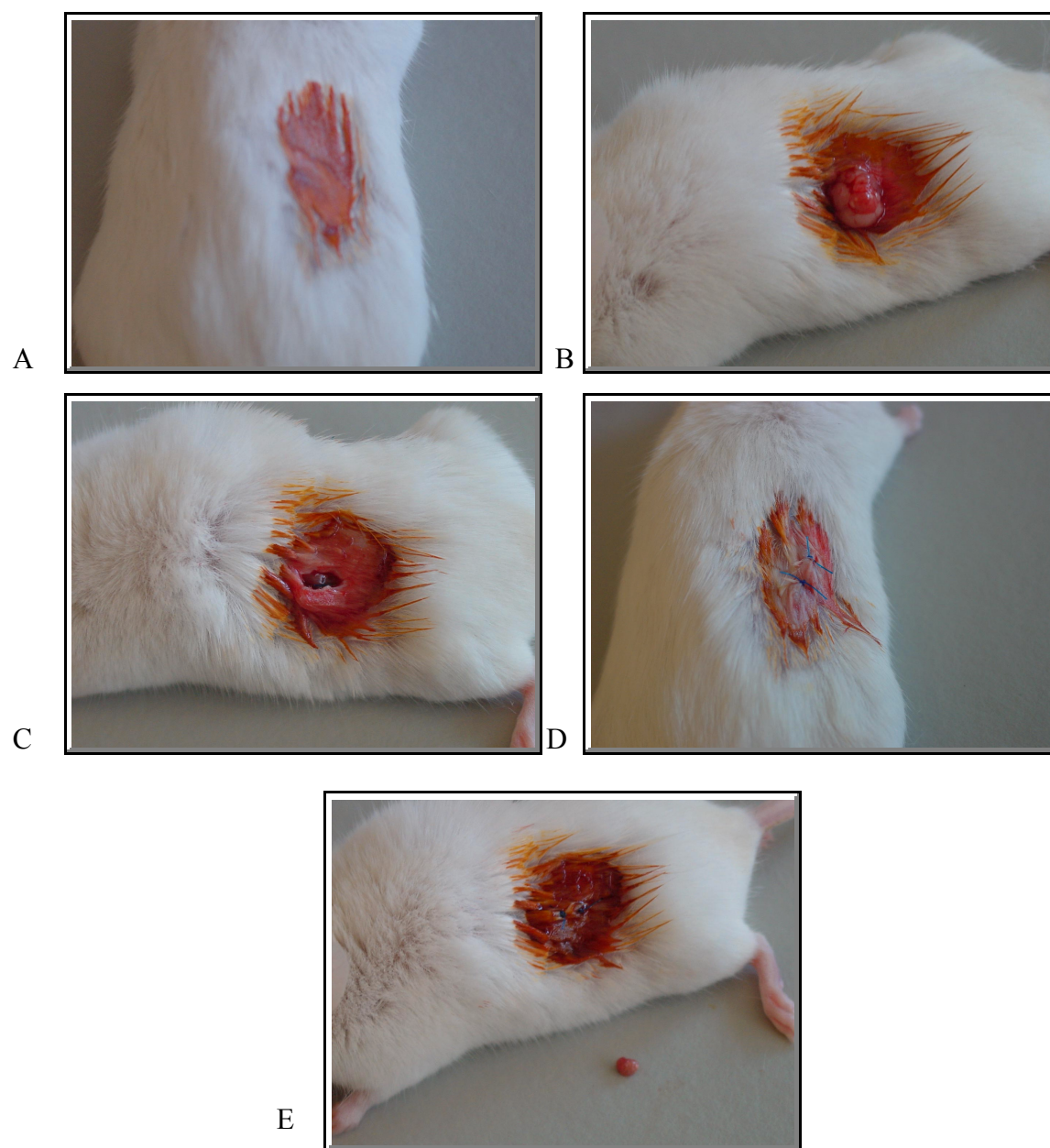


Figura M.3. Fotografías tomadas durante la realización de la ovariectomía. A: Se corta el pelo sobre la base de los riñones y se desinfecta con betadine. B: Se hace una incisión en la piel y en la capa muscular, dejando al descubierto uno de los ovarios. C: Una vez se ha ligado la trompa uterina, se corta el ovario y se cierra la pared abdominal con una sutura sencilla. D: Se cierra la piel mediante suturas discontinuas. E: Se desinfecta con betadine y el animal puede ser devuelto a su jaula.

2.2.1. FROTIS VAGINAL.

Para la realización del frotis vaginal, mediante el cual se determina en qué fase del ciclo del estro se encuentran los ratones hembra, se llevó a cabo el siguiente protocolo: se sujeta al ratón hembra tal y como se muestra en la figura (*Figura M.4.*). Utilizando un bastoncillo de algodón que se humedece con salino, se introduce el bastoncillo en la vagina suavemente y no muy profundo. Si por un inadecuado uso del bastoncillo se estimula la cerviz, el ratón hembra quedará pseudopreñado. El contenido del bastoncillo se transfiere a una gota de salino colocada en un porta y se deja secar. Una vez seco, se coloca durante 5 segundos en un recipiente con alcohol metílico. A continuación se retira, se deja secar y se coloca durante 15 minutos en otro recipiente conteniendo solución de trabajo giemsa (ver preparación en página 109). Se seca, se lava con agua destilada y se deja secar. A continuación puede examinarse la preparación mediante microscopia óptica.



Figura M.4. Representación del manejo del ratón durante la realización del frotis vaginal.

El frotis vaginal de las hembras en fase de **diestro** contiene especialmente leucocitos polimorfonucleares y algunas células epiteliales nucleadas, mucho mayores que los leucocitos. El número de células epiteliales nucleadas se incrementa durante el **proestro** y el principio del **estro**, mientras que los leucocitos desaparecen. En el **estro** propiamente dicho, que dura unas pocas horas, el frotis consta enteramente de células epiteliales grandes y cornificadas (no nucleadas). En el **metaestro** aparecen de nuevo leucocitos polimorfonucleares junto con vestigios de células epiteliales cornificadas (*Figura M.5. y Figura M.6.*).

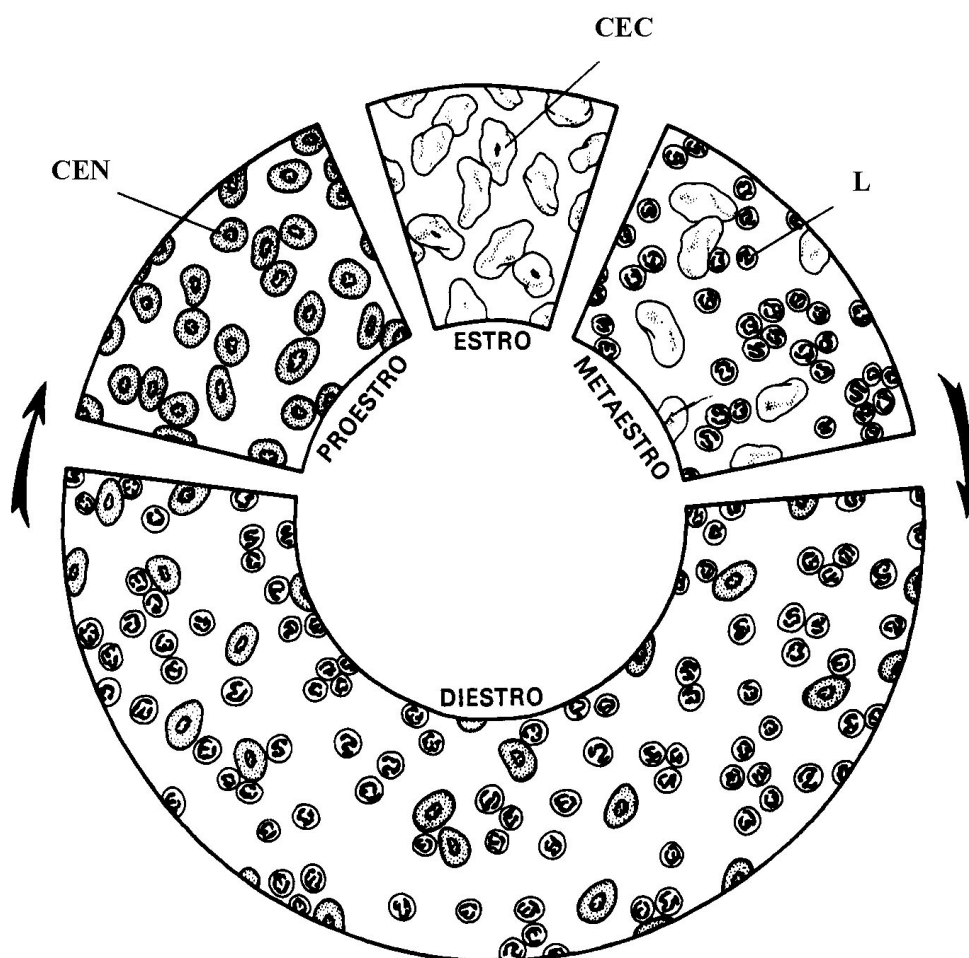


Figura M.5. Diagrama que muestra las células características del frotis vaginal durante las diferentes etapas del ciclo del estro de ratón. CEC: Células epiteliales cornificadas; CEN: Células epiteliales nucleadas; L: Linfocitos polimorfonucleares.

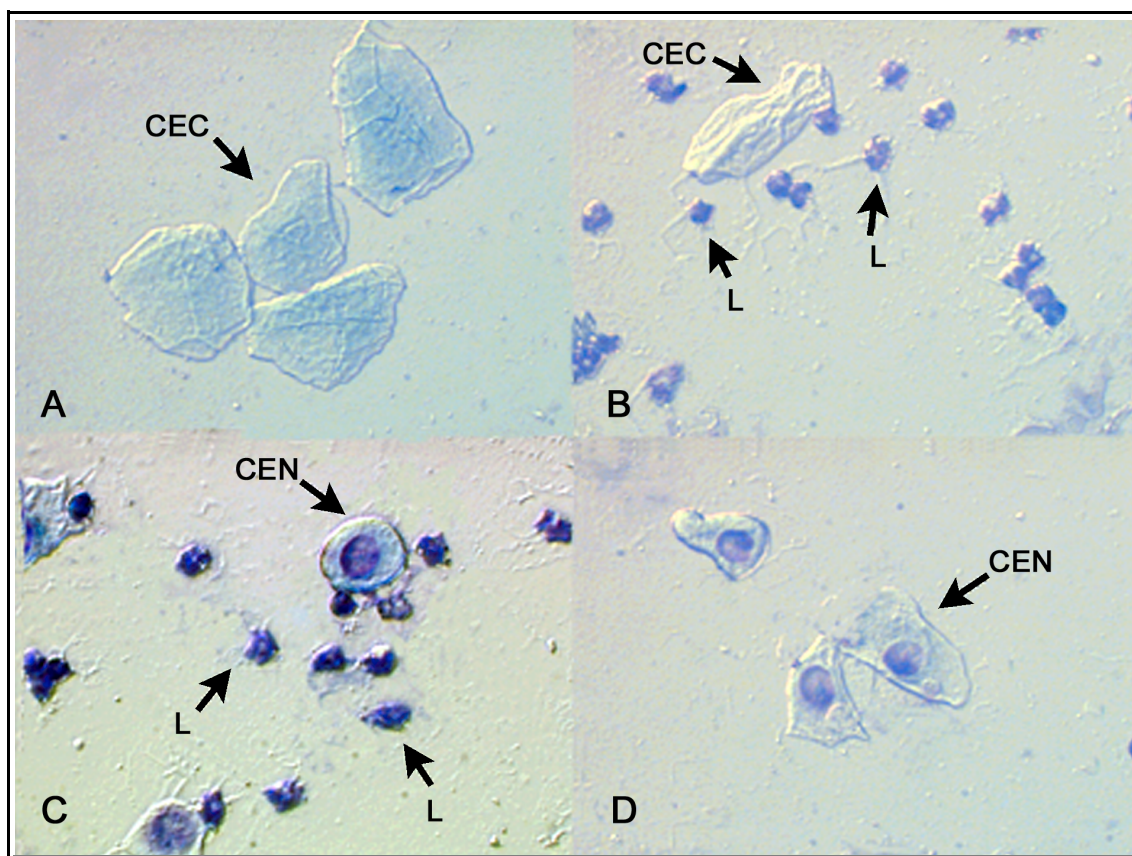


Figura M.6. Microfotografía óptica de las fases del ciclo del estró de ratón: A: Fase de estró, en la que se observan células epiteliales cornificadas (CEC). B: Fase de metaestro, donde se observan leucocitos polimorfonucleares (L) y restos de CEC. C: Fase de diestro, donde se observan L y células epiteliales nucleadas (CEN). D: Fase de proestro, en la que se encuentran CEN y no aparecen leucocitos polimorfonucleares. Tinción con giemsa (40x).

2.2.2. TRATAMIENTO CON ESTRADIOL.

Transcurridos 15 días desde la ovariectomía, se procedió a inyectar por vía subcutánea a uno de los subgrupos de animales ovariectomizados, 10, 20 y 40 mg/Kg de estradiol disuelto en aceite de sésamo durante 10 días (Akinci y Johnston, 1997; Sheffield, 1998). En este subgrupo, tanto a un grupo de animales ovariectomizados como al grupo control se les inyectó solamente 3 ml/Kg de aceite de sésamo, que fue empleado como vehículo para disolver el estradiol.

2.2.3. TRATAMIENTO CON PROGESTERONA.

Transcurridos 15 días desde la ovariectomía, se procedió a inyectar por vía subcutánea a uno de los subgrupos de animales ovariectomizados, 100, 200 y 400 mg/Kg de progesterona disuelta en aceite de sésamo durante 10 días (Akinci y Johnston, 1997; Sheffield, 1998). En este subgrupo, tanto a un grupo de animales ovariectomizados como al grupo control se les inyectó solamente 3 ml/Kg de aceite de sésamo, que fue empleado como vehículo para disolver la progesterona.

2.2.4. TRATAMIENTO CON ESTRADIOL MÁS PROGESTERONA.

Transcurridos 15 días desde la ovariectomía, se procedió a inyectar por vía subcutánea a uno de los subgrupos de animales ovariectomizados 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, disueltos en aceite de sésamo durante 10 días (Akinci y Johnston, 1997; Sheffield, 1998). En este subgrupo, tanto a un grupo de animales ovariectomizados como al grupo control se les inyectó solamente 3 mg/Kg de aceite de sésamo que fue empleado como vehículo para disolver las hormonas.

3. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS.

Todos los animales pertenecientes al mismo tratamiento hormonal y sus correspondientes controles, fueron sacrificados el mismo día. Las posibles variaciones circadianas de las actividades enzimáticas analizadas se obviaron realizando los experimentos a la misma hora y con la misma secuencia experimental, procurando en todo momento evitar cualquier factor de variación. Tras pesar a los animales, se anestesian con 3.5 ml/Kg de hidrato de cloral aplicado por vía intraperitoneal (ver preparación página 109). Tras colocar a los animales en posición decúbito supino, se fijan por patas y manos y se procede a efectuar una incisión por la línea dorso-lateral desde el extremo del esternón hacia ambos laterales y se abre la calota torácica. Seguidamente se secciona la aurícula derecha como vía de salida de la solución de perfusión (suero salino fisiológico al 9‰). Esta solución se inyecta en el ventrículo izquierdo hasta que el líquido que fluye por la aurícula derecha aparece completamente limpio. Tras la perfusión se

procede a la apertura de la calota, se extrae el cerebro y se disecciona para localizar el hipotálamo. Posteriormente se extrae la hipófisis. A continuación, se procedió a extraer las glándulas adrenales.

Los tres tejidos extraídos fueron congelados a -80°C hasta su posterior utilización.

4. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN SOLUBLE Y DE MEMBRANA.

Los diferentes tejidos obtenidos se homogeneizan en 10 volúmenes de una solución tampón Tris-CIH 10 mM, pH 7.4 (ver preparación página 109). Con el fin de obtener la fracción soluble, el homogeneizado se ultracentrífuga a 100.000 xg durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante obtenido fue empleado para la determinación de las distintas actividades aminopeptidásicas solubles y el contenido de proteínas solubles.

Para solubilizar las proteínas de membrana, los precipitados obtenidos en la anterior ultracentrifugación se resuspenden en tampón Tris-CIH 10 mM al que se le añade Tritón X-100 al 1% (pH 7.4) (ver preparación página 109) y se ultracentrífuga a 100.000 xg durante 30 minutos a 4 °C. Con el fin de retirar el detergente, que podría interferir en las posteriores determinaciones enzimáticas, a los sobrenadantes obtenidos se les añade 100 mg/ml del absorbente polimérico bio-beads SM-2 y se mantienen en un rotor orbital durante 2 horas a 4°C. Tras este tiempo se retiran los Bio-Beads SM-2 y las muestras resultantes, se emplean para la determinación de las distintas actividades aminopeptidásicas unidas a membrana así como el contenido de proteínas unidas a membrana.

5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE AMINOPEPTIDASAS

Las actividades aminopeptidásicas solubles y unidas a membrana se midieron espectrofotométricamente utilizando como sustratos soluciones de alanina-β-naftilamida (AlaNNap, para la determinación de alanina aminopeptidasa, AlaAP), arginina-β-naftilamida (ArgNNap, para la determinación de arginina aminopeptidasa, ArgAP), cisteína-β-naftilamida (CysNNap, para la determinación de cisteína aminopeptidasa, CysAP), aspartato-β-naftilamida (AspNNap, para la determinación de aspartato aminopeptidasa, AspAP), glutamato-β-naftilamida (GluNNap, para la determinación de glutamato aminopeptidasa, GluAP), piroglutamato-β-naftilamida (pGluNNap, para la determinación de piroglutamato aminopeptidasa, pGluAP), leucina-β-naftilamida (LeuNNap, para la determinación de leucina aminopeptidasa, LeuAP) y tirosina-β-naftilamida (TyrNNap, para la determinación de tirosina aminopeptidasa, TyrAP) (ver preparación páginas 110 y 111), según los modelos modificados de Greenberg (1962) (AlaAP, ArgAP, CysAP, LeuAP y TyrAP), Tobe *et al.* (1980) (GluAP), Cheung y Cushman (1971) (AspAP) y Schwabe y McDonald (1977) (pGluAP), con algunas modificaciones:

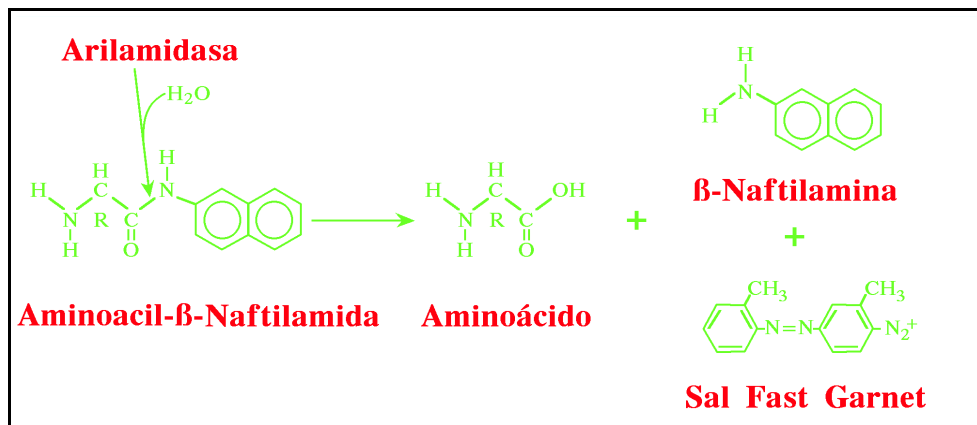


Figura M.7. Esquema de la reacción desarrollada para la determinación de las actividades aminopeptidásicas.

En placas de 96 pocillos (Costar) se ponen 15 μ l de muestra y se añaden 100 μ l de la solución de sustrato conteniendo AlaNNap, ArgNNap, CysNNap, AspNNap, GluNNap, pGluNNap, LeuNNap o TyrNNap 100 μ M (ver preparación página 110 y 111). Tras incubar durante 90 minutos a 37°C, se paran las reacciones añadiendo a cada pocillo 100 μ l de sal Fast Garnet GBC en tampón acetato 0.1 M pH 4.2 (ver preparación página 111). La β -naftilamina liberada como resultado de la actividad enzimática se acopla a la sal originando un compuesto rojizo que puede ser determinado espectrofotométricamente (lector de microplacas Whittaker 2001) a una longitud de onda de 550 nm (*Figura M.7.*).

Las actividades enzimáticas específicas solubles y unidas a membrana de AlaAP, ArgAP, CysAP, AspAP, GluAP, pGluAP, LeuAP y TyrAP se expresan en picomoles del correspondiente sustrato hidrolizado por minuto y por miligramo de proteína, utilizando una curva estándar de β -naftilamina.

5.1. Recta de calibrado de β -naftilamina.

La recta de calibrado de β -naftilamina se realizó disponiendo en los pocillos cantidades conocidas de este compuesto, a las que se añadieron 100 μ l de las soluciones de sustrato conteniendo AlaNNap, ArgNNap, CysNNap, AspNNap, GluNNap, pGluNNap, LeuNNap o TyrNNap.

Tras incubar durante 90 minutos a 37°C, se añaden 100 μ l de sal Fast Garnet GBC en tampón acetato 0.1 M, pH 4.2. La β -naftilamina se acopla con la sal, pudiendo determinarse espectrofotométricamente el compuesto originado a 550 nm (Schnebli *et al.*, 1979). Cada muestra se midió por triplicado. Los valores de absorbancia obtenidos con las muestras experimentales fueron extrapolados en esta recta de calibrado para conocer la cantidad de β -naftilamina liberada como resultado de la correspondiente actividad enzimática (Figura M.8.).

Recta de Calibrado

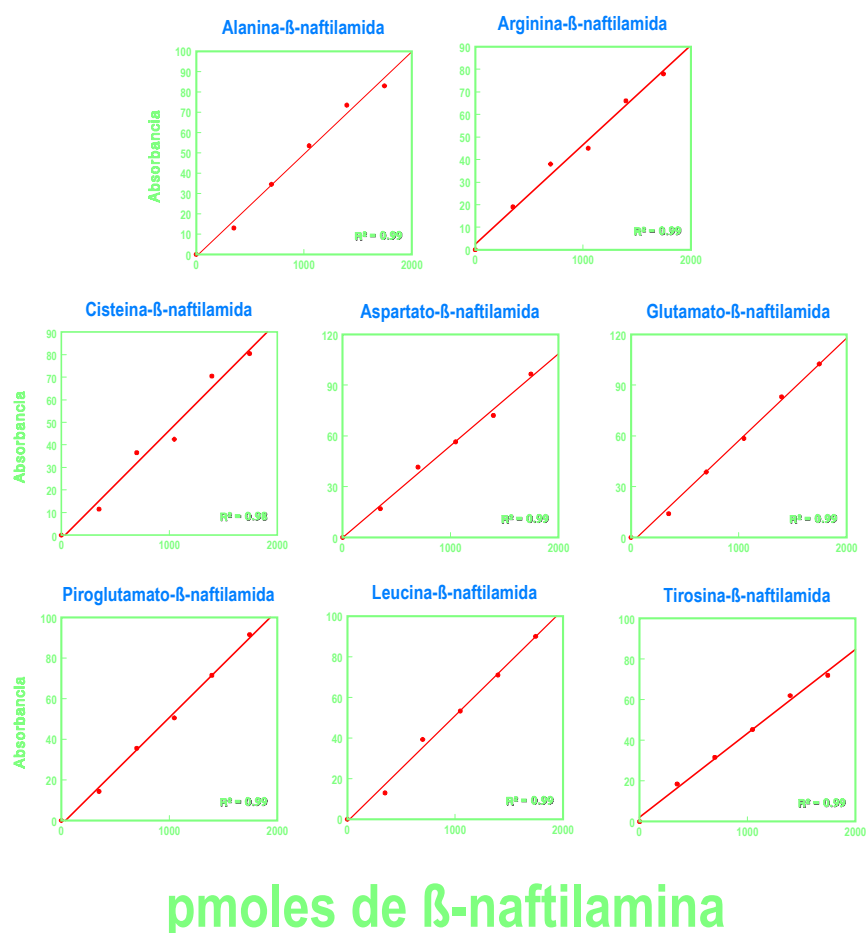


Figura M.8. Rectas de calibrado obtenidas para la β -naftilamina, en función del sustrato utilizado.

6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

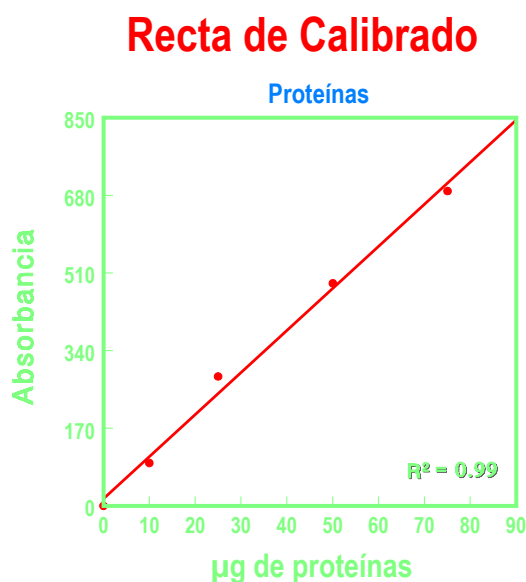
El método de determinación de proteínas utilizado en nuestros experimentos se basa en el descrito en 1976 por Bradford, basado en la afinidad del colorante Coomasie azul brillante G-250, por las proteínas. La unión del colorante a las proteínas produce un cambio en la longitud de onda de máxima absorción del colorante desde 465 nm a 595 nm. Este incremento de absorción es directamente proporcional a la concentración de proteínas, siempre que haya exceso de colorante. El método es capaz de medir μg de proteínas por lo que se considera ideal para los experimentos realizados.

Para la determinación de proteínas se han empleado 50 μl de muestra a las que se añade 2 ml de una solución acuosa de Coomasie G azul brillante (ver preparación página 112). El blanco de la prueba consiste en 2 ml de esta solución en ausencia de muestra. Los valores de absorbancia leídas con un espectrofotómetro (CE 393 Digital Spectrophotometer, cecil instruments) a 595 nm, se transforman en mg de proteínas por ml, empleando una recta de calibrado (ver más adelante) obtenida tras medir por el mismo procedimiento concentraciones crecientes de una solución de albúmina bovina. Cada muestra se mide por triplicado.

6.1. Recta de calibrado de albúmina.

La recta de calibrado de albúmina se obtiene tras medir por el procedimiento anteriormente descrito, concentraciones crecientes de una solución de albúmina sérica bovina (ver preparación página 111). Cada muestra se midió por triplicado y estos valores de absorbancia fueron extrapolados en la recta de calibrado para obtener el valor de proteína (*Figura M.9.*).

Figura M.9. Recta de calibrado obtenida para la albúmina.



7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para analizar las diferencias entre los grupos considerados en cada uno de los tratamientos hormonales, se ha utilizado un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido del test de rango múltiple LSD. Para ello se ha utilizado el software Statgraphics 5.0. Con este objetivo, los datos correspondientes a los parámetros estudiados fueron organizados en archivos adecuados al tratamiento estadístico en una base de datos Lotus e importados desde Statgraphics para su procesamiento. Valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

8. SOLUCIONES.

8.1. Giemsa.

Para preparar la solución madre, se mezcla el polvo de giemsa (Panreac) (0.8 mg) con 50 ml de glicerol (Panreac) y se coloca en la estufa a 60 °C durante 2 horas. Se añaden 50 ml de alcohol metílico (Merck) y se tapa herméticamente. La solución de trabajo se prepara inmediatamente antes de usarla, y para ello, se mezclan 2.5 ml de solución madre de giemsa con 3 ml de alcohol metílico y 100 ml de agua destilada.

8.2. Hidrato de Cloral.

Para preparar esta solución se disuelven 4 g de hidrato de cloral (Panreac) en 50 ml de agua destilada.

8.3. Tris-ClH, 50 mM.

Para la preparación de 500 ml, se toman 3.027 g de Trizma Base (Tris-[hidroximetil]-aminometano) (Sigma) y se disuelven en agua destilada, ajustando al pH deseado con ClH 0.1 N (Merck).

8.4. Tris-ClH, 10 mM.

Para preparar 100 ml de este tampón, se toman 20 ml de Tris-ClH 50 mM y añadir agua destilada hasta completar el volumen.

8.5. Tris-ClH, 10 mM, Tritón X-100 1%.

Para la preparación de 50 ml, se toman 49.5 ml de Tris-ClH 10 mM y se le añaden 0.5 ml de Tritón X-100 (Sigma).

8.6. Tampón fosfato 50 mM pH 7.4.

Para preparar 1000 ml, se toman 13.40 g de fosfato sódico dibásico ($\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) (Merck) y 7.8 g de fosfato sódico monobásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) (Merck), completando el volumen con agua destilada, y ajustando el pH con ClH 1 N.

8.7. Tampón acetato, 0.1 M, pH 4.2.

Para la preparación de 1000 ml, se pesan 8.203 g de acetato sódico (CH_3COONa) (Merck), se añaden 5.9 ml de ácido acético (CH_3COOH) (Panreac) y se afora hasta completar el volumen, ajustándose el pH con ácido acético.

8.8. Soluciones de incubación.

8.8.1. SOLUCIÓN DE ALANINA-B-NAFTILAMIDA.

Para preparar 100 ml, se pesan 2.14 mg de alanina- β -naftilamida (AlaNNap) (Sigma), 10 mg de albúmina bovina y se disuelven en tampón fosfato 50 mM. Se ajusta el pH a 7.4 con ClH 0.1N.

8.8.2. SOLUCIÓN DE ARGININA-B-NAFTILAMIDA.

Para preparar 100 ml, se pesan 3.35 mg de arginina- β -naftilamida (ArgNNap) (Sigma), 10 mg de albúmina bovina y se disuelven en tampón fosfato 50 mM. Se ajusta el pH a 7.4 con ClH 0.1N.

8.8.3. SOLUCIÓN DE CISTEÍNA-B-NAFTILAMIDA.

Para preparar 100 ml, se pesan 4.9 mg de cisteína- β -naftilamida (CysNNap) (Sigma), 10 mg de albúmina bovina y se disuelven en tampón Tris- ClH 50 mM. Se ajusta el pH a 6 con ClH 0.1N.

8.8.4. SOLUCIÓN DE ASPARTATO-B-NAFTILAMIDA.

Para preparar 100 ml, se pesan 2.58 mg de aspartato- β -naftilamida (AspNNap) (Sigma), 10 mg de albúmina bovina, 37.8 mg de EDTA (Sigma), 39.4 mg MnCl_2 (Sigma) y se disuelven en tampón Tris- ClH 50 mM. Se ajusta el pH a 7.4 con ClH 0.1N.

8.8.5. SOLUCIÓN DE GLUTAMATO-B-NAFTILAMIDA.

Para preparar 100 ml, se pesan 2.72 mg de glutamato- β -naftilamida (GluNNap) (Sigma), 10 mg de albúmina bovina, 555 mg de CaCl_2 (Sigma) y se disuelven en tampón Tris-ClH 50 mM. Se ajusta el pH a 7.4 con ClH 0.1N.

8.8.6. SOLUCIÓN DE PIROGLUTAMATO-B-NAFTILAMIDA.

Para preparar 100 ml, se pesan 2.54 mg de piroglutamato- β -naftilamida (pGluNNap) (Sigma), 10 mg de albúmina bovina, 37.8 mg de EDTA y se disuelven en tampón fosfato 50 mM. Se ajusta el pH a 7.4 con ClH 0.1N.

8.8.7. SOLUCIÓN DE LEUCINA-B-NAFTILAMIDA.

Para preparar 100 ml, se pesan 2.92 mg de leucina- β -naftilamida (LeuNNap) (Sigma), 10 mg de albúmina bovina y se disuelven en tampón fosfato 50 mM. Se ajusta el pH a 7.4 con ClH 0.1N.

8.8.8. SOLUCIÓN DE TIROSINA-B-NAFTILAMIDA.

Para preparar 100 ml, se pesan 3.064 mg de tirosina- β -naftilamida (TyrNNap) (Sigma), 10 mg de albúmina bovina (Sigma) y se disuelven en tampón fosfato 50 mM. Se ajusta el pH a 7.4 con ClH 0.1N.

8.9. Solución de β -naftilamina.

Se disuelve 1 mg de β -naftilamina (Sigma) en 1 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma). Se toman 50 μl y se añaden 950 μl de agua destilada.

8.10. Solución de Sal GBC.

Para preparar esta solución, se pesan 100 mg de sal Fast Garnet GBC (Sigma) y se disuelven en 40 ml de tampón acetato 0.1 M, pH 4.2. Se filtra con papel de filtro, se añaden 10 ml de tween 20 (polioxietileno sorbitan monolaurato) (Sigma) y finalmente se agita.

8.11. Solución de albúmina.

Se disuelve 1 mg de albúmina sérica bovina (Sigma) en 1 ml de agua destilada.

8.12. Solución de Bradford.

Para preparar esta solución, se disuelven 100 mg de Coomasie G azul brillante (Sigma) en 50 ml de etanol al 96% (Merck). Se añaden 100 ml de ácido ortofosfórico al 85% (Panreac) y 50 ml de agua destilada. Se filtra con papel de filtro. La solución de trabajo debe estar diluida cinco veces con agua destilada.

IV. RESULTADOS.

1. EFECTO DE LA ORQUIDECTOMÍA Y LA ADMINISTRACIÓN DE TESTOSTERONA SOBRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GLÁNDULAS ADRENALES DE RATÓN.

1.1. Efecto de la orquidectomía y la administración de testosterona sobre la actividad específica de alanina aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis -glándulas adrenales de ratón.

El análisis del efecto de la orquidectomía y la posterior administración de testosterona sobre la actividad específica de alanina aminopeptidasa (AlaAP) soluble en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

En el hipotálamo, la orquidectomía provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) de la actividad AlaAP soluble del 29.21% con respecto al control (*Tabla R.1., Figura R.1A.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de AlaAP soluble, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 3 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona provoca un incremento significativo ($p < 0.01$ en ambos casos) del 35.11% y 40.63% respectivamente, mientras que la administración de 6 mg/Kg de testosterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.1., Figura R.1A.*).

En la hipófisis, la orquidectomía provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) de la actividad AlaAP soluble del 31.36% con respecto al control (*Tabla R.1., Figura R.1B.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad AlaAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.1., Figura R.1B.*).

En las glándulas adrenales, la orquidectomía provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) de la actividad AlaAP soluble del 20.93% con respecto al control (*Tabla R.1., Figura R.1C.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad AlaAP soluble a ninguna de las dosis empleadas (*Tabla R.1., Figura R.1C.*).

El análisis del efecto de la orquidectomía y la posterior administración de testosterona sobre la actividad específica de AlaAP unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

En el hipotálamo, la orquidectomía no provoca cambio significativo alguno de la actividad AlaAP unida a membrana (*Tabla R.1., Figura R.2A.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados tampoco provoca variaciones significativas de la actividad AlaAP unida a membrana con ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.1., Figura R.2A.*).

En la hipófisis, la orquidectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad AlaAP unida a membrana (*Tabla R.1., Figura R.2B.*). Sin embargo, la administración de testosterona a animales orquidectomizados sí provoca un cambio dosis-dependiente en la actividad AlaAP unida a membrana. Así, la administración de 3 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) del 84.80%, la administración de 6 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) del 95.36% y la administración de 12 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 104.10% (*Tabla R.1., Figura R.2B.*).

En las glándulas adrenales, la orquidectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad AlaAP unida a membrana (*Tabla R.1., Figura R.2C.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados tampoco provoca cambios significativos en la actividad AlaAP unida a membrana con ninguna de las dosis empleadas (*Tabla R.1., Figura R.2C.*).

AlaAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	578.0 ± 28.6	119.5 ± 8.8	586.0 ± 62.5	79.4 ± 13.7	221.2 ± 16.5	235.0 ± 17.3
OR-C	746.8 ± 30.9	99.4 ± 13.9	769.7 ± 88.4	89.3 ± 19.0	267.5 ± 20.7	241.1 ± 16.6
T 3 mg/Kg	781.0 ± 40.6	101.2 ± 14.5	637.4 ± 60.8	146.8 ± 20.1	221.0 ± 20.1	248.1 ± 17.1
T 6 mg/Kg	636.1 ± 30.5	100.3 ± 18.4	553.2 ± 43.8	155.2 ± 23.2	213.2 ± 18.2	237.1 ± 8.6
T 12 mg/Kg	812.9 ± 46.7	109.4 ± 15.0	744.8 ± 51.2	162.1 ± 23.7	210.2 ± 23.3	240.7 ± 24.8

Tabla R.1. Valores de actividad específica de alanina aminopeptidasa (AlaAP) soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), orquidectomizados (OR-C) y orquidectomizados tratados con 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona (T). Los resultados se expresan en picomoles de alanina-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 8).

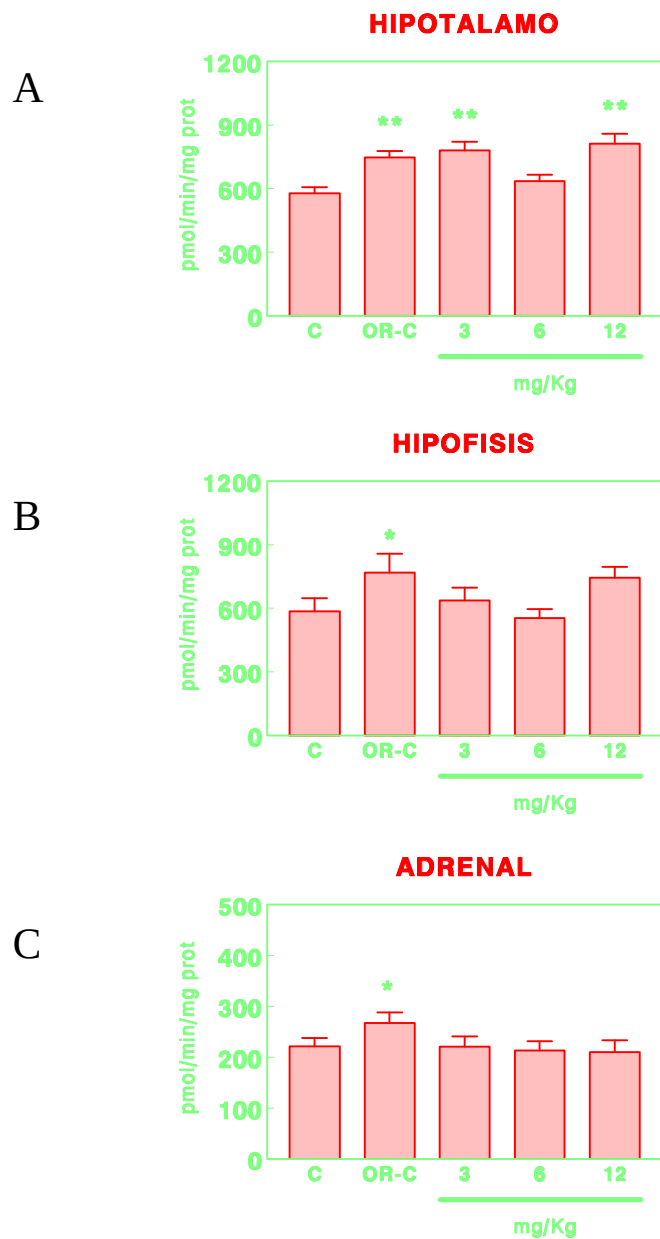
AlaAP Soluble

Figura R.1. Representación del efecto de la orquidectomía (OR-C) y la administración de 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona sobre la actividad específica de alanina aminopeptidasa (AlaAP) soluble en (A) hipotálamo, (B) hipófisis y (C) glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; n=8) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

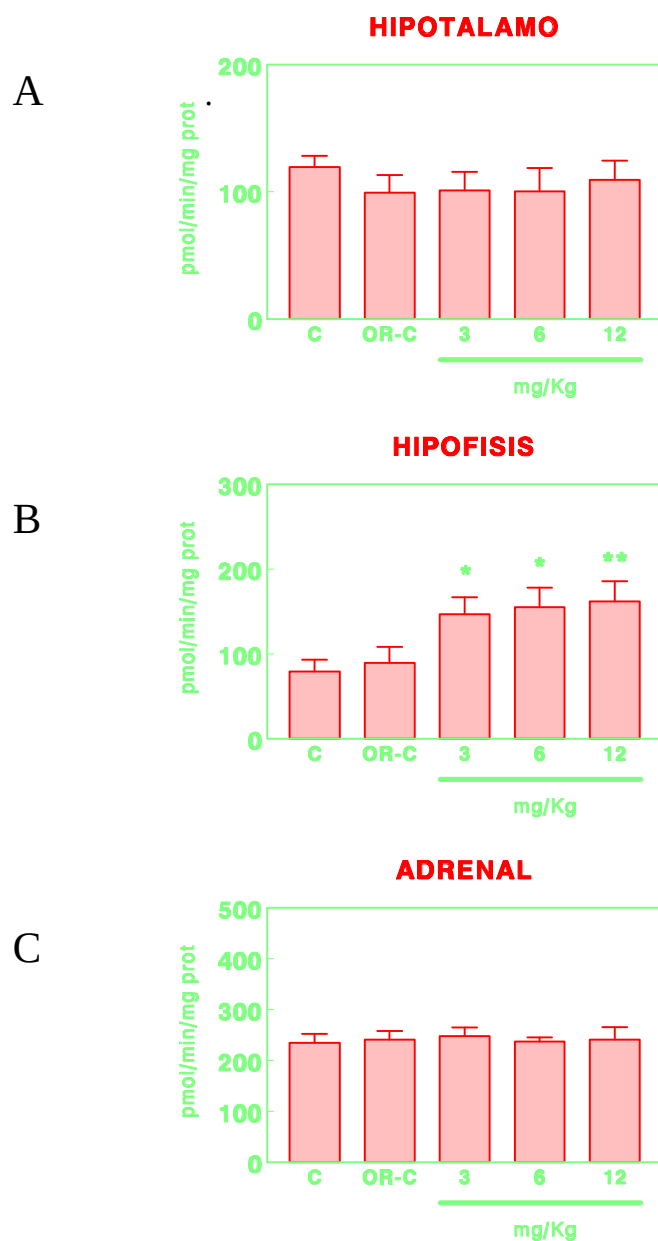
AlaAP Membrana

Figura R.2. Representación del efecto de la orquidectomía (OR-C) y la administración de 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona sobre la actividad específica de alanina aminopeptidasa (AlaAP) unida a membrana en (A) hipotálamo, (B) hipófisis y (C) glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; n=8) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

1.2. Efecto de la orquidectomía y la administración de testosterona sobre la actividad específica de arginina aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis- glándulas adrenales de ratón.

El análisis del efecto de la orquidectomía y la posterior administración de testosterona sobre la actividad específica de arginina aminopeptidasa (ArgAP) soluble en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

En el hipotálamo, la orquidectomía provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) de la actividad ArgAP soluble del 22.88% con respecto al control (*Tabla R.2., Figura R.3A.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica ArgAP soluble, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 3 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona provoca un incremento significativo ($p < 0.01$ en ambos casos) del 30.42% y 34.40% respectivamente, mientras que la administración de 6 mg/Kg de testosterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.2., Figura R.3A.*).

En la hipófisis, la orquidectomía provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) de la actividad ArgAP soluble del 21.26% con respecto al control (*Tabla R.2., Figura R.3B.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica ArgAP soluble, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 3 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 6 mg/Kg de testosterona provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) del 21.49% (*Tabla R.2., Figura R.3B.*).

En las glándulas adrenales, la orquidectomía provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) de la actividad ArgAP soluble del 23.42% con respecto al control (*Tabla R.2., Figura R.3C.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad ArgAP soluble a ninguna de las dosis empleadas (*Tabla R.2., Figura R.3C.*).

El análisis del efecto de la orquidectomía y la posterior administración de testosterona sobre la actividad específica de ArgAP unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

En el hipotálamo, la orquidectomía no provoca cambio significativo alguno de la actividad ArgAP unida a membrana (*Tabla R.2., Figura R.4A.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados tampoco provoca variaciones significativas de la actividad ArgAP unida a membrana con ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.2., Figura R.4A.*).

En la hipófisis, la orquidectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad ArgAP unida a membrana (*Tabla R.2., Figura R.4B.*). Sin embargo, la administración de testosterona a animales orquidectomizados sí provoca un cambio en la actividad ArgAP unida a membrana. Así, la administración de 3 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.05$)

del 64.82%, la administración de 6 mg/Kg provoca un incremento significativo del 58.77% y la administración de 12 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) del 56.96% (Tabla R.2., Figura R.4B.).

En las glándulas adrenales, la orquidectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad ArgAP unida a membrana (Tabla R.2., Figura R.4C.). La administración de testosterona a animales orquidectomizados tampoco provoca cambios significativos en la actividad ArgAP unida a membrana con ninguna de las dosis empleadas (Tabla R.2., Figura R.4C.).

ArgAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	Soluble	Membrana	Soluble	Membrana	Soluble	Membrana
C	665.0 ± 50.5	97.7 ± 6.1	580.6 ± 44.1	70.9 ± 13.5	229.2 ± 13.5	154.7 ± 13.2
OR-C	817.2 ± 36.0	88.6 ± 8.0	704.0 ± 67.3	83.1 ± 14.2	282.9 ± 17.5	161.5 ± 10.3
T 3 mg/Kg	867.3 ± 50.0	100.2 ± 14.1	555.9 ± 38.9	116.9 ± 14.6	253.9 ± 18.3	155.4 ± 7.7
T 6 mg/Kg	758.3 ± 46.9	91.4 ± 17.9	455.8 ± 29.7	112.6 ± 20.2	254.1 ± 19.3	130.4 ± 6.4
T 12 mg/Kg	893.8 ± 57.8	98.1 ± 13.2	624.8 ± 28.6	111.3 ± 19.2	254.9 ± 21.8	140.5 ± 13.2

Tabla R.2. Valores de actividad específica de arginina aminopeptidasa (ArgAP) soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), orquidectomizados (OR-C) y orquidectomizados tratados con 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona (T). Los resultados se expresan en picomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; $n = 8$).

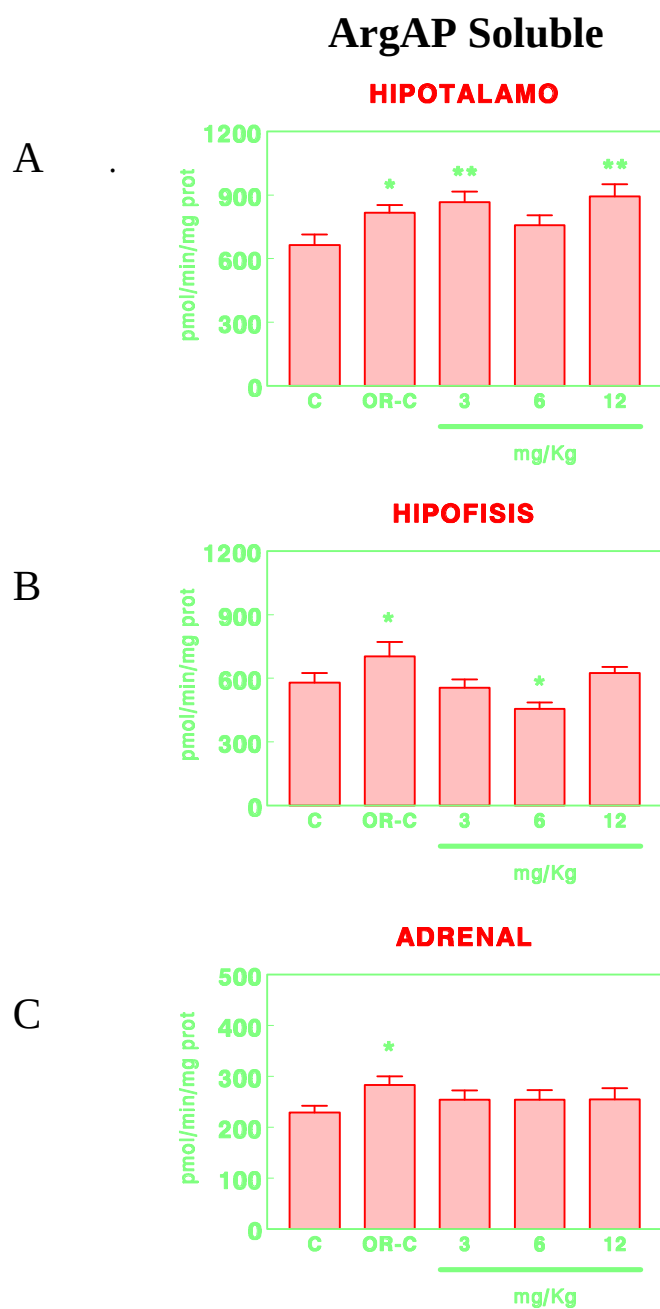


Figura R.3. Representación del efecto de la orquidectomía (OR-C) y la administración de 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona sobre la actividad específica de arginina aminopeptidasa (ArgAP) soluble en (A) hipotálamo, (B) hipófisis y (C) glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; n=8) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

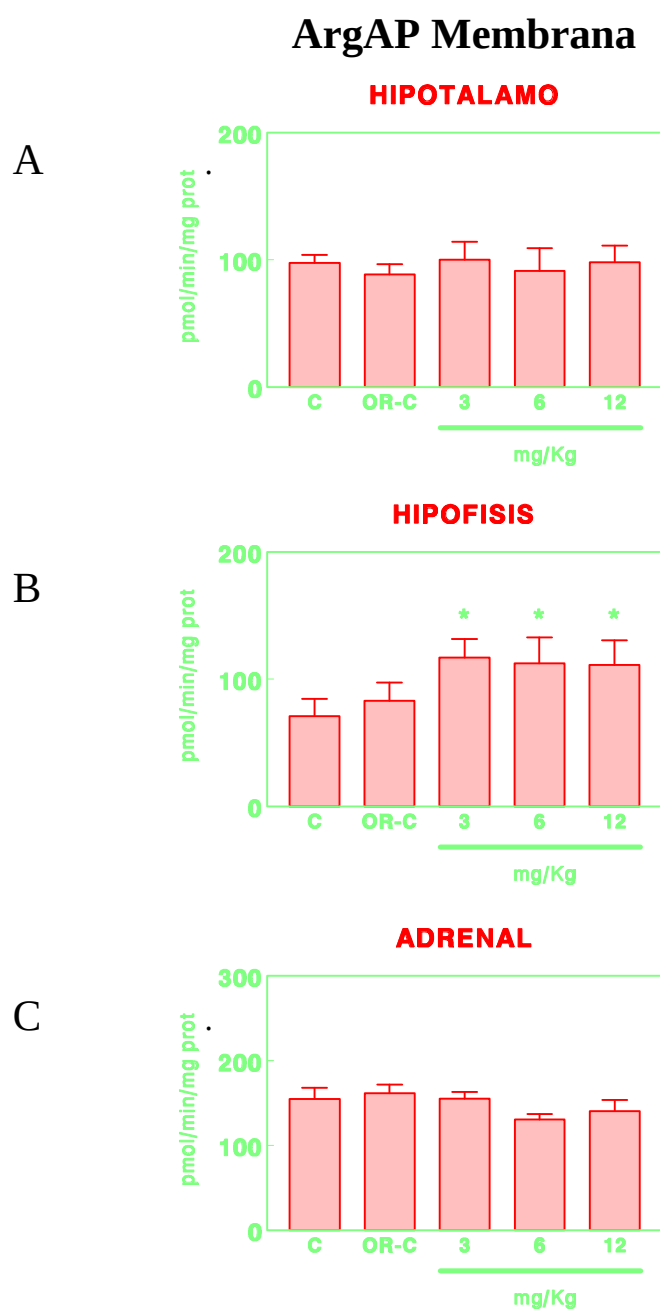


Figura R.4. Representación del efecto de la orquidectomía (OR-C) y la administración de 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona sobre la actividad específica de arginina aminopeptidasa (ArgAP) unida a membrana en (A) hipotálamo, (B) hipófisis y (C) glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; $n=8$) (* $p<0.05$).

1.3. Efecto de la orquidectomía y la administración de testosterona sobre la actividad específica de cisteína aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis- glándulas adrenales de ratón.

El análisis del efecto de la orquidectomía y la posterior administración de testosterona sobre la actividad específica de cisteína aminopeptidasa (CysAP) soluble en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

En el hipotálamo, la orquidectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad CysAP soluble (*Tabla R.3., Figura R.5A.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad CysAP soluble dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 6 mg/Kg provoca un descenso significativo ($p<0.05$) del 18.36%, mientras que la administración de 3 mg/Kg y 12 mg/Kg no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.3., Figura R.5A.*).

En la hipófisis, la orquidectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad CysAP soluble (*Tabla R.3., Figura R.5B.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados tampoco provoca cambios significativos en la actividad CysAP soluble con ninguna de las dosis empleadas (*Tabla R.3., Figura R.5B.*).

En las glándulas adrenales, la orquidectomía provoca un incremento significativo ($p<0.05$) de la actividad CysAP soluble del 7.35% con respecto al control (*Tabla R.3., Figura R.5C.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad CysAP soluble a ninguna de las dosis empleadas (*Tabla R.3., Figura R.5C.*).

El análisis del efecto de la orquidectomía y la posterior administración de testosterona sobre la actividad específica CysAP unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

En el hipotálamo, la orquidectomía no provoca cambio significativo alguno de la actividad CysAP unida a membrana (*Tabla R.3., Figura R.6A.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados tampoco provoca variaciones significativas de la actividad CysAP unida a membrana con ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.3., Figura R.6A.*).

En la hipófisis, la orquidectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad CysAP unida a membrana (*Tabla R.3., Figura R.6B.*). Sin embargo, la administración de testosterona a animales orquidectomizados sí provoca un cambio en la actividad CysAP unida a membrana. Así, la administración de 3 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 57.78%, la administración de 6 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 52.16% y la administración de 12 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 50.32% (*Tabla R.3., Figura R.6B.*).

En las glándulas adrenales, la orquidectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad CysAP unida a membrana (*Tabla R.3., Figura R.6C.*). Sin embargo, la administración de testosterona a animales orquidectomizados si provoca un cambio en la actividad específica de CysAP unida a membrana. Así,, la administración de 6 mg/Kg de testosterona provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 29.04% y la administración de 12 mg/Kg de testosterona provoca un descenso significativo ($p<0.05$) del 20.71%. Por el contrario, la administración de 3 mg/Kg de testosterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.3., Figura R.6C.*).

CysAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	157.2 ± 6.1	45.0 ± 6.2	430.8 ± 11.2	72.8 ± 11.1	100.7 ± 4.4	72.9 ± 5.0
OR-C	172.7 ± 11.8	43.5 ± 6.9	450.1 ± 41.0	74.4 ± 14.5	108.1 ± 8.1	75.1 ± 4.6
T 3 mg/Kg	176.6 ± 9.7	61.5 ± 5.8	432.3 ± 40.9	114.8 ± 16.0	86.1 ± 5.9	70.9 ± 3.8
T 6 mg/Kg	128.3 ± 7.1	43.7 ± 10.1	434.9 ± 26.9	110.7 ± 15.1	84.5 ± 6.7	51.7 ± 2.9
T 12 mg/Kg	176.2 ± 11.0	50.2 ± 6.6	522.5 ± 28.9	109.4 ± 15.5	81.8 ± 7.9	57.8 ± 4.8

Tabla R.3. Valores de actividad específica de cisteína aminopeptidasa (CysAP) soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), orquidectomizados (OR-C) y orquidectomizados tratados con 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona (T). Los resultados se expresan en picomoles de cisteína-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 8).

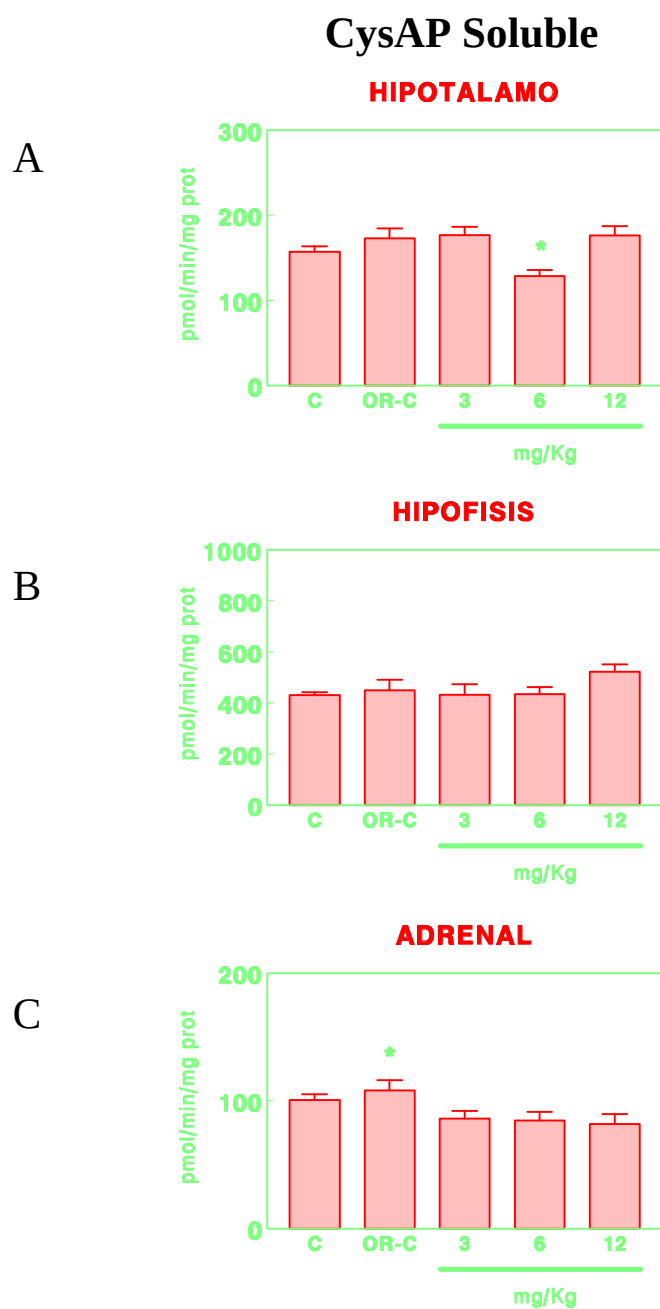


Figura R.5. Representación del efecto de la orquidectomía (OR-C) y la administración de 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona sobre la actividad específica de cisteína aminopeptidasa (CysAP) soluble en (A) hipotálamo, (B) hipófisis y (C) glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de cisteína- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; $n=8$) (* $p<0.05$).

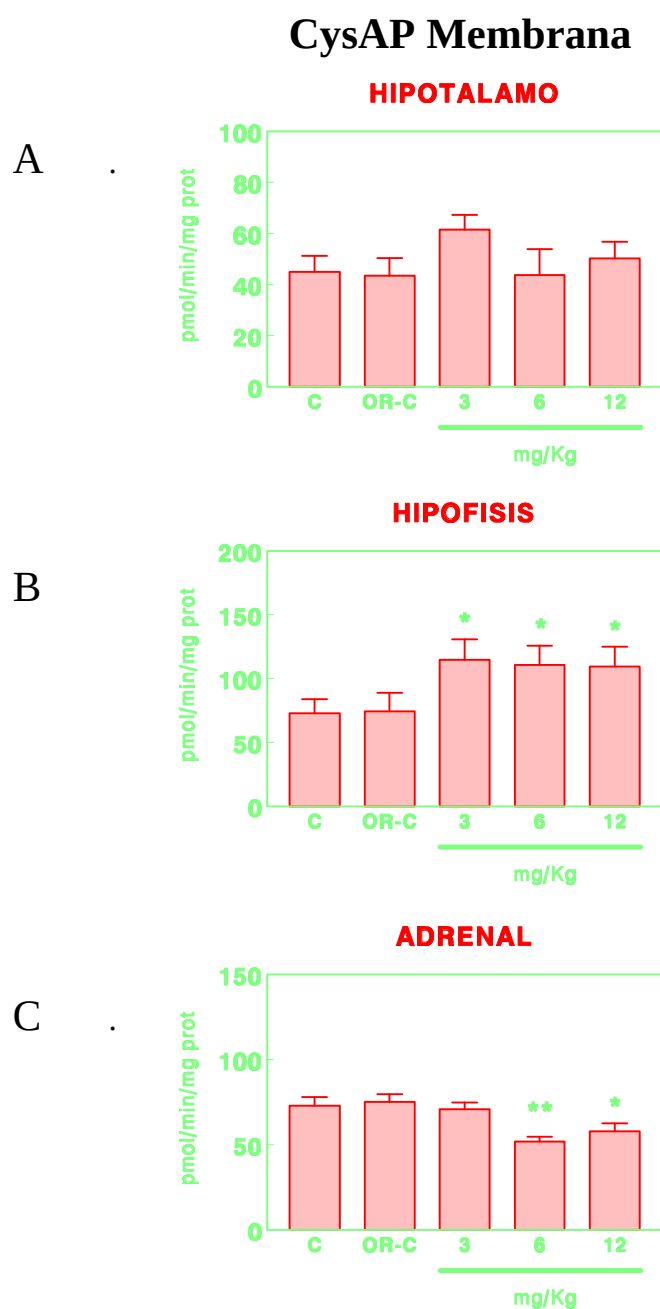


Figura R.6. Representación del efecto de la orquidectomía (OR-C) y la administración de 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona sobre la actividad específica de cisteína aminopeptidasa (CysAP) unida a membrana en (A) hipotálamo, (B) hipófisis y (C) glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de cisteína- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; n=8) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

1.4. Efecto de la orquidectomía y la administración de testosterona sobre la actividad específica de aspartato aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

El análisis del efecto de la orquidectomía y la posterior administración de testosterona sobre la actividad específica de aspartato aminopeptidasa (AspAP) soluble en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

En el hipotálamo, la orquidectomía provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) de la actividad AspAP soluble del 77.03% con respecto al control (*Tabla R.4., Figura R.7A.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de AspAP soluble, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 3 mg/Kg de testosterona provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 126.68%, mientras que la administración de 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.4., Figura R.7A.*).

En la hipófisis, la orquidectomía no provoca cambio significativo alguno de la actividad AspAP soluble (*Tabla R.4., Figura R.7B.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados tampoco provoca variaciones significativas de la actividad AlaAP unida a membrana con ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.4., Figura R.7B.*).

En las glándulas adrenales, la orquidectomía provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) de la actividad AspAP soluble del 36.12% con respecto al control (*Tabla R.4., Figura R.7C.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad AspAP soluble a ninguna de las dosis empleadas (*Tabla R.4., Figura R.7C.*).

El análisis del efecto de la orquidectomía y la posterior administración de testosterona sobre la actividad específica de AspAP unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

En el hipotálamo, la orquidectomía no provoca cambio significativo alguno de la actividad AspAP unida a membrana (*Tabla R.4., Figura R.8A.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados tampoco provoca variaciones significativas de la actividad AspAP unida a membrana con ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.4., Figura R.8A.*).

En la hipófisis, la orquidectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad AspAP unida a membrana (*Tabla R.4., Figura R.8B.*). Sin embargo, la administración de testosterona a animales orquidectomizados sí provoca un cambio en la actividad CysAP unida a membrana. Así, la administración de 3 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) del 76.77%, la administración de 6 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) del 77.25% y la administración de 12 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) del 75.74% (*Tabla R.4., Figura R.8B.*).

En las glándulas adrenales, la orquidectomía provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) de la actividad AspAP unida a membrana del 24.64% con respecto al control (*Tabla R.4., Figura R.8C.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de AspAP unida a membrana, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 6 mg/Kg de testosterona provoca un descenso significativo ($p < 0.01$) del 41.23%, mientras que la administración de 3 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.4., Figura R.8C.*).

AspAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	50.6 ± 6.0	34.1 ± 6.5	237.7 ± 21.6	58.2 ± 10.0	21.8 ± 2.6	47.6 ± 6.2
OR-C	89.6 ± 3.3	36.8 ± 3.2	226.8 ± 34.5	58.4 ± 13.2	29.7 ± 1.5	59.3 ± 4.1
T 3 mg/Kg	114.7 ± 10.7	51.1 ± 3.5	325.1 ± 88.2	102.9 ± 12.8	27.3 ± 4.5	53.7 ± 3.0
T 6 mg/Kg	50.8 ± 7.4	40.9 ± 5.0	274.8 ± 39.4	103.2 ± 19.3	15.6 ± 1.8	28.0 ± 2.5
T 12 mg/Kg	67.5 ± 9.6	40.1 ± 6.1	355.9 ± 34.5	102.3 ± 14.0	17.1 ± 2.2	37.6 ± 4.5

Tabla R.4. Valores de actividad específica de aspartato aminopeptidasa (AspAP) soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), orquidectomizados (OR-C) y orquidectomizados tratados con 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona (T). Los resultados se expresan en picomoles de aspartato-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 8).

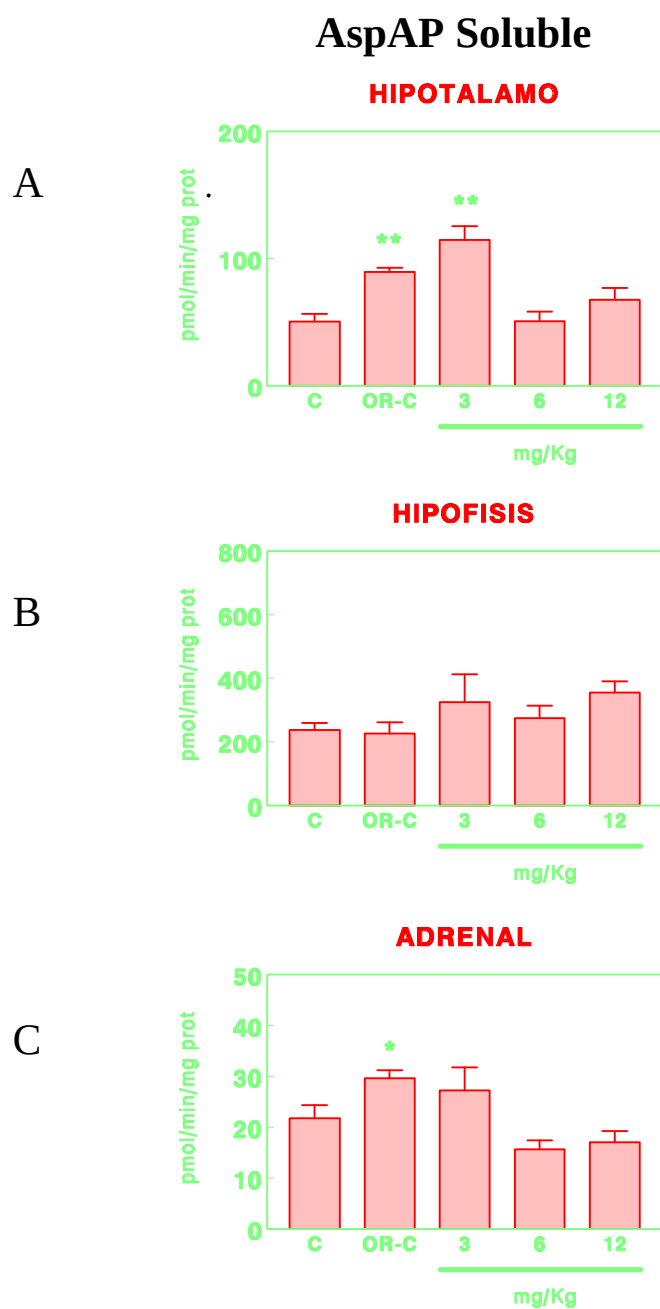


Figura R.7. Representación del efecto de la orquidectomía (OR-C) y la administración de 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona sobre la actividad específica de aspartato aminopeptidasa (AspAP) soluble en (A) hipotálamo, (B) hipófisis y (C) glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de aspartato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; n=8) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

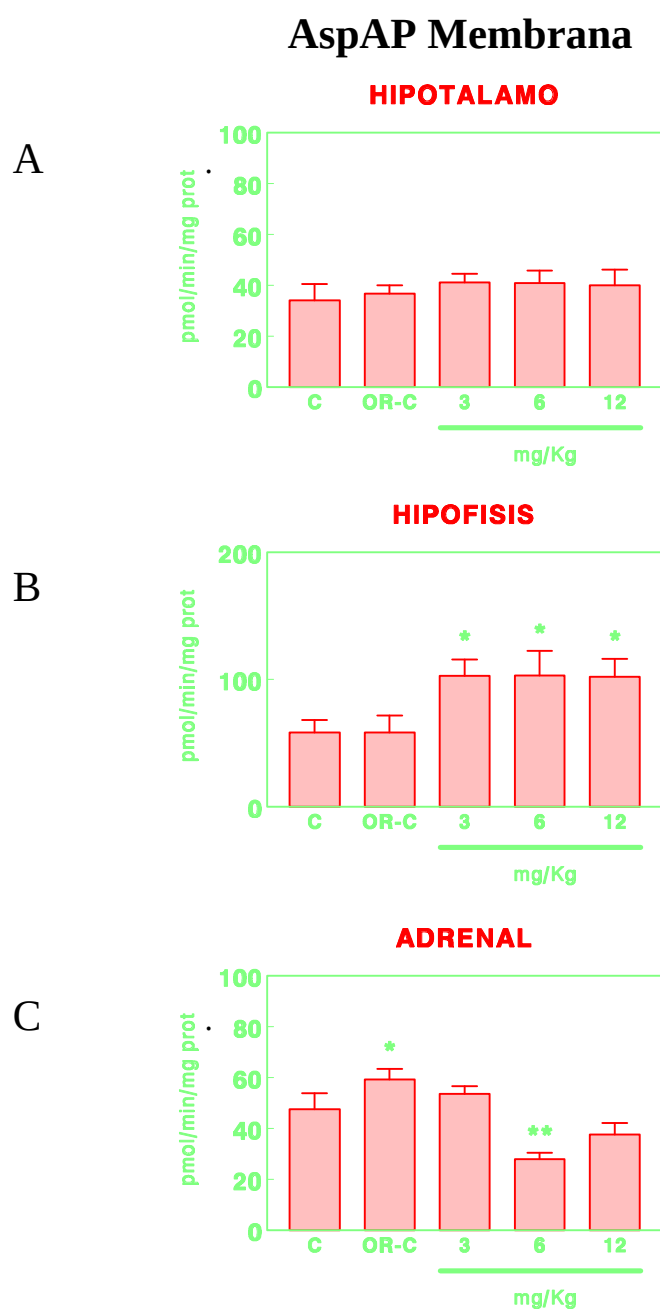


Figura R.8. Representación del efecto de la orquidectomía (OR-C) y la administración de 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona sobre la actividad específica de aspartato aminopeptidasa (AspAP) unida a membrana en (A) hipotálamo, (B) hipófisis y (C) glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de aspartato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; $n=8$) (* $p<0.05$; ** $p<0.01$).

1.5. Efecto de la orquidectomía y la administración de testosterona sobre la actividad específica de glutamato aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

El análisis del efecto de la orquidectomía y la posterior administración de testosterona sobre la actividad específica de glutamato aminopeptidasa (GluAP) soluble en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

En el hipotálamo, la orquidectomía provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) de la actividad GluAP soluble del 110.72% con respecto al control (*Tabla R.5., Figura R.9A.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de GluAP soluble, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 3 mg/Kg de testosterona provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 146.60%, mientras que la administración de 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.5., Figura R.9A.*).

En la hipófisis, la orquidectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad GluAP soluble (*Tabla R.5., Figura R.9B.*). Sin embargo, la administración de testosterona a animales orquidectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de GluAP soluble, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 3 mg/Kg de testosterona no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 6 mg/Kg de testosterona provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) del 34.89% y la administración de 12 mg/Kg de testosterona provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) del 32.89% (*Tabla R.5., Figura R.9B.*).

En las glándulas adrenales, la orquidectomía provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) de la actividad GluAP soluble del 26.94% con respecto al control (*Tabla R.5., Figura R.9C.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados también modifica la actividad específica de GluAP soluble, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 6 mg/Kg de testosterona provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) 39.59% y la administración de 12 mg/Kg de testosterona provoca un descenso significativo ($p < 0.01$) del 41.63%. Por el contrario, la administración de 3 mg/Kg de testosterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.5., Figura R.9C.*).

El análisis del efecto de la orquidectomía y la posterior administración de testosterona sobre la actividad específica de GluAP unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

En el hipotálamo, la orquidectomía no provoca cambio significativo alguno de la actividad GluAP unida a membrana (*Tabla R.5., Figura R.10A.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados tampoco provoca variaciones significativas de la actividad GluAP unida a membrana con ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.5., Figura R.10A.*).

En la hipófisis, la orquidectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad GluAP unida a membrana (*Tabla R.5., Figura R.10B.*). Sin embargo, la administración de

testosterona a animales orquidectomizados sí provoca un cambio en la actividad GluAP unida a membrana. Así, la administración de 3 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 42.43%, la administración de 6 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 49.57% y la administración de 12 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 54.20% (Tabla R.5., Figura R.10B.).

En las glándulas adrenales, la orquidectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad GluAP unida a membrana (Tabla R.5., Figura R.10C.). Sin embargo, la administración de testosterona a animales orquidectomizados sí provoca un cambio en la actividad específica de GluAP unida a membrana. Así, la administración de 6 mg/Kg de testosterona provoca un descenso significativo ($p<0.05$) del 20.54%, la administración de 12 mg/Kg de testosterona provoca un descenso significativo ($p<0.05$) del 21.39%, mientras que la administración de 3 mg/Kg de testosterona no provoca cambios significativos con respecto al control (Tabla R.5., Figura R.10C.).

GluAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	Soluble	Membrana	Soluble	Membrana	Soluble	Membrana
C	34.9 ± 2.3	37.1 ± 6.4	207.9 ± 19.5	61.9 ± 11.2	28.7 ± 2.9	64.6 ± 5.1
OR-C	73.5 ± 6.9	37.6 ± 2.9	166.9 ± 23.6	55.0 ± 11.3	36.5 ± 3.1	66.2 ± 3.4
T 3 mg/Kg	86.0 ± 7.4	47.0 ± 5.2	184.8 ± 23.2	88.1 ± 13.9	31.2 ± 3.6	67.6 ± 5.1
T 6 mg/Kg	33.5 ± 5.0	39.3 ± 5.7	135.4 ± 15.7	92.5 ± 14.7	17.4 ± 2.4	51.5 ± 3.8
T 12 mg/Kg	40.1 ± 7.5	50.5 ± 5.4	276.3 ± 29.5	95.4 ± 14.5	16.8 ± 2.9	50.8 ± 5.1

Tabla R.5. Valores de actividad específica de glutamato aminopeptidasa (GluAP) soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), orquidectomizados (OR-C) y orquidectomizados tratados con 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona (T). Los resultados se expresan en picomoles de glutamato-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 8).

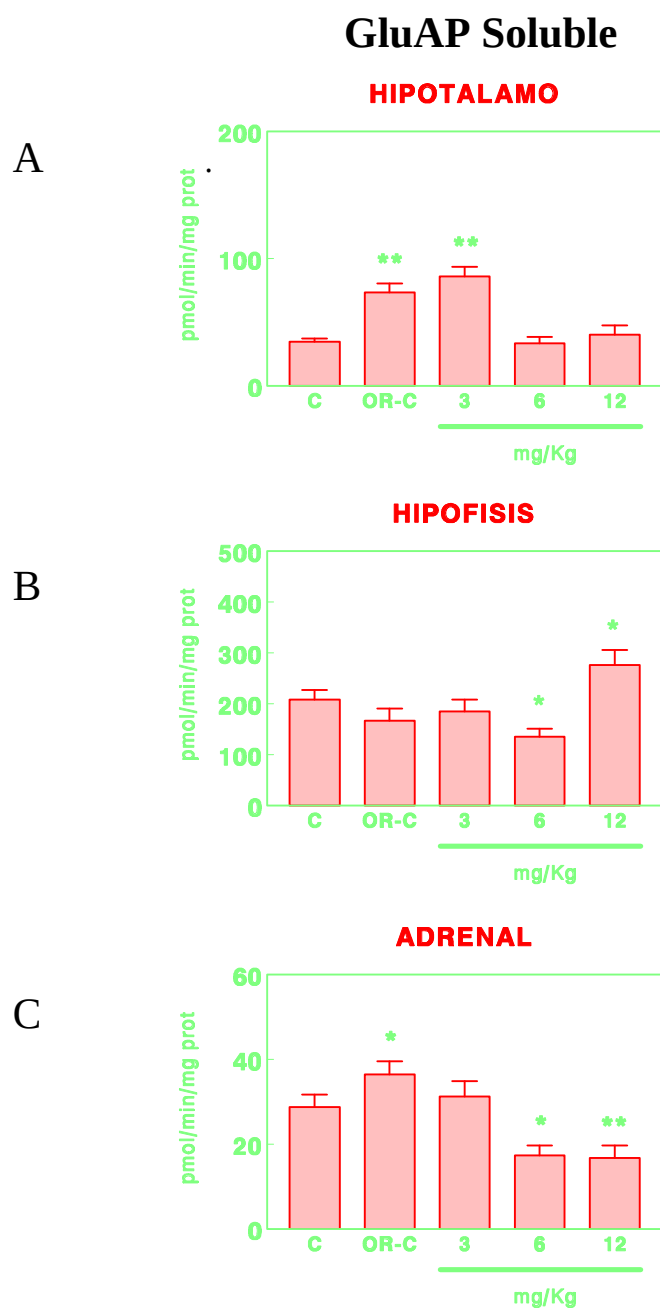


Figura R.9. Representación del efecto de la orquidectomía (OR-C) y la administración de 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona sobre la actividad específica de glutamato aminopeptidasa (GluAP) soluble en (A) hipotálamo, (B) hipófisis y (C) glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; n=8) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

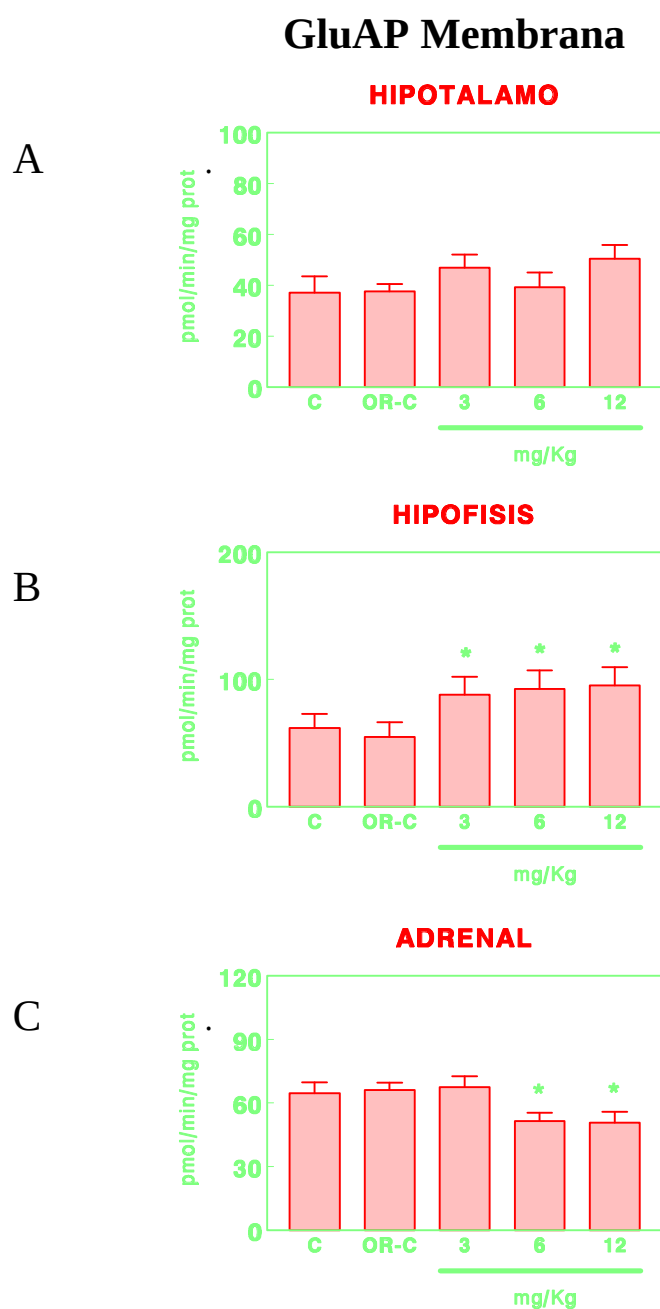


Figura R.10. Representación del efecto de la orquidectomía (OR-C) y la administración de 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona sobre la actividad específica de glutamato aminopeptidasa (GluAP) unida a membrana en (A) hipotálamo, (B) hipófisis y (C) glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; $n=8$) (* $p<0.05$).

1.6. Efecto de la orquidectomía y la administración de testosterona sobre la actividad específica de piroglutamato aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

El análisis del efecto de la orquidectomía y la posterior administración de testosterona sobre la actividad específica de piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP) soluble en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

En el hipotálamo, la orquidectomía provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) de la actividad pGluAP soluble del 37.74% con respecto al control (*Tabla R.6., Figura R.11A.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de pGluAP soluble, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 3 mg/Kg de testosterona provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 71.21%, la administración de 6 mg/Kg de testosterona provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) del 41.56%, mientras que la administración de 12 mg/Kg de testosterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.6., Figura R.11A.*).

En la hipófisis, la orquidectomía no provoca cambio significativo alguno de la actividad pGluAP soluble (*Tabla R.6., Figura R.11B.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados si modifica la actividad específica de pGluAP soluble. Así, aunque la administración de 3 mg/Kg y 6 mg/Kg de testosterona no provoca cambios significativos con respecto al control, la administración de 12 mg/Kg de testosterona provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 50.55% (*Tabla R.6., Figura R.11B.*).

En las glándulas adrenales, la orquidectomía provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) de la actividad pGluAP soluble del 17.01% con respecto al control (*Tabla R.6., Figura R.11C.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de pGluAP soluble, dependiendo de la dosis empleada. Así, mientras que la administración de 3 mg/Kg de testosterona no provoca cambios significativos con respecto al control, la administración de 6 mg/Kg de testosterona provoca un descenso significativo ($p < 0.01$) del 60.58% y la administración de 12 mg/Kg de testosterona provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) solamente del 24.48% (*Tabla R.6., Figura R.11C.*).

El análisis del efecto de la orquidectomía y la posterior administración de testosterona sobre la actividad específica de pGluAP unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

En el hipotálamo, la orquidectomía no provoca cambio significativo alguno de la actividad pGluAP unida a membrana (*Tabla R.6., Figura R.12A.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados tampoco provoca variaciones significativas de la actividad pGluAP unida a membrana con ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.6., Figura R.12A.*).

En la hipófisis, la orquidectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad pGluAP unida a membrana (*Tabla R.6., Figura R.12B.*). Sin embargo, la administración de testosterona a animales orquidectomizados sí provoca un cambio en la actividad pGluAP unida

a membrana. Así, la administración de 3 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 82.80%, la administración de 6 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 74.80% y la administración de 12 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 80.37% (Tabla R.6., Figura R.12B.).

En las glándulas adrenales, la orquidectomía provoca un incremento significativo ($p<0.05$) de la actividad pGluAP unida a membrana del 22.59% con respecto al control (Tabla R.6., Figura R.12C.). La administración de testosterona a animales orquidectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de pGluAP unida a membrana, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 6 mg/Kg de testosterona provoca un descenso significativo ($p<0.05$) del 25.51%, mientras que la administración de 3 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona no provoca cambios significativos con respecto al control (Tabla R.6., Figura R.12C.).

pGluAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	9.1 ± 1.1	11.1 ± 1.9	29.1 ± 2.9	11.1 ± 2.3	57.3 ± 5.8	25.2 ± 2.4
OR-C	12.6 ± 0.9	11.3 ± 1.0	30.8 ± 4.9	10.8 ± 2.4	67.0 ± 4.5	31.0 ± 1.6
T 3 mg/Kg	15.6 ± 1.4	14.0 ± 1.2	27.9 ± 4.6	20.3 ± 2.7	48.0 ± 4.0	26.5 ± 1.1
T 6 mg/Kg	5.3 ± 0.8	10.2 ± 1.4	26.3 ± 3.2	19.4 ± 1.9	22.6 ± 1.8	18.8 ± 1.1
T 12 mg/Kg	7.7 ± 1.1	12.4 ± 1.8	43.8 ± 8.5	20.0 ± 2.5	43.3 ± 4.0	20.8 ± 1.8

Tabla R.6. Valores de actividad específica de piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP) soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), orquidectomizados (OR-C) y orquidectomizados tratados con 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona (T). Los resultados se expresan en picomoles de piroglutamato-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 8).

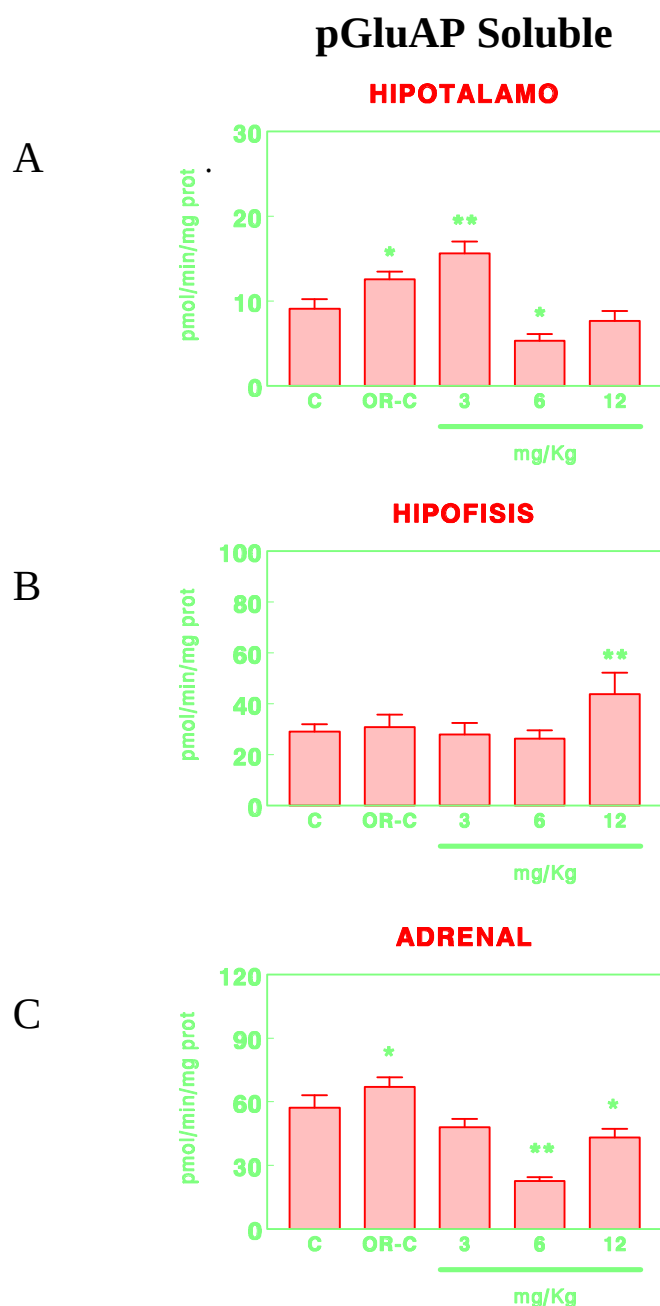


Figura R.11. Representación del efecto de la orquidectomía (OR-C) y la administración de 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona sobre la actividad específica de piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP) soluble en (A) hipotálamo, (B) hipófisis y (C) glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de piroglutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; n=8) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

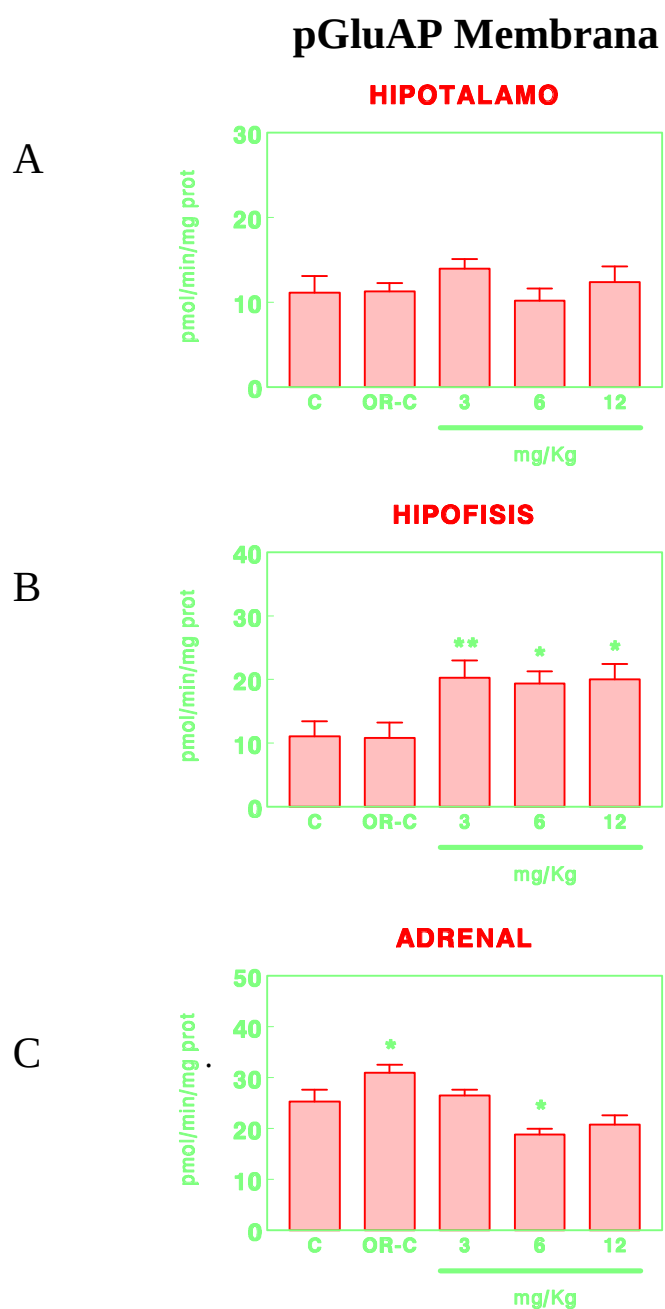


Figura R.12. Representación del efecto de la orquidectomía (OR-C) y la administración de 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona sobre la actividad específica de piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP) unida a membrana en (A) hipotálamo, (B) hipófisis y (C) glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de piroglutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; n=8) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

1.7. Efecto de la orquidectomía y la administración de testosterona sobre la actividad específica de leucina aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

El análisis del efecto de la orquidectomía y la posterior administración de testosterona sobre la actividad específica de leucina aminopeptidasa (LeuAP) soluble en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

En el hipotálamo, la orquidectomía no provoca cambio significativo alguno de la actividad LeuAP soluble (*Tabla R.7., Figura R.13A.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados tampoco provoca variaciones significativas de la actividad LeuAP soluble con ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.7., Figura R.13A.*).

En la hipófisis, la orquidectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad LeuAP soluble (*Tabla R.7., Figura R.13B.*). Sin embargo, la administración de testosterona a animales orquidectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de LeuAP soluble, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 3 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 6 mg/Kg de testosterona provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) del 22.58% (*Tabla R.7., Figura R.13B.*).

En las glándulas adrenales, la orquidectomía provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) de la actividad LeuAP soluble del 33.91% con respecto al control (*Tabla R.7., Figura R.13C.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad LeuAP soluble a ninguna de las dosis empleadas (*Tabla R.7., Figura R.13C.*).

El análisis del efecto de la orquidectomía y la posterior administración de testosterona sobre la actividad específica de LeuAP unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

En el hipotálamo, la orquidectomía no provoca cambio significativo alguno de la actividad LeuAP unida a membrana (*Tabla R.7., Figura R.14A.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados tampoco provoca variaciones significativas de la actividad LeuAP unida a membrana con ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.7., Figura R.14A.*).

En la hipófisis, la orquidectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad LeuAP unida a membrana (*Tabla R.7., Figura R.14B.*). Sin embargo, la administración de testosterona a animales orquidectomizados sí provoca un cambio en la actividad LeuAP unida a membrana. Así, la administración de 3 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) del 60.15%, la administración de 6 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) del 67.16% y la administración de 12 mg/Kg de testosterona provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) del 60.20% (*Tabla R.7., Figura R.14B.*).

En las glándulas adrenales, la orquidectomía no provoca cambio significativo alguno de la actividad LeuAP unida a membrana (*Tabla R.7., Figura R.14C.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados tampoco provoca variaciones significativas de la actividad LeuAP unida a membrana con ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.7., Figura R.14C.*).

LeuAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	686.6 ± 82.5	70.5 ± 6.7	459.6 ± 36.4	349.2 ± 59.9	374.9 ± 35.3	167.1 ± 11.2
OR-C	803.2 ± 38.6	64.2 ± 8.2	491.3 ± 50.1	380.1 ± 72.9	502.1 ± 35.8	190.9 ± 14.6
T 3 mg/Kg	827.4 ± 36.5	67.2 ± 6.7	422.6 ± 41.7	559.2 ± 79.3	454.7 ± 44.6	186.5 ± 15.0
T 6 mg/Kg	710.6 ± 39.5	74.3 ± 12.3	355.8 ± 24.1	583.7 ± 96.9	463.8 ± 45.3	159.5 ± 6.3
T 12 mg/Kg	839.4 ± 65.3	59.1 ± 9.1	479.8 ± 35.1	559.4 ± 84.0	426.2 ± 41.2	160.7 ± 14.0

Tabla R.7. Valores de actividad específica de leucina aminopeptidasa (LeuAP) soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), orquidectomizados (OR-C) y orquidectomizados tratados con 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona (T). Los resultados se expresan en picomoles de leucina-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 8).

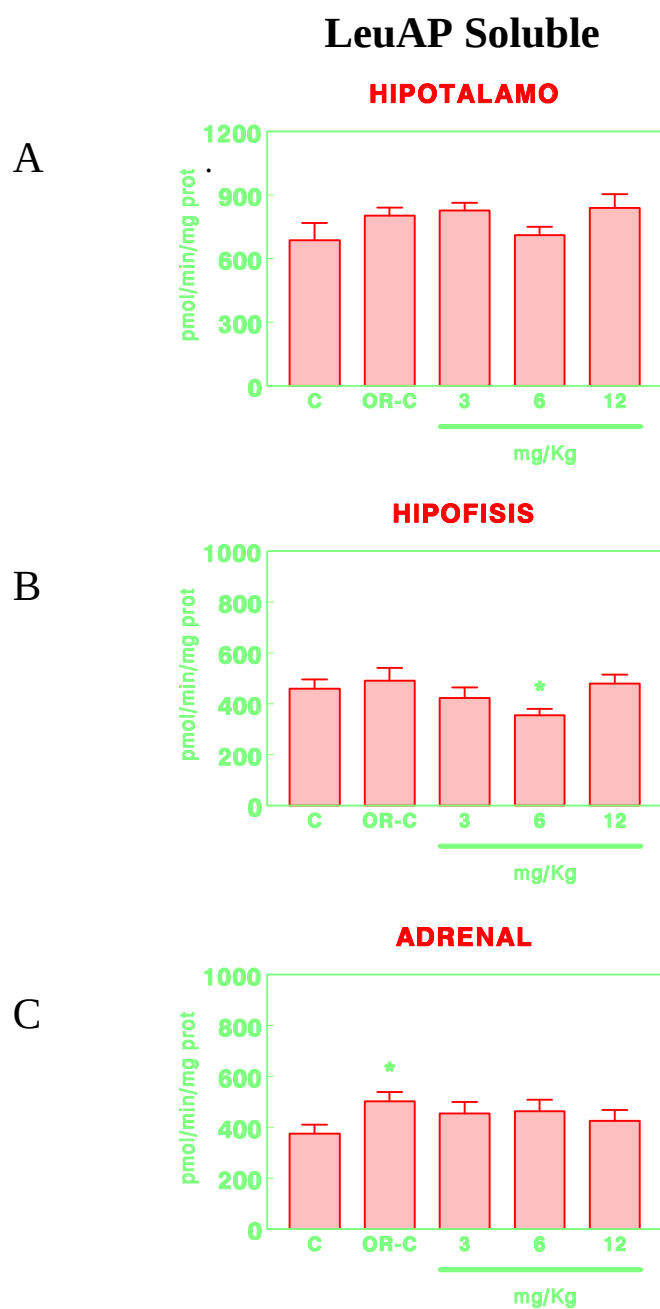


Figura R.13. Representación del efecto de la orquidectomía (OR-C) y la administración de 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona sobre la actividad específica de leucina aminopeptidasa (LeuAP) soluble en (A) hipotálamo, (B) hipófisis y (C) glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; $n=8$) (* $p<0.05$).

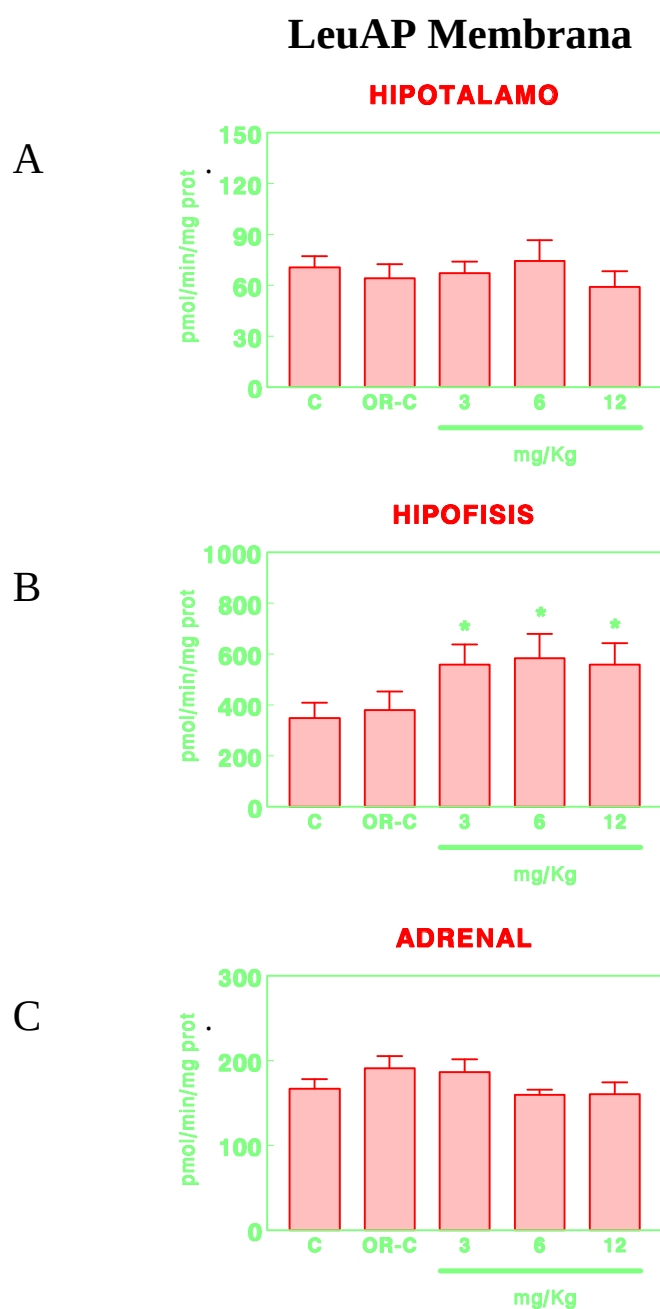


Figura R.14. Representación del efecto de la orquidectomía (OR-C) y la administración de 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona sobre la actividad específica de leucina aminopeptidasa (LeuAP) unida a membrana en (A) hipotálamo, (B) hipófisis y (C) glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; n=8) (* $p < 0.05$).

1.8. Efecto de la orquidectomía y la administración de testosterona sobre la actividad específica de tirosina aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis- glándulas adrenales de ratón.

El análisis del efecto de la orquidectomía y la posterior administración de testosterona sobre la actividad específica de tirosina aminopeptidasa (TyrAP) soluble en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

En el hipotálamo, la orquidectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad TyrAP soluble (*Tabla R.8., Figura R.15A.*). Sin embargo, la administración de testosterona a animales orquidectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad TyrAP soluble dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 3 mg/Kg de testosterona provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 31.40% y la administración de 6 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 32.12%, mientras que la administración de 6 mg/Kg de testosterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.8., Figura R.15A.*).

En la hipófisis, la orquidectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad TyrAP soluble (*Tabla R.8., Figura R.15B.*). Sin embargo, la administración de testosterona a animales orquidectomizados sí provoca un efecto diferencial sobre la actividad TyrAP soluble. Así, mientras que la administración de 3 mg/Kg no provoca cambios significativos con respecto al control, la administración de 6 mg/Kg de testosterona provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) del 25.81%, y la administración de 12 mg/Kg de testosterona provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 49.40% (*Tabla R.8., Figura R.15B.*).

En las glándulas adrenales, la orquidectomía provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) de la actividad TyrAP soluble del 17.56% con respecto al control (*Tabla R.8., Figura R.15C.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad TyrAP soluble a ninguna de las dosis empleadas (*Tabla R.8., Figura R.15C.*).

El análisis del efecto de la orquidectomía y la posterior administración de testosterona sobre la actividad específica de TyrAP unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

En el hipotálamo, la orquidectomía no provoca cambio significativo alguno de la actividad TyrAP unida a membrana (*Tabla R.8., Figura R.16A.*). La administración de testosterona a animales orquidectomizados tampoco provoca variaciones significativas de la actividad TyrAP unida a membrana con ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.8., Figura R.16A.*).

En la hipófisis, la orquidectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad TyrAP unida a membrana (*Tabla R.8., Figura R.16B.*). Sin embargo, la administración de testosterona a animales orquidectomizados sí provoca un cambio dosis-dependiente en la actividad TyrAP unida a membrana. Así, la administración de 3 mg/Kg provoca un incremento

significativo ($p < 0.05$) del 64.86%, la administración de 6 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) del 72.88% y la administración de 12 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 110.83% (Tabla R.8., Figura R.16B.)

En las glándulas adrenales, la orquidectomía provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) de la actividad TyrAP unida a membrana del 22.66% con respecto al control (Tabla R.8., Figura R.16C.). La administración de testosterona a animales orquidectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad TyrAP unida a membrana a ninguna de las dosis empleadas (Tabla R.8., Figura R.16C.).

TyrAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	Soluble	Membrana	Soluble	Membrana	Soluble	Membrana
C	207.3 ± 13.5	34.9 ± 5.1	330.2 ± 17.2	67.2 ± 10.9	81.0 ± 5.3	86.9 ± 8.0
OR-C	233.5 ± 10.8	40.5 ± 7.3	333.3 ± 39.0	55.7 ± 13.3	95.3 ± 5.5	106.6 ± 7.2
T 3 mg/Kg	272.4 ± 13.9	40.6 ± 3.3	329.6 ± 23.1	110.8 ± 17.5	90.8 ± 9.4	88.3 ± 4.3
T 6 mg/Kg	209.6 ± 5.9	40.3 ± 6.3	244.9 ± 17.6	116.2 ± 12.8	80.6 ± 5.9	71.3 ± 3.4
T 12 mg/Kg	273.9 ± 16.1	43.6 ± 6.5	493.3 ± 41.7	141.7 ± 18.9	77.1 ± 6.3	85.2 ± 8.6

Tabla R.8. Valores de actividad específica de tirosina aminopeptidasa (TyrAP) soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), orquidectomizados (OR-C) y orquidectomizados tratados con 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona (T). Los resultados se expresan en picomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; $n = 8$).

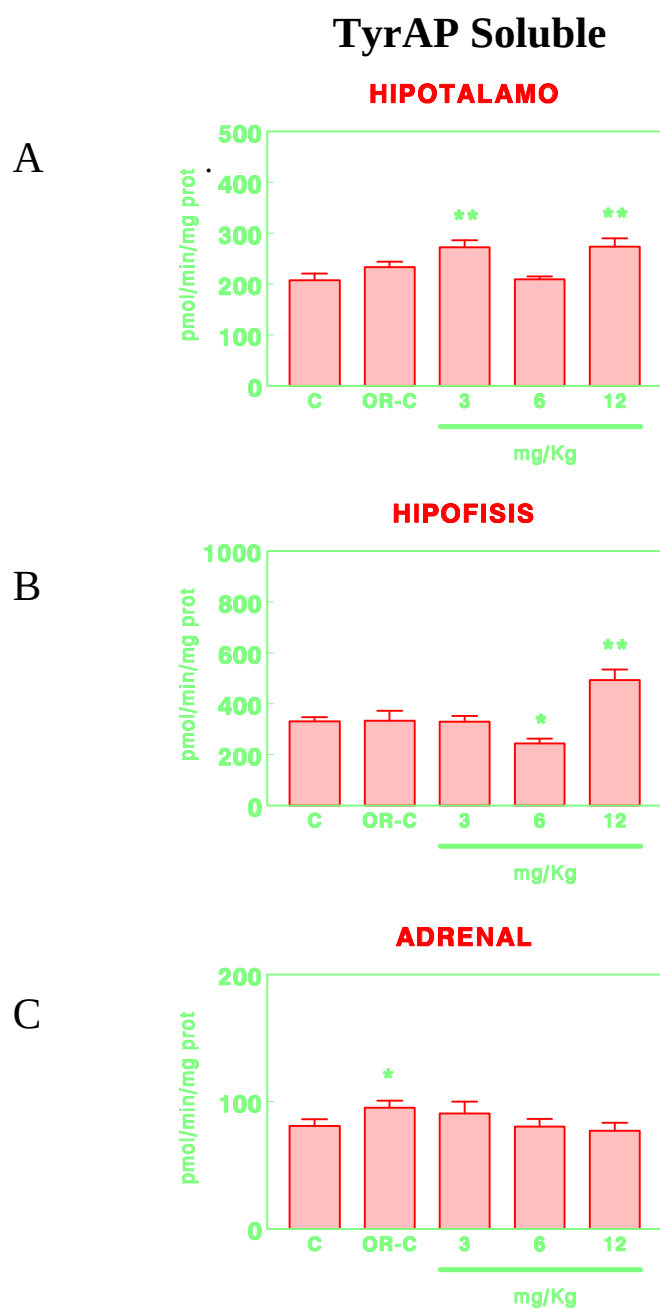


Figura R.15. Representación del efecto de la orquidectomía (OR-C) y la administración de 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona sobre la actividad específica de tirosina aminopeptidasa (TyrAP) soluble en (A) hipotálamo, (B) hipófisis y (C) glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; n=8) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

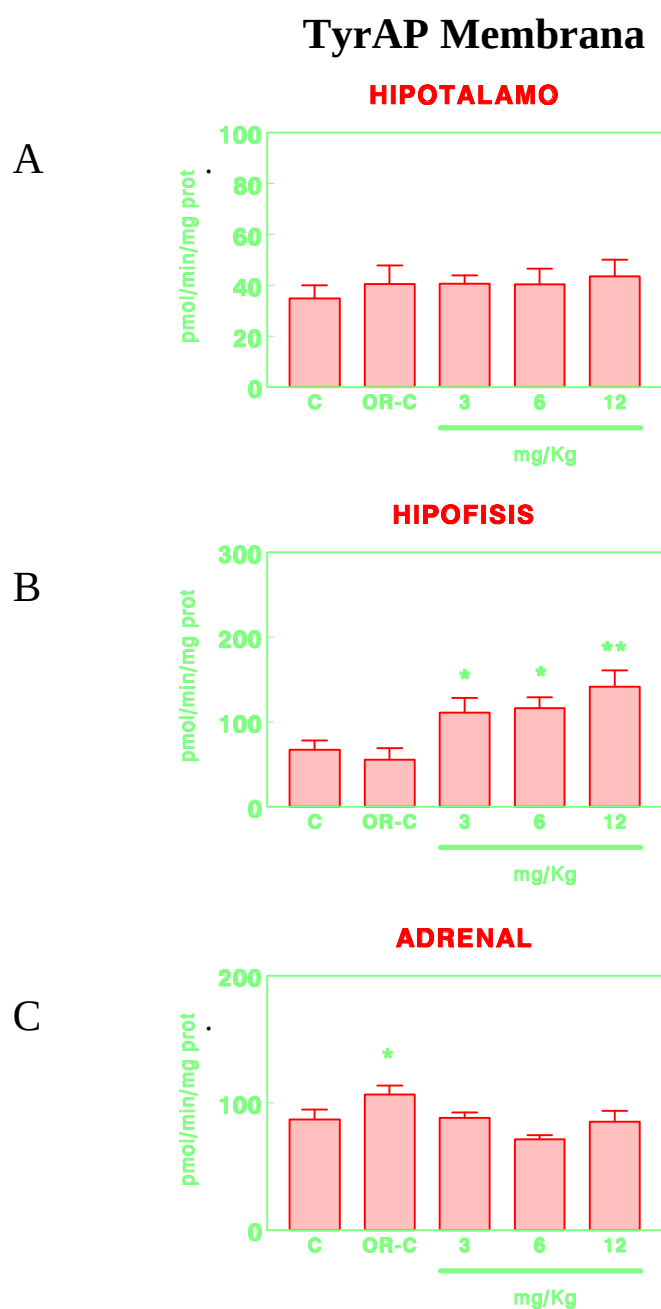


Figura R.16. Representación del efecto de la orquidectomía (OR-C) y la administración de 3 mg/Kg, 6 mg/Kg y 12 mg/Kg de testosterona sobre la actividad específica de tirosina aminopeptidasa (TyrAP) unida a membrana en (A) hipotálamo, (B) hipófisis y (C) glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; n=8) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

2. EFECTO DE LA OVARIDECTOMÍA Y LA ADMINISTRACIÓN DE ESTRADIOL Y PROGESTERONA SOBRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GLÁNDULAS ADRENALES DE RATÓN.

2.1. Efecto de la ovariectomía y la administración de estradiol y progesterona sobre la actividad específica de alanina aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de alanina aminopeptidasa (AlaAP) soluble en el hipotálamo de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad AlaAP soluble (*Tabla R.9., Tabla R.10., Tabla R.11., Figura R.17.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad AlaAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.9., Figura R.17A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados si provoca cambios en la actividad específica de AlaAP soluble. Así, la administración de 200 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 20.57% y la administración de 400 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 55.69%. La administración de 100 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.10., Figura R.17B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna de la actividad AlaAP soluble en el hipotálamo a ninguna de las dosis empleadas (*Tabla R.11.,Figura R.17C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de AlaAP unida a membrana en el hipotálamo de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad AlaAP unida a membrana (*Tabla R.9., Tabla R.10., Tabla R.11., Figura R.18.*). La administración de las dosis más bajas (10 mg/Kg y 20 mg/Kg de estradiol) a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 40 mg/Kg de estradiol provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 66.03% en la actividad AlaAP unida a membrana (*Tabla R.9., Figura R.18A.*). La administración de la dosis más bajas (100 mg/Kg y 200 mg/Kg de progesterona) a animales ovariectomizados tampoco provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 400 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 67.32% (*Tabla R.10., Figura R.18B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados provoca una disminución en la actividad AlaAP unida a membrana. Así, la administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona provoca una disminución significativa ($p<0.05$) del 28.25%, la administración de 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona provoca una disminución significativa ($p<0.05$) del 22.68%, y la administración de 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p<0.05$) del 30.68% (*Tabla R.11., Figura R.18C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de AlaAP soluble en la hipófisis de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca cambio significativo alguno de la actividad AlaAP soluble (*Tabla R.9., Tabla R.10., Tabla R.11., Figura R.19.*). La administración de las dosis más altas (20 mg/Kg y 40 mg/Kg) de estradiol a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 10 mg/Kg de estradiol provoca un descenso significativo ($p<0.05$) del 41.63% en la actividad AlaAP soluble (*Tabla R.9., Figura R.19.A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados también provoca cambios en la actividad AlaAP soluble. Así, la administración de 100 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 33.41%, la administración de 200 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 64.64% y la administración de 400 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 58.49% (*Tabla R.10., Figura R.19B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de AlaAP soluble, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 39.87% (*Tabla R.11., Figura R.19C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de AlaAP unida a membrana en la hipófisis de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca cambio significativo alguno de la actividad AlaAP unida a membrana (*Tabla R.9., Tabla R.10., Tabla R.11., Figura R.20.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad AlaAP unida a membrana con ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.9., Figura R.20A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de AlaAP unida a membrana, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 100 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 200 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 110.49% (*Tabla R.10., Figura R.20B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad AlaAP unida a membrana con ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.11., Figura R.20C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de AlaAP soluble en las glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca modificación significativa alguna de la actividad AlaAP soluble (*Tabla R.9., Tabla R.10., Tabla R.11., Figura R.21.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados provoca un cambio dosis-dependiente en la actividad AlaAP soluble. Así, la administración de 10 mg/Kg provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 34.21%, la administración de 20 mg/Kg provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 37.06%, y la administración de 40 mg/Kg provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 39.33% (*Tabla R.9., Figura R.21A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna de la actividad AlaAP soluble a ninguna de las dosis empleadas (*Tabla R.10., Figura R.21B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados provoca una disminución en la actividad específica de AlaAP soluble. Así, la administración de 20mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p<0.05$) del 23.41%, la administración de 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 27.08%. La administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.11., Figura R.21C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de AlaAP unida a membrana en las glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía provoca un incremento significativo medio ($p<0.05$) de la actividad AlaAP unida a membrana del 36.68% (*Tabla R.9., Tabla R.10., Tabla R.11., Figura R.22.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados también provoca un incremento dosis-dependiente en la actividad AlaAP unida a membrana. Así, la administración de 10 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 74.35%, la administración de 20 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 88.78%, y la administración de 40 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 97.67% (*Tabla R.9., Figura R.22A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna de la actividad AlaAP unida a membrana a ninguna de las dosis empleadas (*Tabla R.10., Figura R.22B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados provoca un incremento en la actividad específica de AlaAP unida a membrana. Así, la administración de 20mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 37.15%, la administración de 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 61.88%, si bien la administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.11., Figura R.22C.*).

AlaAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	542.1 ± 8.0	124.0 ± 30.6	526.8 ± 110.7	70.3 ± 19.6	230.6 ± 20.3	232.0 ± 10.9
OV-C	552.0 ± 61.2	144.2 ± 9.6	647.1 ± 30.4	96.1 ± 18.0	224.1 ± 14.6	335.2 ± 12.0
E 10 mg/Kg	480.7 ± 36.5	144.6 ± 12.3	307.5 ± 24.4	98.7 ± 8.7	151.7 ± 12.0	404.5 ± 34.6
E 20 mg/Kg	582.2 ± 41.7	169.3 ± 9.4	397.9 ± 26.9	105.4 ± 10.3	145.1 ± 4.8	438.0 ± 25.2
E 40 mg/Kg	493.9 ± 29.8	205.9 ± 17.6	492.4 ± 86.3	100.5 ± 19.2	139.9 ± 6.0	458.6 ± 21.3

Tabla R.9. Valores de actividad específica de alanina aminopeptidasa (AlaAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol (E). Los resultados se expresan en picomoles de alanina-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

AlaAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	524.2 ± 41.4	127.3 ± 14.7	539.2 ± 61.5	74.3 ± 9.7	208.1 ± 7.9	239.1 ± 28.0
OV-C	538.9 ± 26.4	143.9 ± 10.9	689.5 ± 74.4	108.6 ± 8.9	206.4 ± 24.2	331.2 ± 24.7
P 100 mg/Kg	539.5 ± 42.8	156.1 ± 23.3	719.4 ± 64.0	80.7 ± 14.3	208.9 ± 21.3	217.7 ± 30.1
P 200 mg/Kg	632.0 ± 45.4	172.4 ± 14.4	887.8 ± 37.4	156.4 ± 27.9	194.4 ± 12.1	238.9 ± 23.5
P 400 mg/Kg	816.2 ± 32.7	212.9 ± 19.7	854.6 ± 47.9	98.7 ± 14.7	206.1 ± 11.9	233.0 ± 47.4

Tabla R.10. Valores de actividad específica de alanina aminopeptidasa (AlaAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 100 mg/Kg , 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona (P). Los resultados se expresan en picomoles de alanina-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

AlaAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	559.9 ± 31.6	122.5 ± 10.5	531.9 ± 61.7	73.2 ± 21.2	201.2 ± 14.1	239.4 ± 10.1
OV-C	559.4 ± 45.5	133.6 ± 12.3	684.9 ± 41.7	88.5 ± 18.9	194.7 ± 18.7	304.1 ± 12.8
E + P 10 + 100 mg/Kg	510.8 ± 28.9	87.9 ± 9.6	592.8 ± 80.8	105.7 ± 24.4	160.9 ± 8.4	256.4 ± 22.1
E + P 20 + 200 mg/Kg	555.8 ± 30.7	94.7 ± 14.5	744.0 ± 85.3	105.9 ± 19.4	154.1 ± 11.3	328.3 ± 26.3
E + P 40 + 400 mg/Kg	640.6 ± 44.7	84.9 ± 9.1	603.5 ± 38.9	115.0 ± 23.3	146.7 ± 17.5	387.5 ± 34.1

Tabla R.11. Valores de actividad específica de alanina aminopeptidasa (AlaAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona (E + P). Los resultados se expresan en picomoles de alanina-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

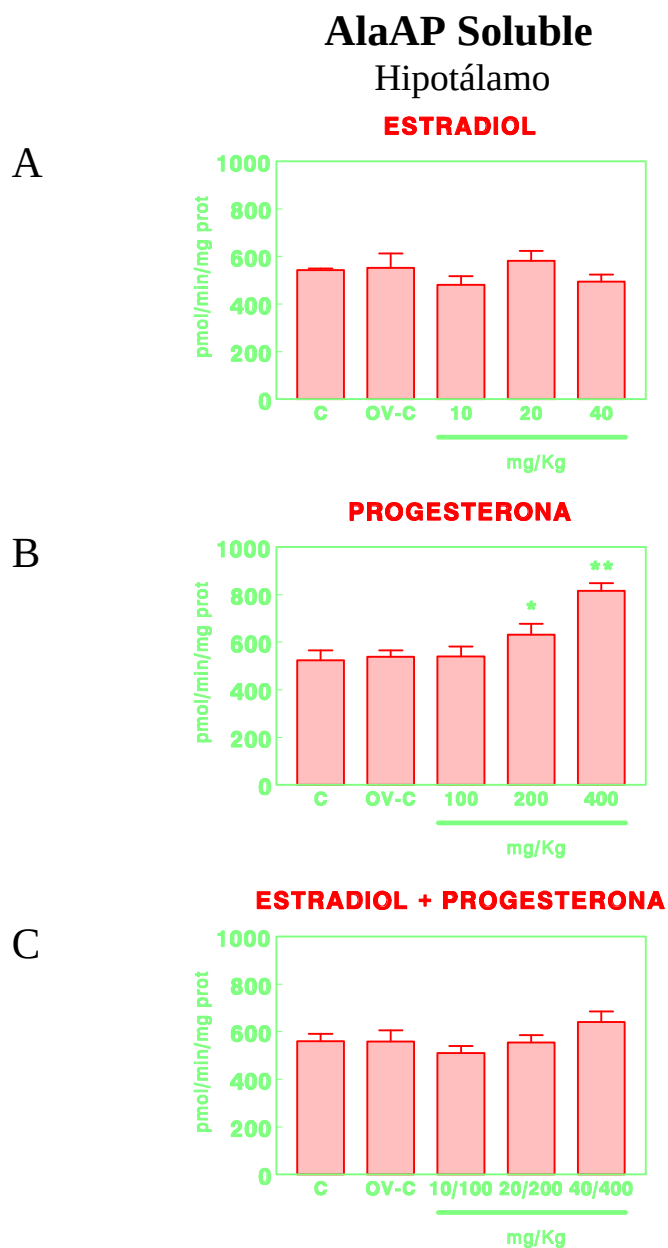


Figura R.17. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de alanina aminopeptidasa (AlaAP) soluble en el hipotálamo de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

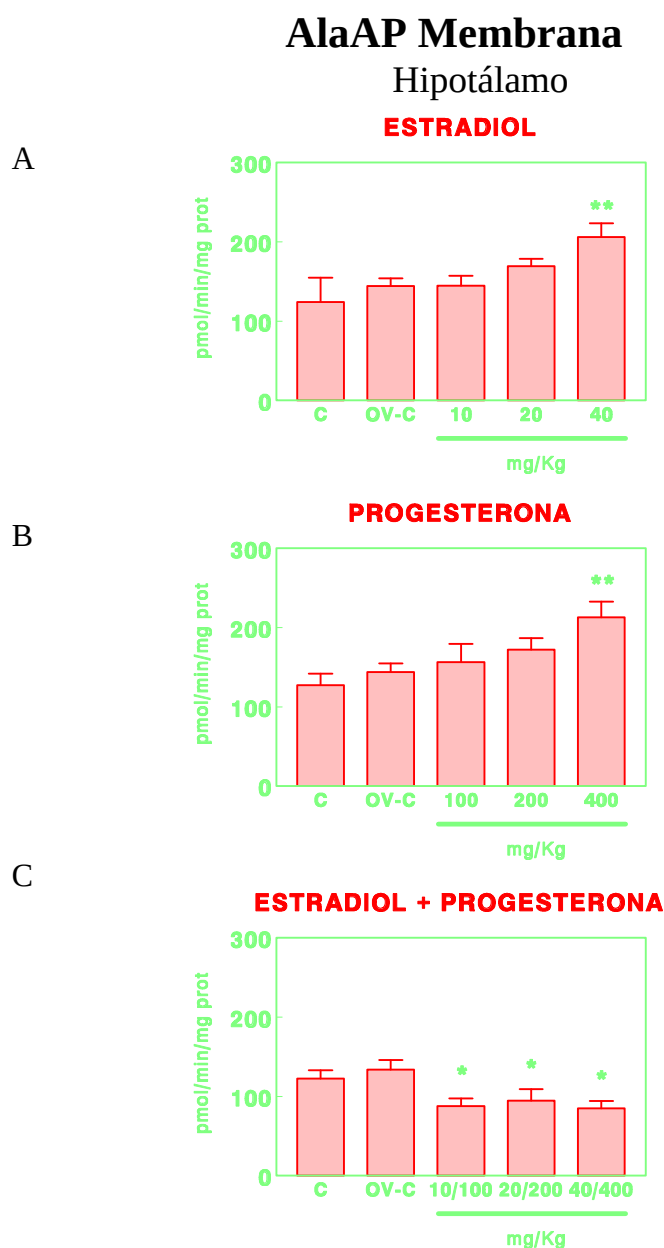


Figura R.18. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de alanina aminopeptidasa (AlaAP) unida a membrana en el hipotálamo de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

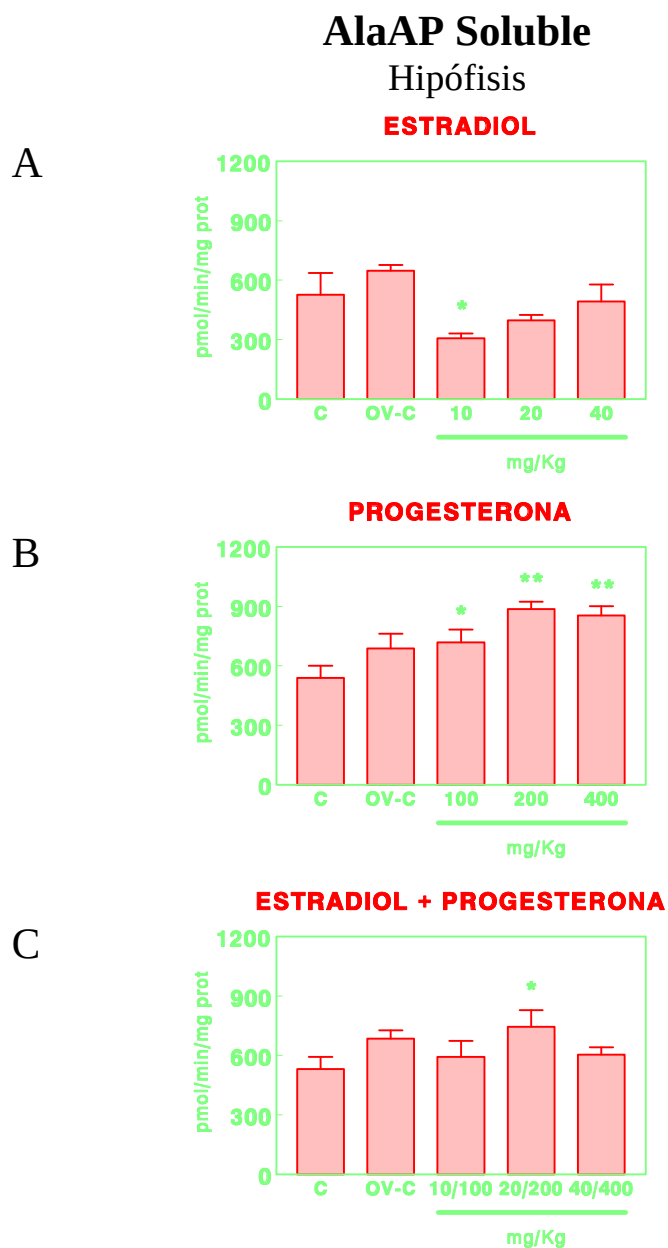


Figura R.19. Representación del efecto de la ovariectomía y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona, 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de alanina aminopeptidasa (AlaAP) soluble en la hipófisis de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

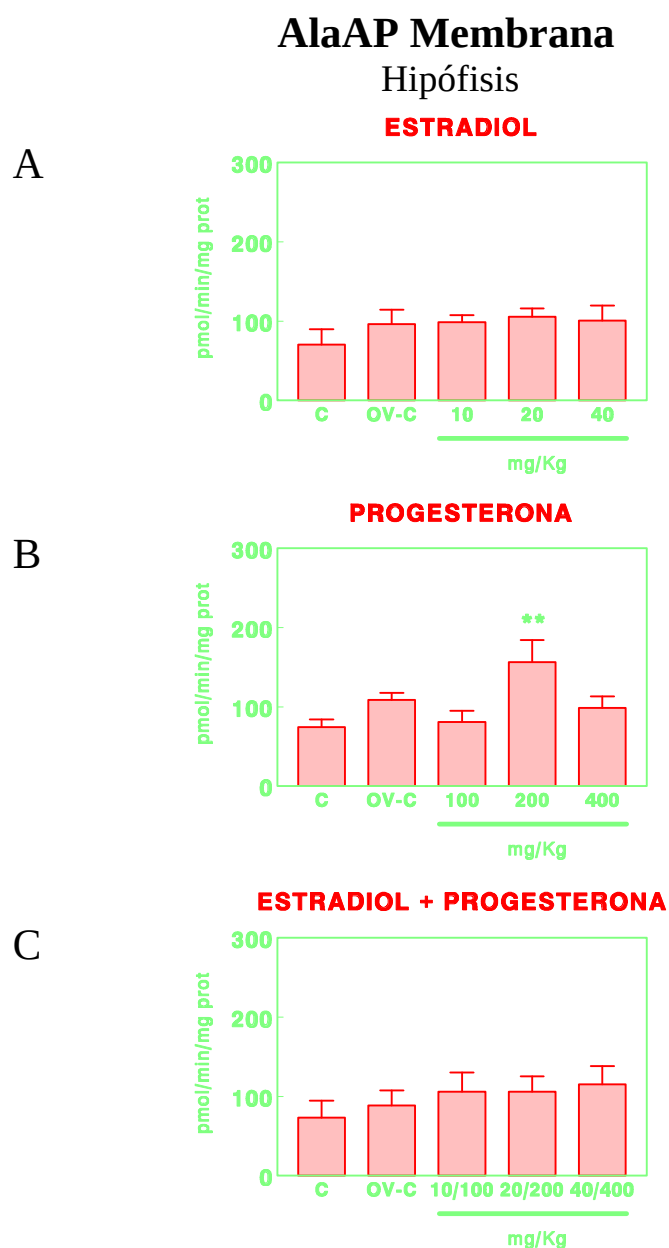


Figura R.20. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de alanina aminopeptidasa (AlaAP) unida a membrana en la hipófisis de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=8) (** $p < 0.01$).

AlaAP Soluble

Glándulas adrenales

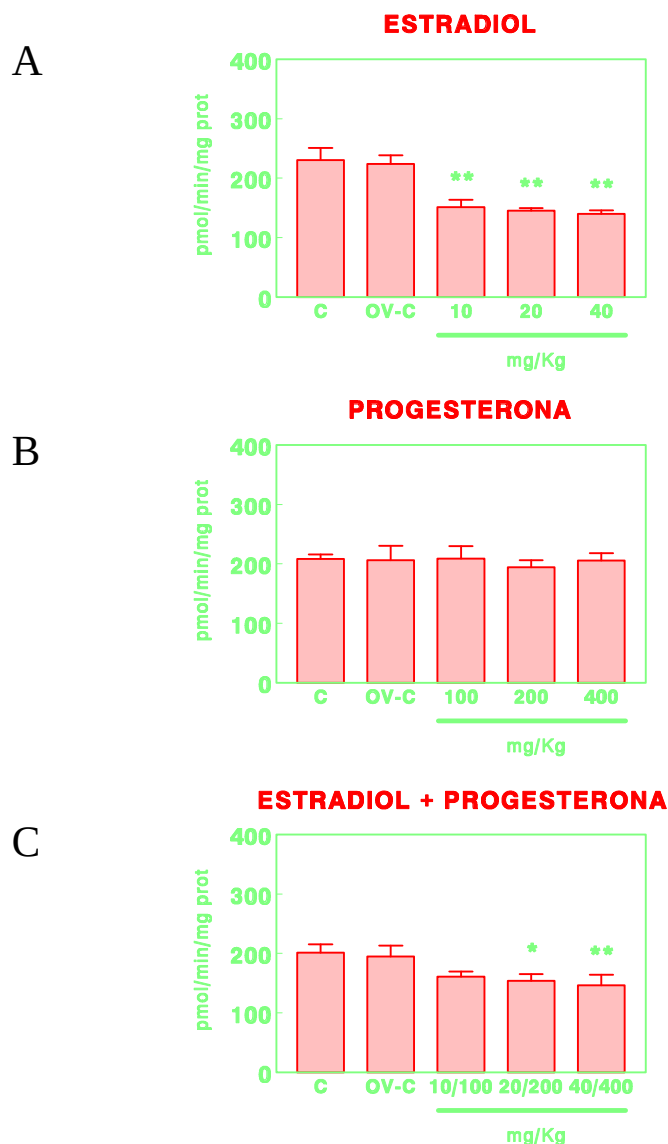


Figura R.21. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de alanina aminopeptidasa (AlaAP) soluble en las glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

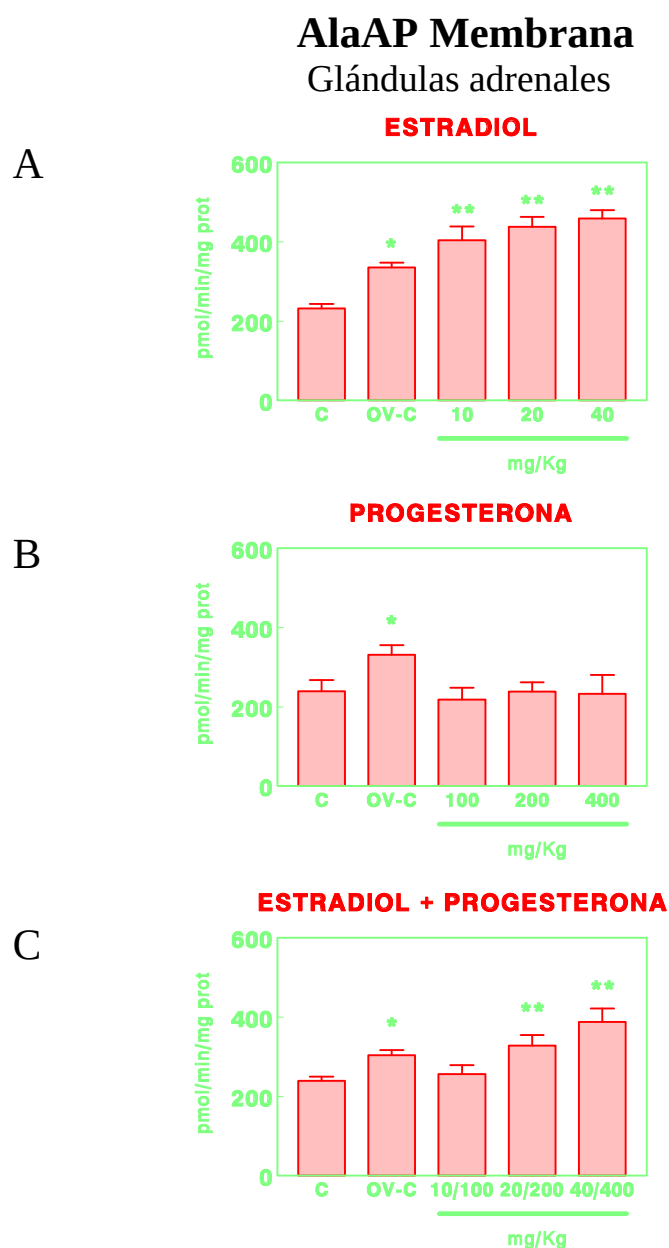


Figura R.22. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de alanina aminopeptidasa (AlaAP) unida a membrana en las glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

2.2. Efecto de la ovariectomía y la administración de estradiol y progesterona sobre la actividad específica de arginina aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de arginina aminopeptidasa (ArgAP) soluble en el hipotálamo de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad ArgAP soluble (*Tabla R.12., Tabla R.13., Tabla R.14., Figura R.23.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad ArgAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.12., Figura R.23A.*). La administración de las dosis más bajas (100 mg/Kg y 200 mg/Kg) de progesterona a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 400 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 37.85% en la actividad ArgAP soluble (*Tabla R.13., Figura R.23B.*). La administración conjunta de las dosis más bajas de estradiol y progesterona (10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona y 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona) a animales ovariectomizados tampoco provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 28.62% (*Tabla R.14., Figura R.23C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de ArgAP unida a membrana en el hipotálamo de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía provoca un incremento significativo medio ($p<0.05$) de la actividad ArgAP unida a membrana del 40.55% (*Tabla R.12., Tabla R.13., Tabla R.14., Figura R.24.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad ArgAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.12., Figura R.24A.*). La administración de las dosis más bajas (100 mg/Kg y 200 mg/Kg) de progesterona a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 400 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 44.15% en la actividad ArgAP unida a membrana (*Tabla R.13., Figura R.24B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad ArgAP unida a membrana con ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.14., Figura R.24C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de ArgAP soluble en la hipófisis de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía provoca un incremento significativo medio ($p<0.01$) de la actividad ArgAP soluble del 43.01% (*Tabla R.12., Tabla R.13., Tabla R.14., Figura R.25.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad ArgAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.12., Figura R.25A.*). Sin embargo, la administración de progesterona a animales ovariectomizados sí provoca un incremento dosis-dependiente en la actividad ArgAP soluble. Así, la administración de 100 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 46.71%, la administración de 200 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 68.02% y la administración de 400 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 72.09% (*Tabla R.13., Figura R.25B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de ArgAP soluble, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 58.34% (*Tabla R.14., Figura R.25C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de ArgAP unida a membrana en la hipófisis de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad ArgAP unida a membrana (*Tabla R.12., Tabla R.13., Tabla R.14., Figura R.26.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad ArgAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.12., Figura R.26A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de ArgAP unida a membrana, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 100 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 200 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 44.75% (*Tabla R.13., Figura R.26B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad ArgAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.14., Figura R.26C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de ArgAP soluble en las glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca modificación significativa alguna de la actividad ArgAP soluble (*Tabla R.12.*, *Tabla R.13.*, *Tabla R.14.*, *Figura R.27.*). Sin embargo, la administración de estradiol a animales ovariectomizados provoca un cambio dosis-dependiente en la actividad ArgAP soluble. Así, la administración de 10 mg/Kg provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 26.15%, la administración de 20 mg/Kg provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 30.13%, y la administración de 40 mg/Kg provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 33.55% (*Tabla R.12.*, *Figura R.27A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna de la actividad ArgAP soluble a ninguna de las dosis empleadas (*Tabla R.13.*, *Figura R.27B.*), mientras que la administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna de la actividad ArgAP soluble a ninguna de las dosis empleadas (*Tabla R.14.*, *Figura R.27C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de ArgAP unida a membrana en las glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía provoca un incremento significativo medio ($p<0.05$) de la actividad ArgAP unida a membrana del 22.91% (*Tabla R.12.*, *Tabla R.13.*, *Tabla R.14.*, *Figura R.28.*). La administración de las dosis más bajas (10 mg/Kg y 20 mg/Kg) de estradiol a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 40 mg/Kg de estradiol provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 22.66% en la actividad ArgAP unida a membrana (*Tabla R.12.*, *Figura R.28A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna de la actividad ArgAP unida a membrana a ninguna de las dosis empleadas (*Tabla R.13.*, *Figura R.28B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna de la actividad ArgAP unida a membrana de a ninguna de las dosis empleadas (*Tabla R.14.*, *Figura R.28C.*).

ArgAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	617.8 ± 44.6	96.3 ± 22.1	556.6 ± 40.1	69.6 ± 4.7	213.1 ± 14.7	156.3 ± 12.6
OV-C	606.3 ± 45.2	129.8 ± 11.3	743.5 ± 57.7	78.6 ± 15.0	215.9 ± 12.1	197.7 ± 11.9
E 10 mg/Kg	537.5 ± 33.0	101.8 ± 10.8	419.3 ± 31.3	67.4 ± 6.2	157.4 ± 11.7	172.4 ± 10.6
E 20 mg/Kg	599.5 ± 35.7	96.8 ± 5.2	551.3 ± 62.6	84.7 ± 9.2	148.9 ± 3.9	187.2 ± 8.3
E 40 mg/Kg	581.6 ± 20.8	120.7 ± 11.0	530.1 ± 50.9	76.2 ± 11.1	141.6 ± 6.8	191.8 ± 6.3

Tabla R.12. Valores de actividad específica de arginina aminopeptidasa (ArgAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol (E). Los resultados se expresan como picomoles de arginina-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

ArgAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	632.9 ± 54.8	99.5 ± 11.3	559.3 ± 54.0	72.5 ± 8.4	198.9 ± 9.4	157.7 ± 18.8
OV-C	676.5 ± 35.2	143.7 ± 11.9	816.6 ± 87.7	89.7 ± 6.6	191.3 ± 5.9	192.5 ± 13.5
P 100 mg/Kg	546.5 ± 23.8	106.9 ± 19.0	820.5 ± 65.9	48.4 ± 7.3	198.0 ± 18.3	122.0 ± 20.6
P 200 mg/Kg	720.1 ± 54.2	130.3 ± 13.3	939.7 ± 81.3	105.0 ± 16.7	196.2 ± 19.1	125.5 ± 10.8
P 400 mg/Kg	872.5 ± 42.4	143.5 ± 21.0	962.4 ± 49.5	62.3 ± 9.4	200.2 ± 10.4	123.7 ± 26.9

Tabla R.13. Valores de actividad específica de arginina aminopeptidasa (ArgAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 100 mg/Kg , 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona (P). Los resultados se expresan como picomoles de arginina-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

ArgAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	637.6 ± 49.7	94.7 ± 10.9	544.9 ± 75.3	71.4 ± 20.1	211.3 ± 11.6	157.5 ± 13.1
OV-C	651.9 ± 70.3	134.9 ± 15.1	814.2 ± 29.7	89.4 ± 19.5	222.0 ± 24.9	189.3 ± 12.4
E + P 10 + 100 mg/Kg	576.3 ± 56.7	82.5 ± 11.9	693.0 ± 93.5	82.0 ± 17.9	211.3 ± 10.9	146.5 ± 8.7
E + P 20 + 200 mg/Kg	645.6 ± 41.2	95.6 ± 17.5	862.8 ± 98.8	101.6 ± 28.5	212.0 ± 8.9	149.6 ± 12.1
E + P 40 + 400 mg/Kg	820.1 ± 61.3	93.7 ± 13.3	734.2 ± 60.3	104.5 ± 27.7	195.8 ± 15.0	157.6 ± 9.0

Tabla R.14. Valores de actividad específica de arginina aminopeptidasa (ArgAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona (E + P). Los resultados se expresan como picomoles de arginina-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

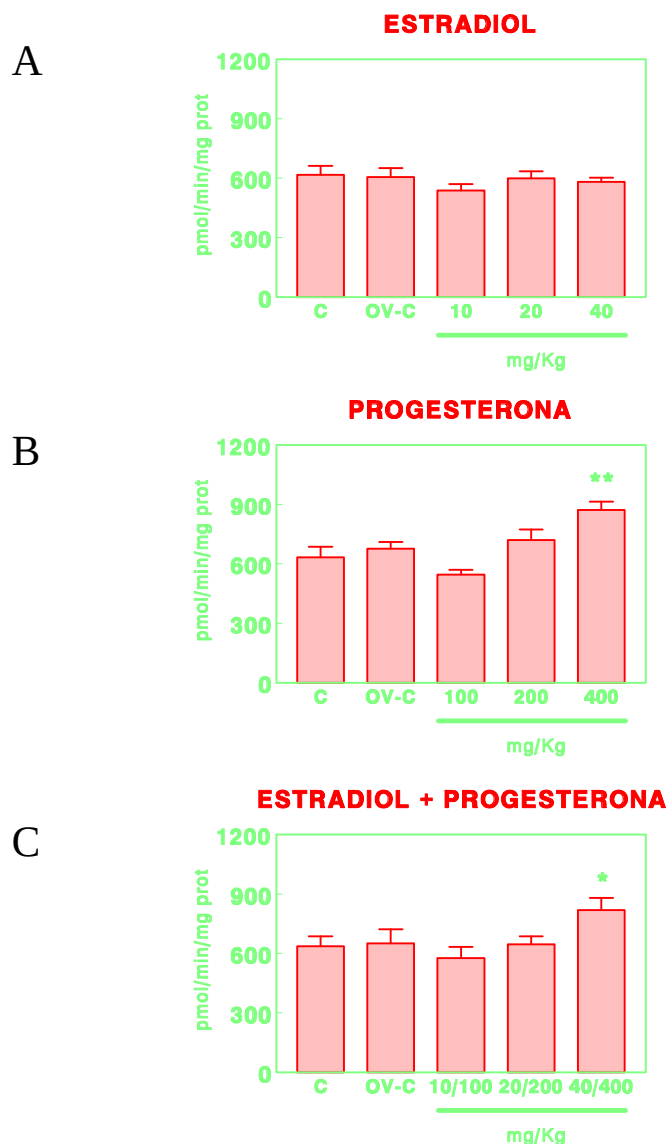
ArgAP Soluble**Hipotálamo**

Figura R.23. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de arginina aminopeptidasa (ArgAP) soluble en el hipotálamo de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

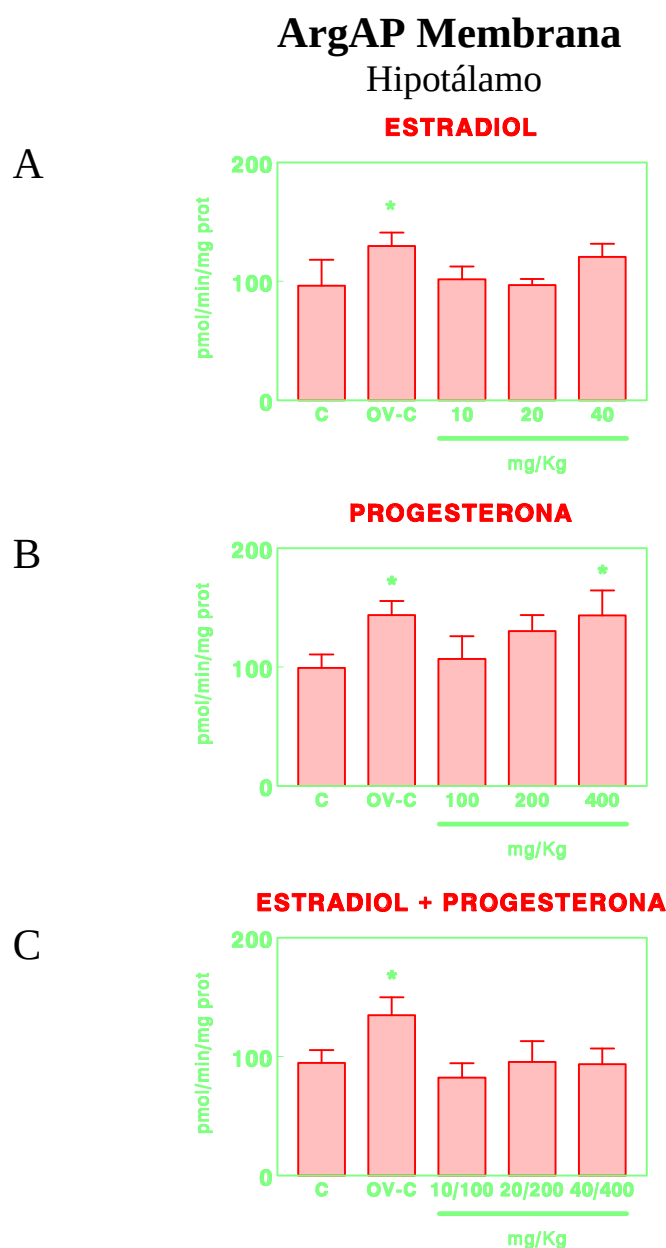


Figura R.24. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de arginina aminopeptidasa (ArgAP) unida a membrana en el hipotálamo de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (*p<0.05).

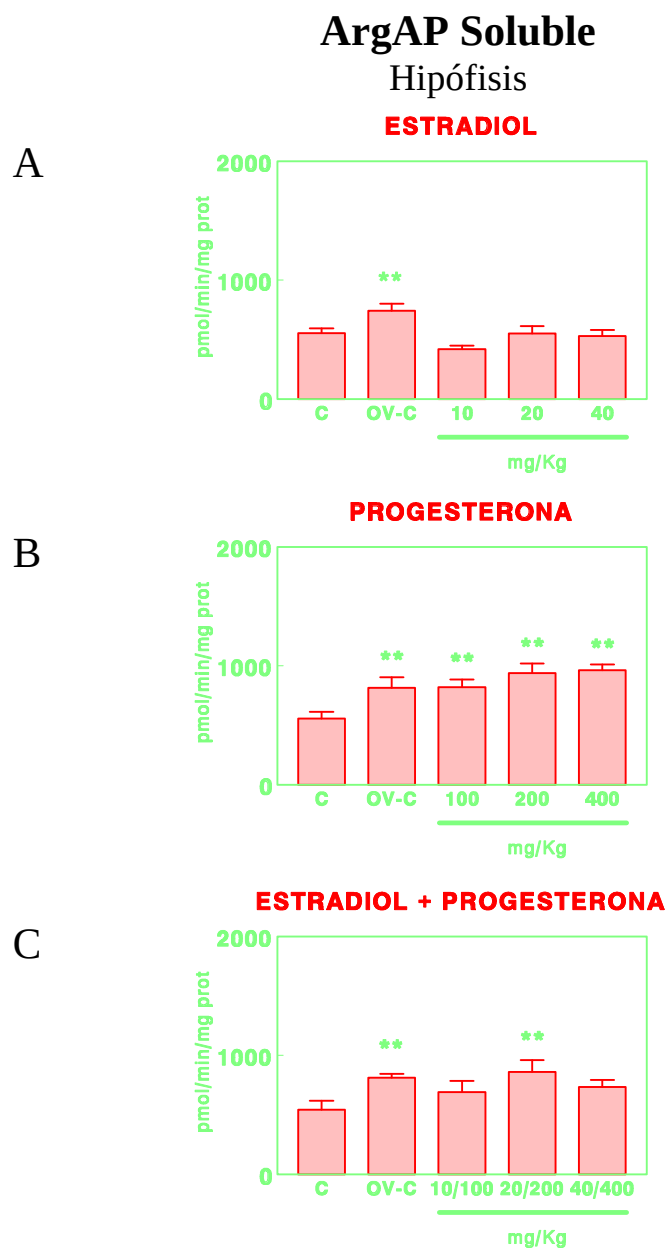


Figura R.25. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de arginina aminopeptidasa (ArgAP) soluble en la hipófisis de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (** p <0.01).

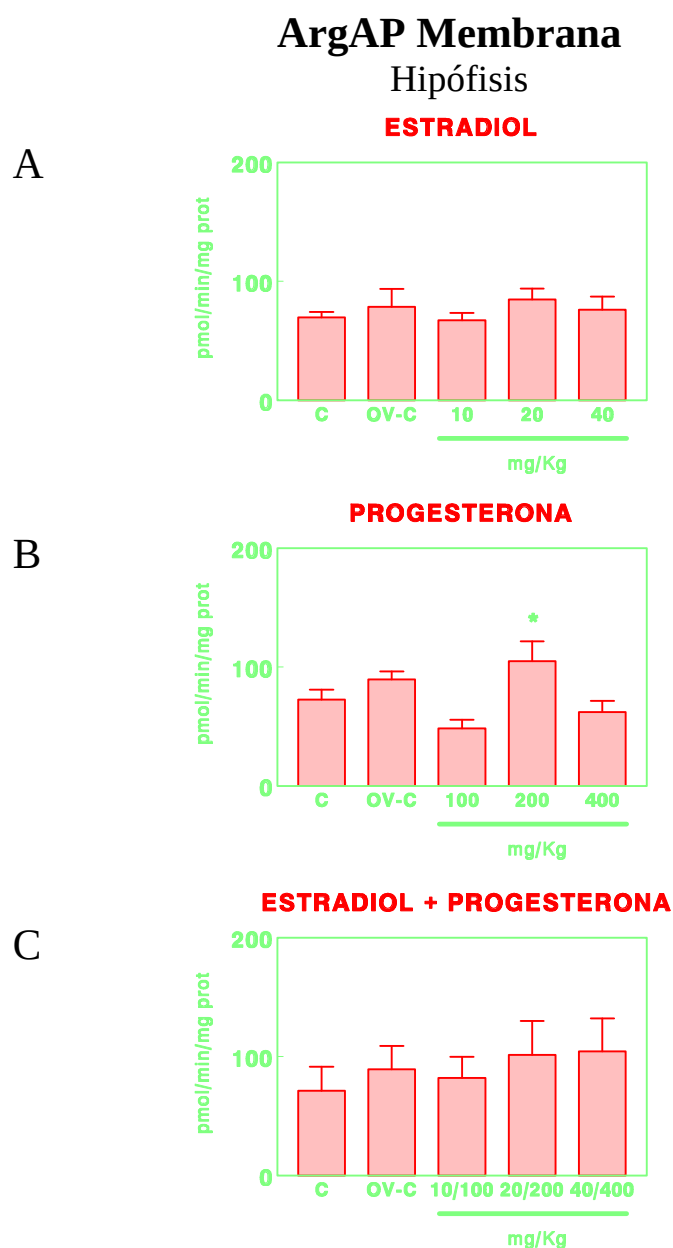


Figura R.26. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de arginina aminopeptidasa (ArgAP) unida a membrana en la hipófisis de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; $n=10$) (* $p<0.05$).

ArgAP Soluble

Glándulas adrenales

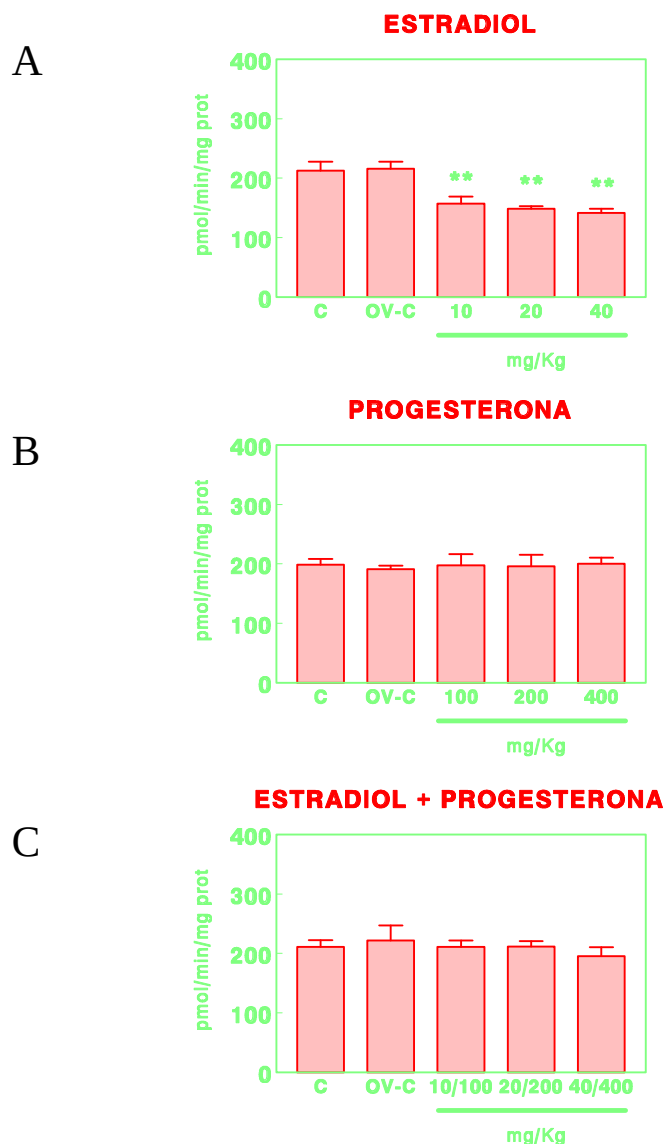
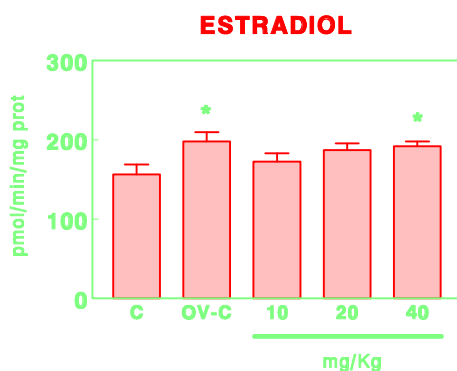


Figura R.27. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de arginina aminopeptidasa (ArgAP) soluble en las glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (** $p < 0.01$).

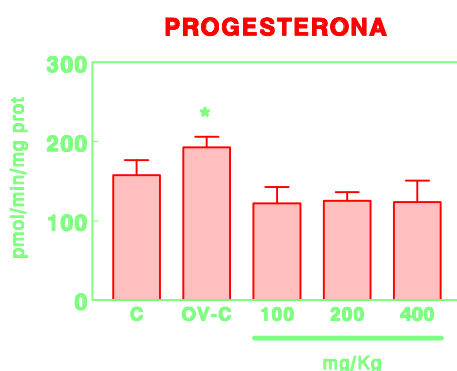
ArgAP Membrana

Glándulas adrenales

A



B



C

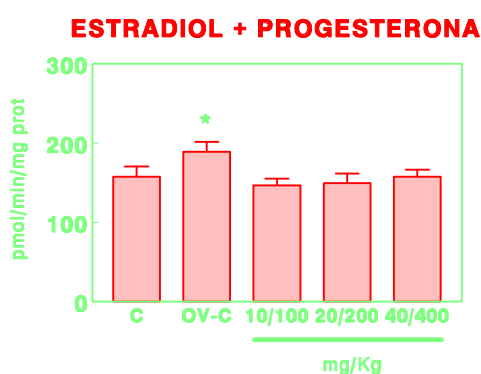


Figura R.28. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de arginina aminopeptidasa (ArgAP) unida a membrana en las glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (*p<0.05).

2.3. Efecto de la ovariectomía y la administración de estradiol y progesterona sobre la actividad específica de cisteína aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de caseína aminopeptidasa (CysAP) soluble en el hipotálamo de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad CysAP soluble (*Tabla R.15., Tabla R.16., Tabla R.17., Figura R.29.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad CysAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.15., Figura R.29A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de CysAP soluble dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p<0.05$) del 24.98%, la administración de 200 mg/Kg no provoca variación significativa alguna sobre la actividad CysAP soluble con respecto al control, mientras que la administración de 400 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 37.39% (*Tabla R.16., Figura R.29B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control cuando se administran las dosis más altas (20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona), mientras que la administración de 10mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 28.42% en la actividad CysAP soluble (*Tabla R.17., Figura R.29C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de CysAP unida a membrana en el hipotálamo de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía provoca un incremento significativo medio ($p<0.05$) de la actividad CysAP unida a membrana del 41.13% (*Tabla R.15., Tabla R.16., Tabla R.17., Figura R.30.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad CysAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.15., Figura R.30A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad CysAP unida a membrana dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p<0.05$) del 41.82%, mientras que la administración de 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.05$ y $p<0.01$) del 36.50% y 53.64% respectivamente (*Tabla R.16., Figura R.30B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control cuando se administran las dosis más altas (20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona), mientras que la

administración de 10mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 46.90% en la actividad CysAP unida a membrana (*Tabla R.17., Figura R.30C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de CysAP soluble en la hipófisis de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad CysAP soluble (*Tabla R.15., Tabla R.16., Tabla R.17., Figura R.31.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad CysAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.15., Figura R.31A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados provoca un incremento en la actividad específica de CysAP soluble. Así, la administración de 200mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 57.94% y la administración de 400 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 77.65%, si bien la administración de 100 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.16., Figura R.31B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad CysAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.17., Figura R.31C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de CysAP unida a membrana en la hipófisis de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad CysAP unida a membrana (*Tabla R.15., Tabla R.16., Tabla R.17., Figura R.32.*). La administración de las dosis más bajas de estradiol (10 mg/Kg y 20 mg/Kg) a animales ovariectomizados tampoco provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 40 mg/Kg de estradiol provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 113.08% en la actividad CysAP unida a membrana (*Tabla R.15., Figura R.32A.*). La administración de las dosis más altas de progesterona (200 mg/Kg y 400 mg/Kg) a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 78.37% en la actividad CysAP unida a membrana (*Tabla R.16., Figura R.32B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad CysAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.17., Figura R.32C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de CysAP soluble en las glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad CysAP soluble (*Tabla R.15., Tabla R.16., Tabla R.17., Figura R.33.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad CysAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.15., Figura R.33A.*). Del mismo modo, la administración de progesterona a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad CysAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.16., Figura R.33B.*). Igualmente, la administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad CysAP soluble ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.17., Figura R.33C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de CysAP unida a membrana en las glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad CysAP unida a membrana (*Tabla R.15., Tabla R.16., Tabla R.17., Figura R.34.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad CysAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.15., Figura R.34A.*). La administración de las dosis más altas de progesterona (200 mg/Kg y 400 mg/Kg) a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) del 37.37% en la actividad CysAP unida a membrana (*Tabla R.16., Figura R.34B.*). Por el contrario, la administración conjunta de estradiol más progesterona a animales ovariectomizados cuando se administran las dosis más bajas (10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona y 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona) no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) del 23.25% en la actividad CysAP unida a membrana (*Tabla R.17., Figura R.34C.*).

CysAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	165.1 ± 3.5	45.0 ± 6.0	425.7 ± 67.0	70.1 ± 24.9	81.2 ± 13.2	73.2 ± 8.3
OV-C	181.8 ± 25.2	70.4 ± 8.9	501.8 ± 57.1	63.5 ± 13.6	88.1 ± 9.7	85.0 ± 8.8
E 10 mg/Kg	131.8 ± 24.0	39.2 ± 4.9	301.8 ± 20.5	27.2 ± 4.6	74.0 ± 8.2	64.0 ± 5.3
E 20 mg/Kg	212.9 ± 22.3	49.0 ± 6.1	395.9 ± 46.7	63.2 ± 6.6	96.0 ± 6.2	92.3 ± 4.9
E 40 mg/Kg	236.9 ± 30.4	60.9 ± 6.6	411.0 ± 52.0	149.4 ± 48.3	101.8 ± 6.3	93.9 ± 4.3

Tabla R.15. Valores de actividad específica de cisteína aminopeptidasa (CysAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol (E). Los resultados se expresan como picomoles de cisteína-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

CysAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	163.1 ± 10.8	47.1 ± 4.8	446.9 ± 45.3	83.3 ± 7.0	77.3 ± 3.1	87.6 ± 11.5
OV-C	162.8 ± 5.2	62.5 ± 4.1	527.1 ± 38.4	87.7 ± 6.6	75.5 ± 5.0	102.2 ± 10.1
P 100 mg/Kg	122.4 ± 6.7	27.4 ± 6.0	518.5 ± 63.9	18.0 ± 2.7	76.8 ± 7.1	54.9 ± 9.7
P 200 mg/Kg	168.7 ± 9.2	64.2 ± 7.0	705.9 ± 24.5	98.1 ± 16.1	77.8 ± 6.8	84.0 ± 10.1
P 400 mg/Kg	224.1 ± 18.6	72.3 ± 6.4	793.9 ± 35.8	63.9 ± 9.9	91.5 ± 6.2	68.6 ± 15.0

Tabla R.16. Valores de actividad específica de cisteína aminopeptidasa (CysAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona (P). Los resultados se expresan como picomoles de cisteína-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

CysAP

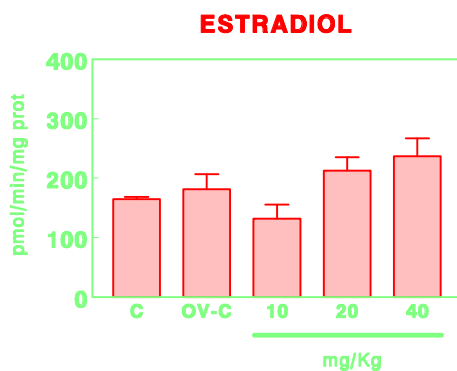
	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	166.6 ± 15.8	46.0 ± 3.9	425.3 ± 54.7	72.1 ± 17.5	85.6 ± 5.4	85.2 ± 5.9
OV-C	163.6 ± 11.9	61.7 ± 9.0	502.7 ± 50.2	86.3 ± 17.7	92.2 ± 9.0	91.6 ± 6.8
E + P 10 + 100 mg/Kg	119.3 ± 4.7	24.4 ± 2.5	350.3 ± 54.2	60.5 ± 12.9	84.8 ± 7.0	72.0 ± 5.4
E + P 20 + 200 mg/Kg	151.2 ± 6.7	41.1 ± 6.0	527.8 ± 57.4	79.7 ± 23.1	90.0 ± 6.2	86.3 ± 7.1
E + P 40 + 400 mg/Kg	173.1 ± 8.7	40.6 ± 4.6	524.3 ± 32.4	105.8 ± 29.8	78.2 ± 9.3	65.4 ± 6.5

Tabla R.17. Valores de actividad específica de cisteína aminopeptidasa (CysAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona (E + P). Los resultados se expresan como picomoles de cisteína-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

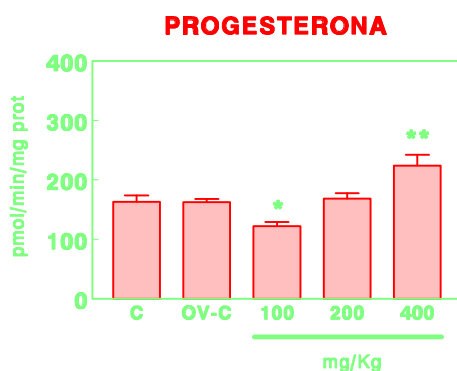
CysAP Soluble

Hipotálamo

A



B



C

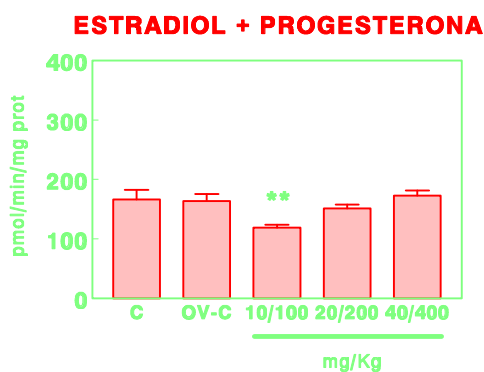


Figura R.29. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de cisteína aminopeptidasa (CysAP) soluble en el hipotálamo de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de cisteína- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

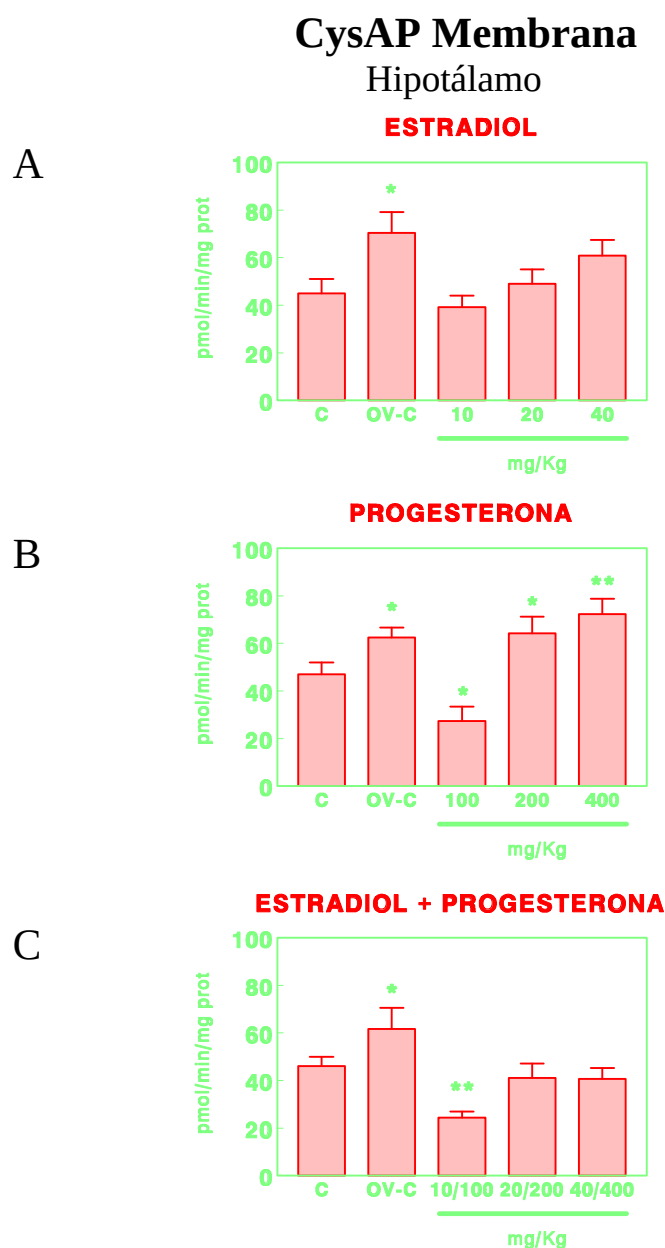


Figura R.30. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de cisteína aminopeptidasa (CysAP) unida a membrana en el hipotálamo de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de cisteína- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

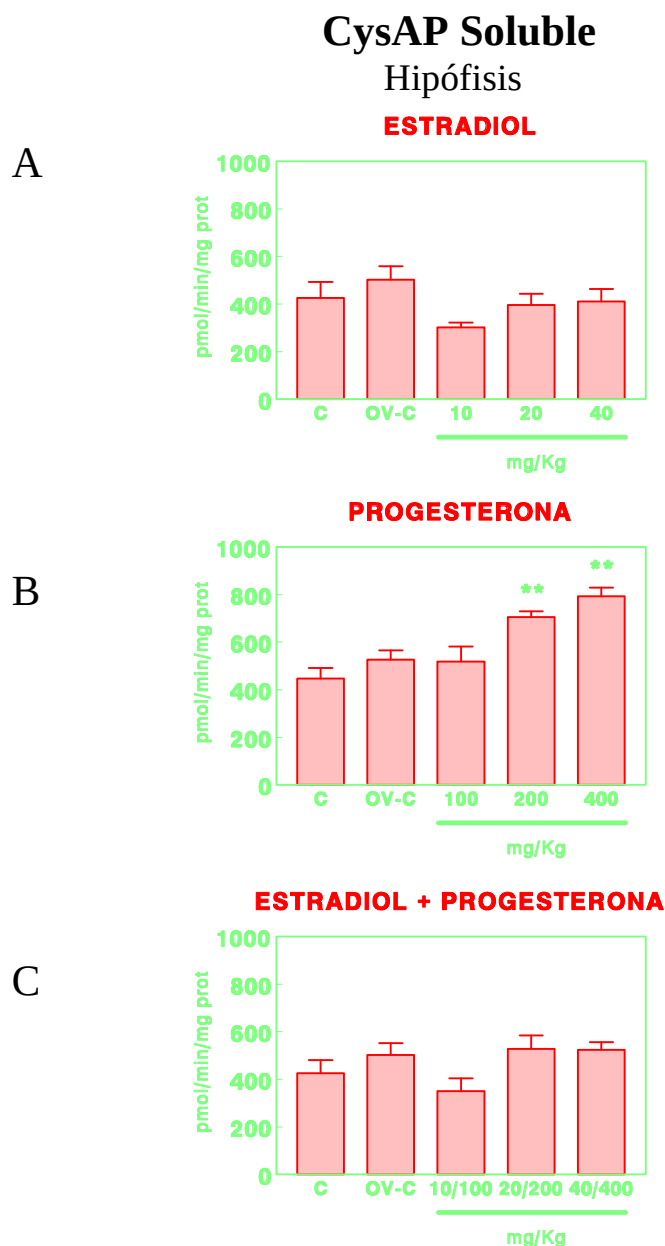


Figura R.31. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de cisteína aminopeptidasa (CysAP) soluble en la hipófisis de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de cisteína- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (**p<0.01).

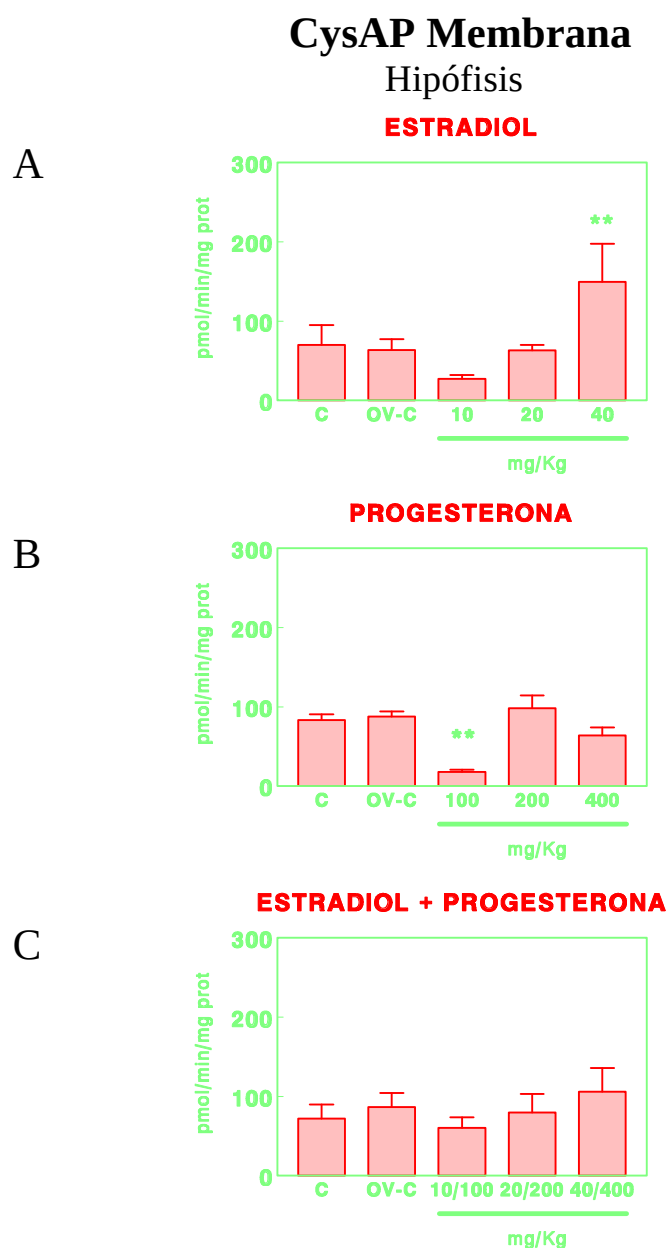


Figura R.32. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de cisteína aminopeptidasa (CysAP) unida a membrana en la hipófisis de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de cisteína- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (** p<0.01).

CysAP Soluble

Glándulas adrenales

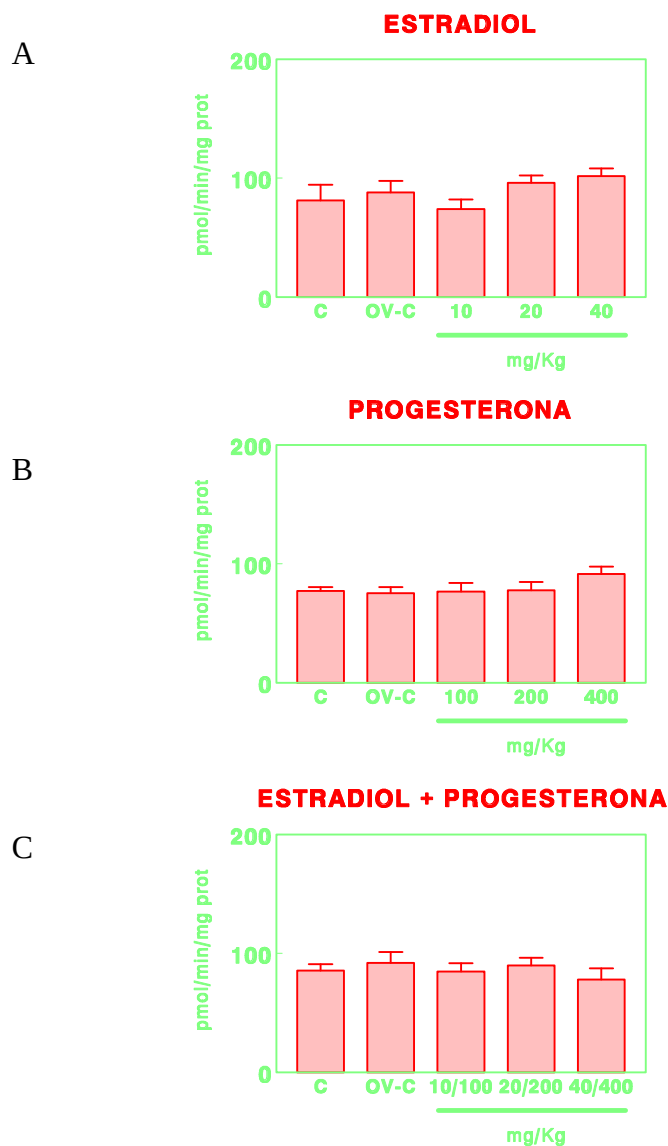
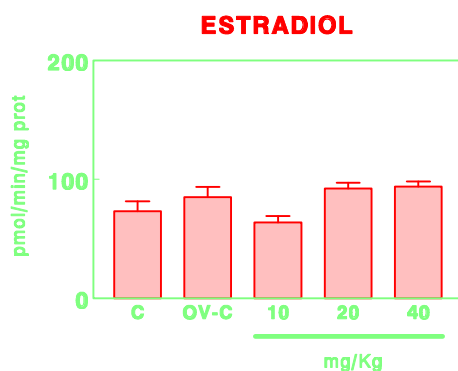


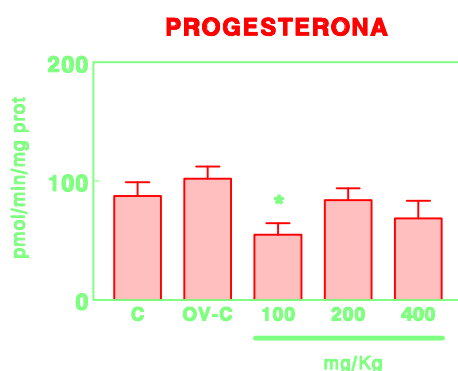
Figura R.33. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de cisteína aminopeptidasa (CysAP) soluble en las glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de cisteína- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10).

CysAP Membrana Glándulas adrenales

A



B



C

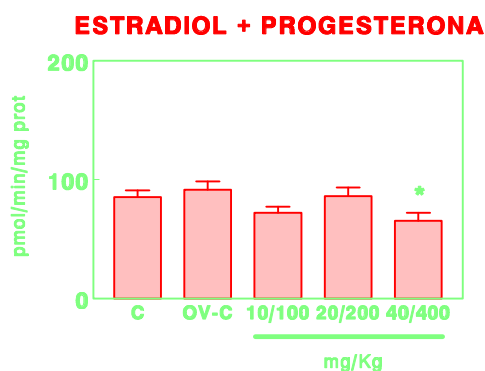


Figura R.34. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de cisteína aminopeptidasa (CysAP) unida a membrana en las glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de cisteína- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (*p<0.05).

2.4. Efecto de la ovariectomía y la administración de estradiol y progesterona sobre la actividad específica de aspartato aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de aspartato aminopeptidasa (AspAP) soluble en el hipotálamo de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad AspAP soluble (*Tabla R.18., Tabla R.19., Tabla R.20., Figura R.35.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad AspAP soluble en el hipotálamo a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.18., Figura R.35A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de AspAP soluble dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 100 mg/Kg provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) del 53.19%, la administración de 200 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 93.74%, y la administración de 400 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) del 71.15% (*Tabla R.19., Figura R.35B.*). La administración conjunta de estradiol más progesterona a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control cuando se administran las dosis más altas (20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol y 400 mg/Kg de progesterona), mientras que la administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p < 0.01$) del 69.72% en la actividad AspAP soluble (*Tabla R.20., Figura R.35C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de AspAP unida a membrana en el hipotálamo de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía provoca un incremento significativo medio ($p < 0.01$) de la actividad AspAP unida a membrana del 53.89% (*Tabla R.18., Tabla R.19., Tabla R.20., Figura R.36.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad AspAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.18., Figura R.36A.*). La administración de las dosis más altas de progesterona (200 mg/Kg y 400 mg/Kg) a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p < 0.01$) del 71.72% en la actividad AspAP unida a membrana (*Tabla R.19., Figura R.36B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad AspAP unida a membrana dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p < 0.01$) del 66.05% y la administración de 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) del

32.18%, si bien la administración de 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.20., Figura R.36C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de aspartato aminopeptidasa (AspAP) soluble en la hipófisis de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad AspAP soluble (*Tabla R.18., Tabla R.19., Tabla R.20., Figura R.37.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad AspAP soluble en la hipófisis a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.18., Figura R.37A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad AspAP soluble dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 100 mg/Kg provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 73.22%, la administración de 200 mg/Kg no provoca variación significativa alguna sobre la actividad AspAP soluble, y la administración de 400 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 52.77% (*Tabla R.19., Figura R.37B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control cuando se administran las dosis más altas (20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona), mientras que la administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p<0.05$) del 44.05% en la actividad AspAP soluble (*Tabla R.20., Figura R.37C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de AspAP unida a membrana en la hipófisis de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca cambio significativo alguno de la actividad AspAP unida a membrana (*Tabla R.18., Tabla R.19., Tabla R.20., Figura R.38.*). La administración de las dosis más altas de estradiol (20 mg/Kg y 40 mg/Kg) a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 10 mg/Kg provoca un descenso significativo ($p<0.05$) del 72.08% en la actividad AspAP unida a membrana (*Tabla R.18., Figura R.38A.*). Del mismo modo, la administración de las dosis más altas de progesterona (200 mg/Kg y 400 mg/Kg) a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 80.34% en la actividad AspAP unida a membrana (*Tabla R.19., Figura R.38B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad AspAP unida a membrana con ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.20., Figura R.38C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de AspAP soluble en las glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad AspAP soluble (*Tabla R.18.*, *Tabla R.19.*, *Tabla R.20.*, *Figura R.39.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados provoca un cambio en la actividad específica de AspAP soluble. Así, la administración de 20 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 24.72%, la administración de 40 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 51.98%, si bien la administración de 10 mg/Kg no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.18.*, *Figura R.39A.*). La administración de las dosis más bajas de progesterona (100 mg/Kg y 200 mg/Kg) a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 400 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 35.21% en la actividad AspAP soluble (*Tabla R.19.*, *Figura R.39B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de AspAP soluble, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 30.09%, la administración de 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 38.19%, si bien la administración de 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.20.*, *Figura R.39C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de AspAP unida a membrana en las glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad AspAP unida a membrana (*Tabla R.18.*, *Tabla R.19.*, *Tabla R.20.*, *Figura R.40.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad AspAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.18.*, *Figura R.40A.*). Del mismo modo, la administración de progesterona a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad AspAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.19.*, *Figura R.40B.*). La administración conjunta de las dosis más altas de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados (20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona) no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 41.76% en la actividad AspAP unida a membrana (*Tabla R.20.*, *Figura R.40C.*).

AspAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	46.8 ± 9.4	32.5 ± 1.6	235.1 ± 51.9	63.8 ± 9.7	17.0 ± 2.8	52.2 ± 5.6
OV-C	54.8 ± 8.8	60.0 ± 7.9	296.9 ± 33.2	56.9 ± 14.2	20.1 ± 2.4	54.9 ± 4.6
E 10 mg/Kg	29.6 ± 6.3	51.2 ± 17.5	173.8 ± 21.3	17.8 ± 8.3	16.7 ± 2.5	38.5 ± 6.6
E 20 mg/Kg	45.5 ± 4.0	60.7 ± 17.0	332.8 ± 41.4	52.1 ± 9.7	21.2 ± 1.3	62.3 ± 5.4
E 40 mg/Kg	52.1 ± 5.3	59.9 ± 6.7	342.1 ± 34.9	66.2 ± 20.8	25.8 ± 2.4	63.4 ± 4.4

Tabla R.18. Valores de actividad específica de aspartato aminopeptidasa (AspAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol (E). Los resultados se expresan como picomoles de aspartato-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

AspAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	51.4 ± 13.6	34.7 ± 4.4	238.0 ± 26.8	65.4 ± 3.6	19.9 ± 1.1	49.4 ± 6.4
OV-C	53.3 ± 3.8	46.5 ± 1.4	255.2 ± 12.6	75.5 ± 4.9	18.8 ± 2.1	56.2 ± 6.0
P 100 mg/Kg	24.1 ± 3.5	9.8 ± 1.2	63.7 ± 15.4	12.6 ± 2.8	22.1 ± 3.4	37.1 ± 5.0
P 200 mg/Kg	99.6 ± 6.5	33.0 ± 2.7	242.3 ± 21.1	69.2 ± 15.2	25.5 ± 3.0	52.4 ± 5.6
P 400 mg/Kg	88.0 ± 14.0	28.3 ± 3.1	363.6 ± 76.7	50.2 ± 9.1	26.9 ± 2.8	48.2 ± 8.9

Tabla R.19. Valores de actividad específica de aspartato aminopeptidasa (AspAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona (P). Los resultados se expresan como picomoles de aspartato-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

AspAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	50.0 ± 8.6	33.9 ± 3.2	238.5 ± 28.0	45.9 ± 6.6	24.1 ± 2.9	49.4 ± 4.5
OV-C	54.9 ± 7.6	48.4 ± 5.4	242.7 ± 51.1	73.3 ± 12.9	21.8 ± 3.9	45.9 ± 3.7
E + P 10 + 100 mg/Kg	15.1 ± 2.4	11.5 ± 2.5	133.4 ± 32.7	55.9 ± 11.2	31.3 ± 5.5	28.8 ± 3.4
E + P 20 + 200 mg/Kg	39.7 ± 5.2	31.3 ± 3.2	246.3 ± 50.8	72.3 ± 22.4	33.3 ± 3.7	38.7 ± 4.6
E + P 40 + 400 mg/Kg	56.1 ± 8.7	23.0 ± 4.4	246.7 ± 26.3	55.0 ± 19.0	16.4 ± 3.0	40.4 ± 4.8

Tabla R.20. Valores de actividad específica de aspartato aminopeptidasa (AspAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona (E + P). Los resultados se expresan como picomoles de aspartato-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

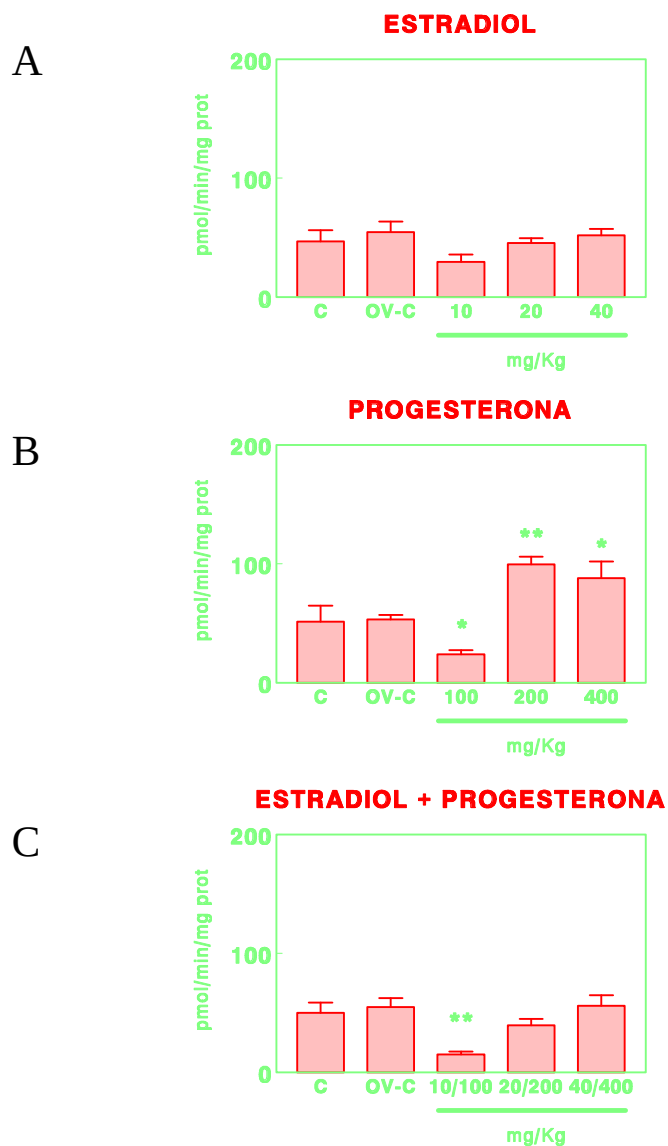
AspAP Soluble**Hipotálamo**

Figura R.35. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de aspartato aminopeptidasa (AspAP) soluble en el hipotálamo de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de aspartato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

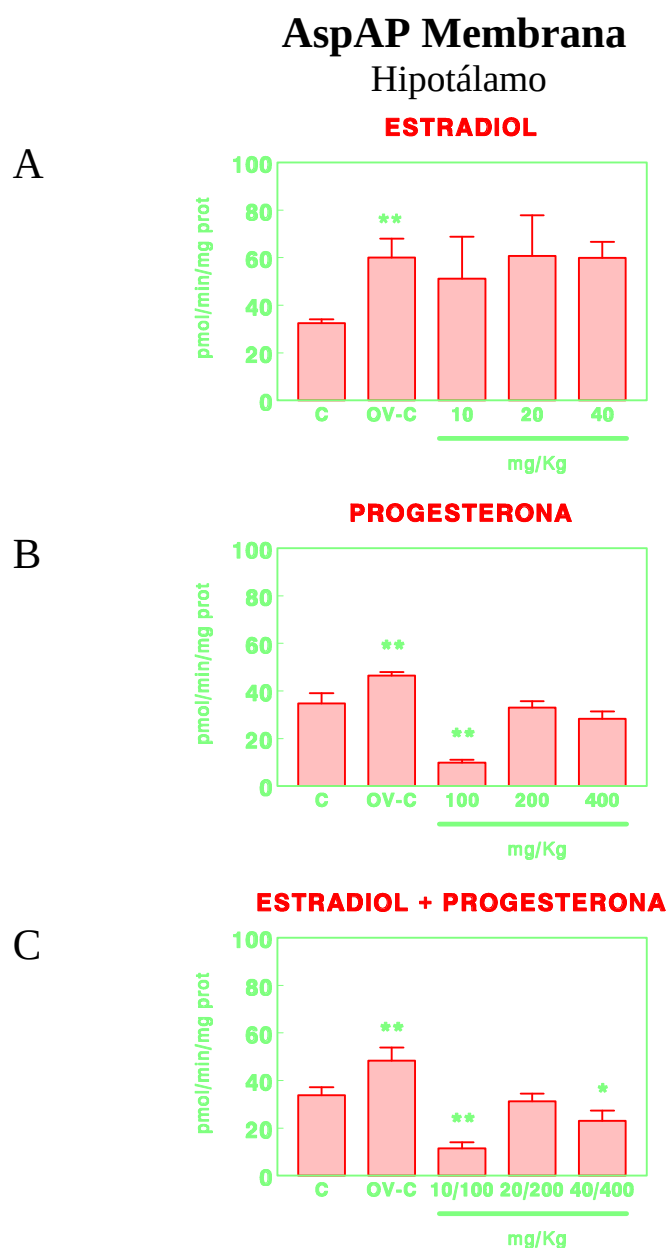


Figura R.36. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de aspartato aminopeptidasa (AspAP) unida a membrana en el hipotálamo de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de aspartato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

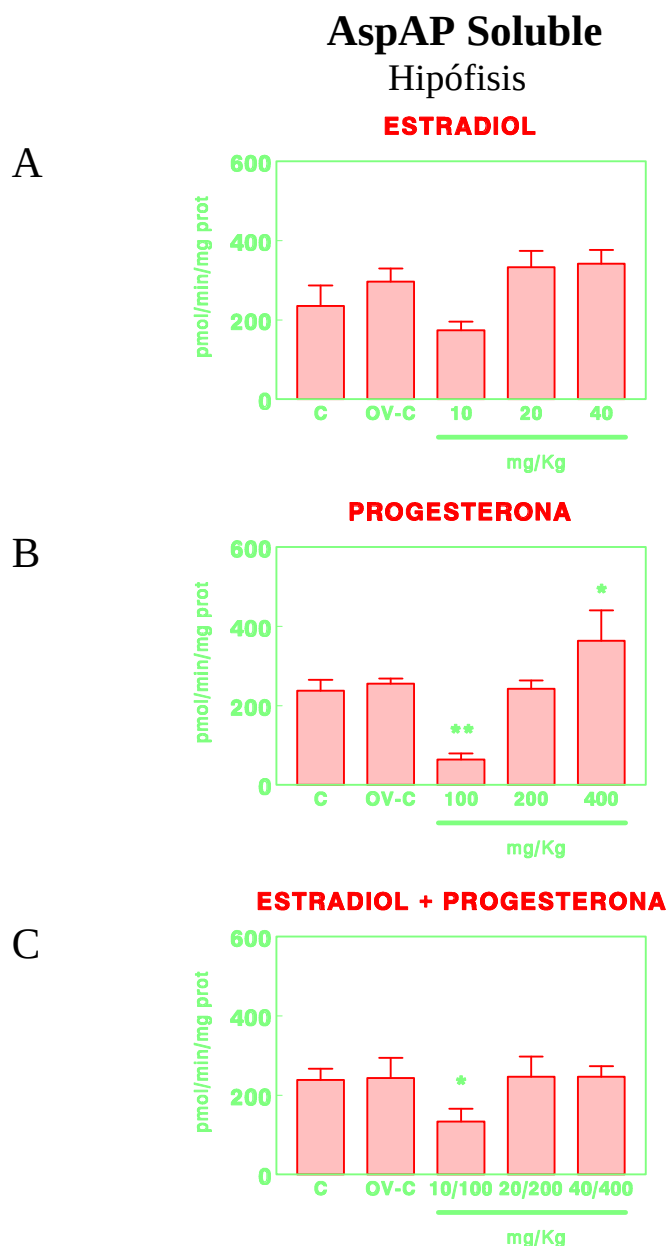


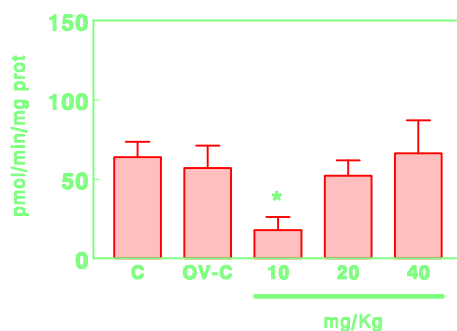
Figura R.37. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de aspartato aminopeptidasa (AspAP) soluble en la hipófisis de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de aspartato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

AspAP Membrana

Hipófisis

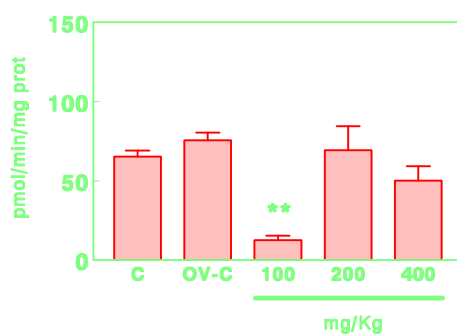
A

ESTRADIOL



B

PROGESTERONA



C

ESTRADIOL + PROGESTERONA

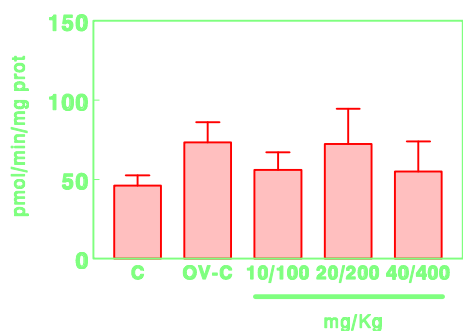


Figura R.38. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de aspartato aminopeptidasa (AspAP) unida a membrana en la hipófisis de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de aspartato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=8) (* p <0.05; ** p <0.01).

AspAP Soluble

Glándulas adrenales

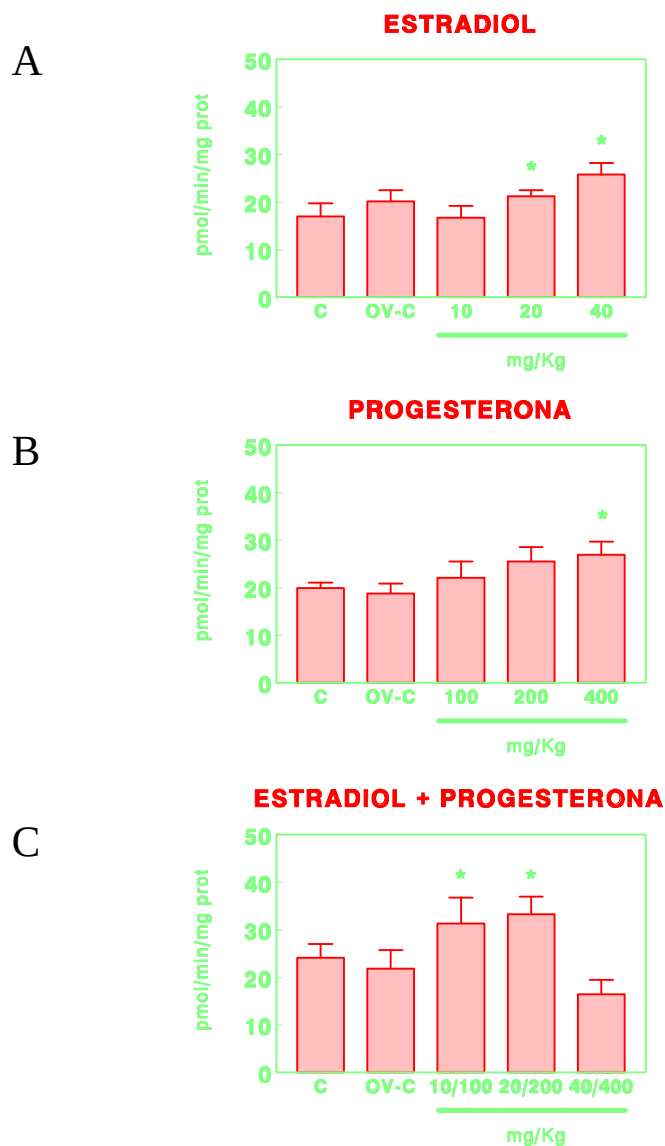
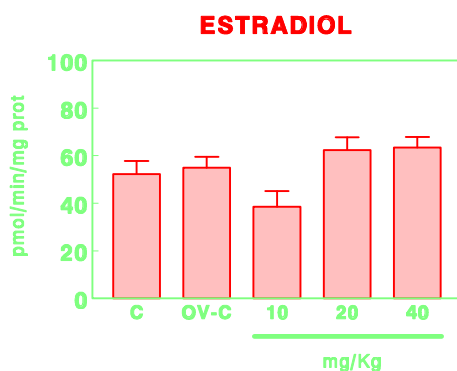


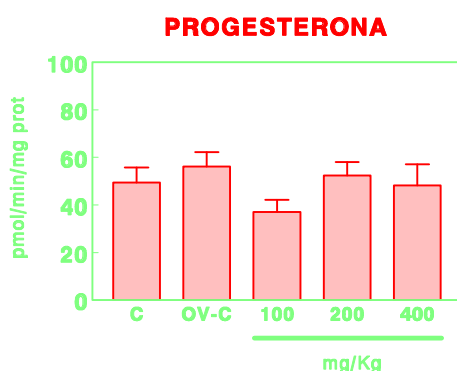
Figura R.39. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de aspartato aminopeptidasa (AspAP) soluble en las glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de aspartato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; $n=10$) (* $p<0.05$).

AspAP Membrana Glándulas adrenales

A



B



C

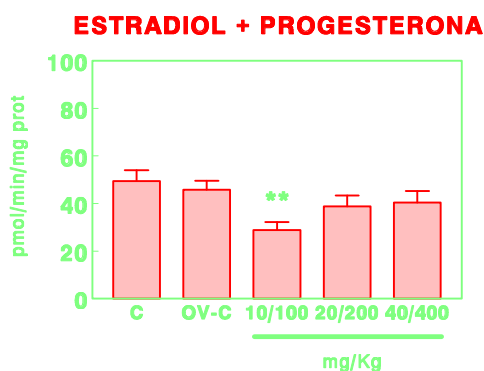


Figura R.40. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de aspartato aminopeptidasa (AspAP) unida a membrana en las glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de aspartato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; $n=10$) (** $p<0.01$).

2.5. Efecto de la ovariectomía y la administración de estradiol y progesterona sobre la actividad específica de glutamato aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de glutamato aminopeptidasa (GluAP) soluble en el hipotálamo de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía provoca un incremento significativo medio ($p < 0.01$) de la actividad GluAP soluble del 122.91% (*Tabla R.21.*, *Tabla R.22.*, *Tabla R.23.*, *Figura R.40.*). Sin embargo, la administración de estradiol a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad GluAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.21.*, *Figura R.40A.*). Por el contrario, la administración de progesterona a animales ovariectomizados sí provoca un cambio en la actividad específica de GluAP soluble. Así, la administración de 200mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 179.82%, la administración de 400 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 132.79%, si bien la administración de 100 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.22.*, *Figura R.40B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados también provoca un cambio en la actividad específica de GluAP soluble. Así, la administración de 20 mg/Kg de estradiol más 200mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 78.38%, la administración de 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 124.5%, si bien la administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.23.*, *Figura R.40C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de (GluAP) unida a membrana en el hipotálamo de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía provoca un incremento significativo medio ($p < 0.01$) de la actividad GluAP unida a membrana del 88.55% (*Tabla R.21.*, *Tabla R.22.*, *Tabla R.23.*, *Figura R.41.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad GluAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.21.*, *Figura R.41A.*). La administración de las dosis más altas de progesterona (200 mg/Kg y 400 mg/Kg) a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p < 0.01$) del 63.05% en la actividad GluAP unida a membrana (*Tabla R.22.*, *Figura R.41B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados provoca un cambio en la actividad específica de GluAP unida a membrana. Así, la administración de 20 mg/Kg de estradiol más 200mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 77.33%, la administración de 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) del 59.44%, si bien la

administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.23., Figura R.41C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de GluAP soluble en la hipófisis de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad GluAP soluble (*Tabla R.21., Tabla R.22., Tabla R.23., Figura R.42.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad GluAP soluble en la hipófisis a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.21., Figura R.42A.*). La administración de las dosis más altas de progesterona (200 mg/Kg y 400 mg/Kg) a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 71.43% en la actividad GluAP soluble (*Tabla R.22., Figura R.42B.*). Del mismo modo, la administración conjunta de las dosis más altas de estradiol y progesterona (20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona) a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p<0.05$) del 47.93% en la actividad GluAP soluble (*Tabla R.23., Figura R.42C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de GluAP unida a membrana en la hipófisis de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad GluAP unida a membrana (*Tabla R.21., Tabla R.22., Tabla R.23., Figura R.43.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad GluAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.21., Figura R.43A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad GluAP unida a membrana dependiendo de la dosis utilizada. Así, la administración de 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 70.46%, la administración de 400 mg/Kg provoca un descenso significativo ($p<0.05$) del 28.88%, mientras que la administración de 200 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.22., Figura R.43B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad GluAP unida a membrana en la hipófisis a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.23., Figura R.43C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de GluAP soluble en las glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad GluAP soluble (*Tabla R.21.*, *Tabla R.22.*, *Tabla R.23.*, *Figura R.44.*). La administración de las dosis más bajas de estradiol (10 mg/Kg y 20 mg/Kg) a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 40 mg/Kg de estradiol provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) del 47.32% en la actividad GluAP soluble (*Tabla R.21.*, *Figura R.44A.*). La administración de las dosis más bajas de progesterona (100 mg/Kg y 200 mg/Kg) a animales ovariectomizados tampoco provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 400 mg/Kg de progesterona también provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) del 35.91% en la actividad GluAP soluble (*Tabla R.22.*, *Figura R.44B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad GluAP soluble con ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.23.*, *Figura R.44C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de GluAP unida a membrana en las glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía provoca un incremento significativo medio ($p < 0.05$) de la actividad GluAP unida a membrana del 44.32% (*Tabla R.21.*, *Tabla R.22.*, *Tabla R.23.*, *Figura R.45.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad GluAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.21.*, *Figura R.45A.*). La administración de las dosis más altas de progesterona (200 mg/Kg y 400 mg/Kg) a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) del 43.53% en la actividad GluAP unida a membrana (*Tabla R.22.*, *Figura R.45B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad GluAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.23.*, *Figura R.45C.*).

GluAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	24.2 ± 2.7	38.2 ± 5.9	215.0 ± 31.2	68.4 ± 3.2	30.1 ± 4.8	49.7 ± 3.5
OV-C	51.3 ± 9.8	58.3 ± 8.3	216.5 ± 36.9	73.1 ± 16.0	34.6 ± 2.8	79.0 ± 8.3
E 10 mg/Kg	23.5 ± 4.5	24.9 ± 4.4	169.8 ± 28.4	43.7 ± 6.7	30.4 ± 4.4	55.7 ± 7.1
E 20 mg/Kg	31.2 ± 2.9	36.1 ± 3.9	263.8 ± 50.4	54.3 ± 8.2	34.4 ± 3.9	74.6 ± 6.9
E 40 mg/Kg	42.2 ± 3.2	40.1 ± 4.9	294.1 ± 31.7	60.2 ± 12.1	44.4 ± 3.1	74.5 ± 6.0

Tabla R.21. Valores de actividad específica de glutamato aminopeptidasa (GluAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol (E). Los resultados se expresan como picomoles de glutamato-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

GluAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	24.6 ± 4.3	34.2 ± 3.4	200.7 ± 25.8	72.9 ± 4.9	23.7 ± 1.3	50.4 ± 5.8
OV-C	55.9 ± 6.6	51.6 ± 2.4	235.2 ± 10.2	78.1 ± 4.4	26.0 ± 2.6	75.2 ± 13.4
P 100 mg/Kg	24.9 ± 7.6	12.6 ± 1.8	57.3 ± 10.1	21.5 ± 2.8	28.8 ± 3.2	28.5 ± 4.2
P 200 mg/Kg	69.0 ± 6.7	33.7 ± 2.1	208.2 ± 27.4	75.6 ± 9.4	27.7 ± 2.4	51.2 ± 4.2
P 400 mg/Kg	57.4 ± 14.5	29.7 ± 2.1	221.6 ± 42.7	51.8 ± 7.1	32.2 ± 2.0	51.2 ± 8.6

Tabla R.22. Valores de actividad específica de glutamato aminopeptidasa (GluAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona (P). Los resultados se expresan como picomoles de glutamato-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

GluAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	24.1 ± 2.6	19.7 ± 1.6	213.6 ± 24.5	66.8 ± 14.3	27.6 ± 4.9	62.0 ± 3.6
OV-C	55.4 ± 7.7	51.6 ± 6.4	231.8 ± 44.7	75.3 ± 15.2	33.3 ± 4.1	77.6 ± 2.1
E + P 10 + 100 mg/Kg	15.5 ± 2.4	13.2 ± 2.2	111.2 ± 28.2	62.3 ± 11.9	28.2 ± 5.3	60.3 ± 9.0
E + P 20 + 200 mg/Kg	43.0 ± 5.9	34.9 ± 3.3	216.6 ± 41.4	72.3 ± 19.8	31.0 ± 5.9	62.7 ± 7.8
E + P 40 + 400 mg/Kg	54.1 ± 7.6	31.3 ± 4.0	230.6 ± 18.8	85.4 ± 24.5	21.2 ± 5.3	63.1 ± 8.1

Tabla R.23. Valores de actividad específica de glutamato aminopeptidasa (GluAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona (E + P). Los resultados se expresan como picomoles de glutamato-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

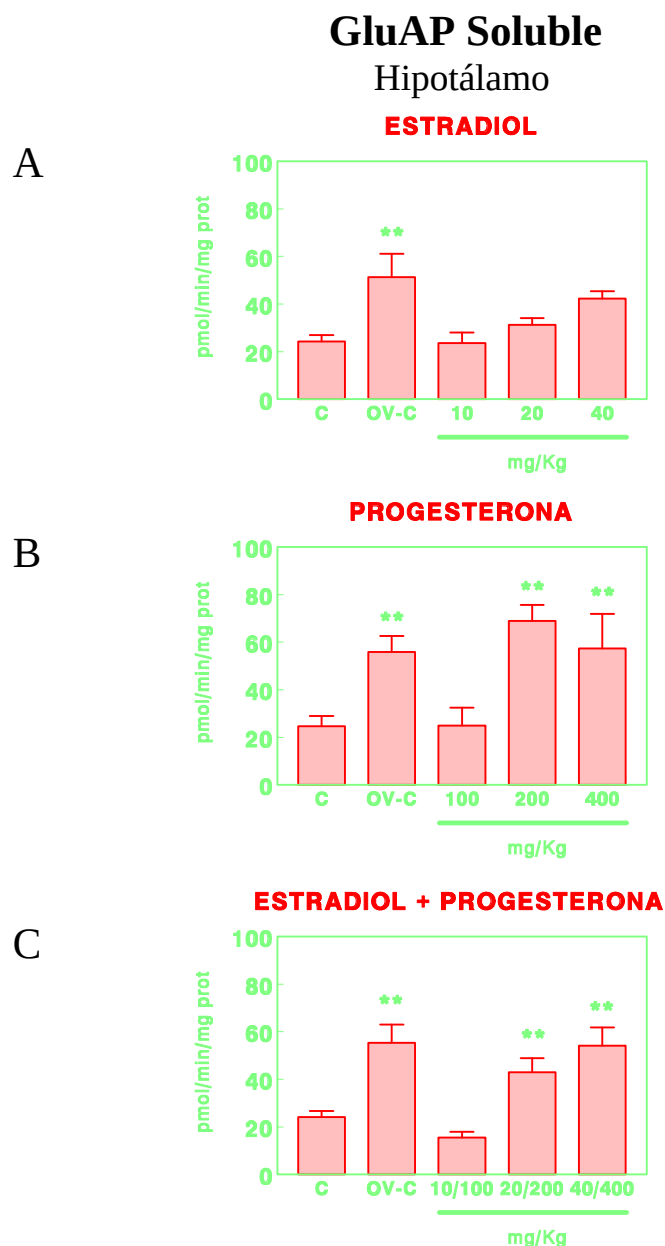


Figura R.41. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de glutamato aminopeptidasa (GluAP) soluble en el hipotálamo de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (** $p < 0.01$).

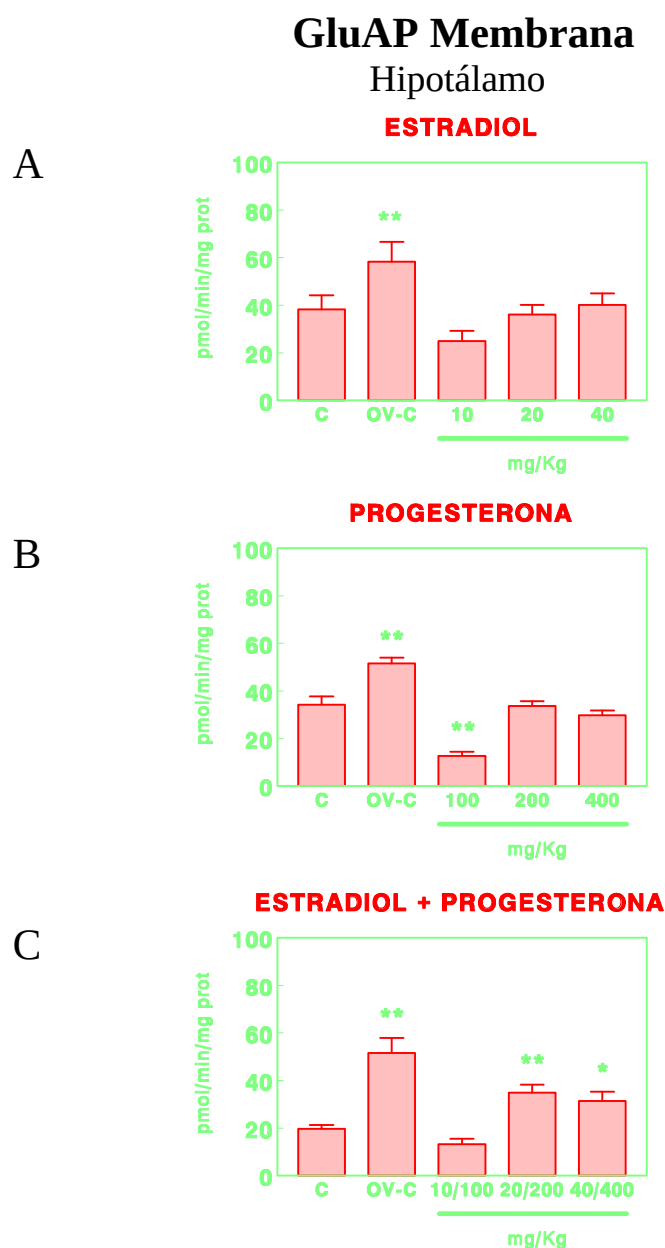


Figura R.42. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de glutamato aminopeptidasa (GluAP) unida a membrana en el hipotálamo de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

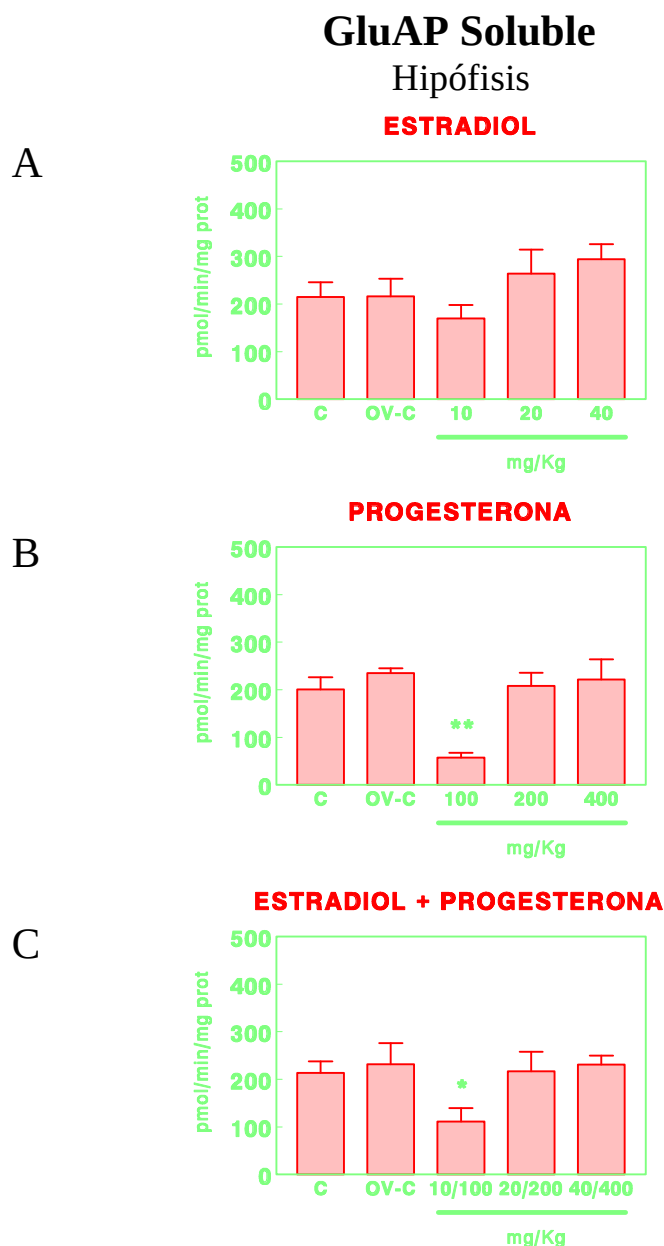


Figura R.43. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de glutamato aminopeptidasa (GluAP) soluble en la hipófisis de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

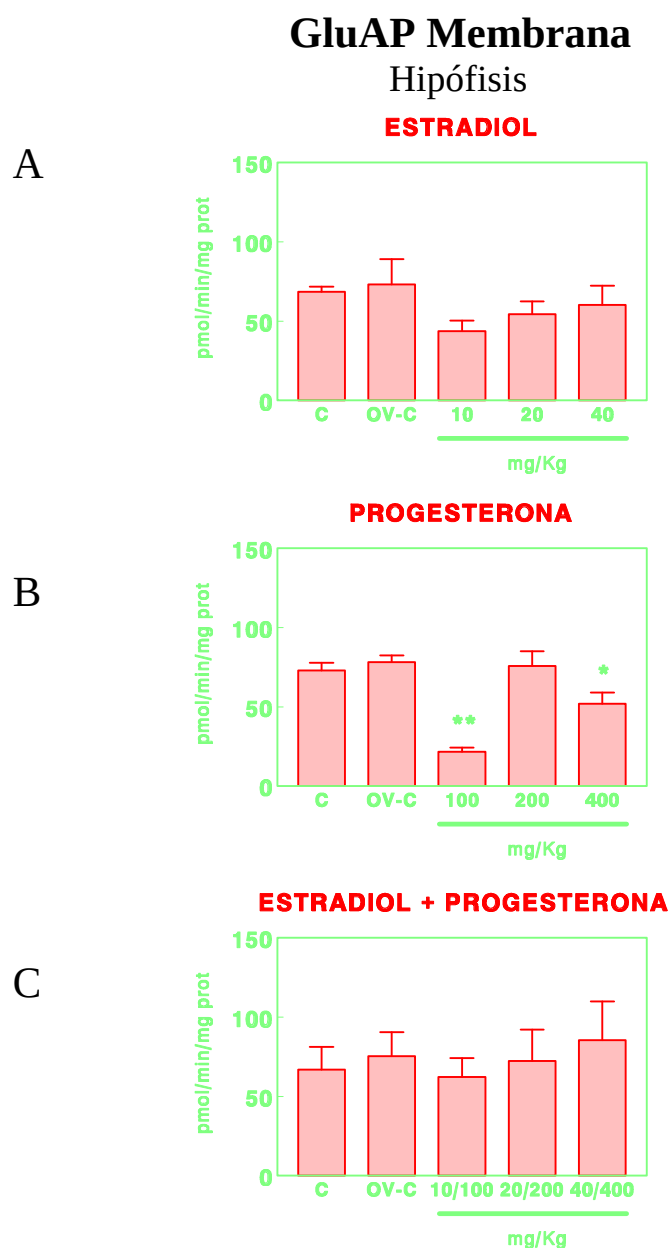


Figura R.44. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de glutamato aminopeptidasa (GluAP) unida a membrana en la hipófisis de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=8) (* p <0.05; ** p <0.01).

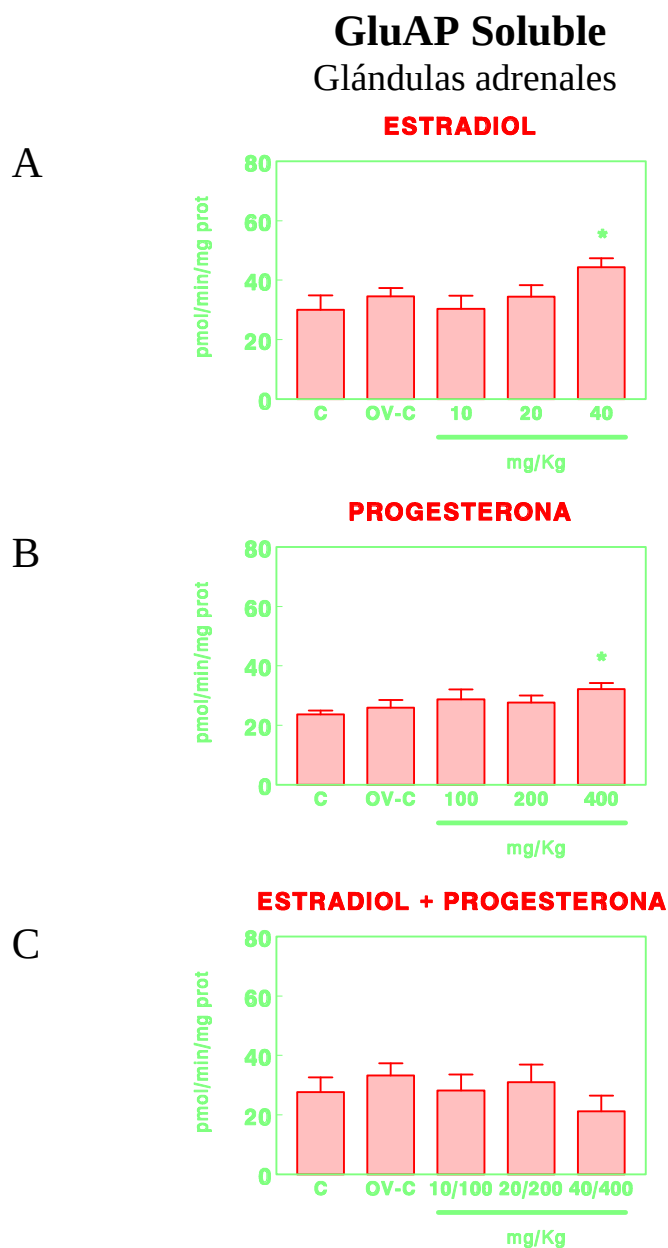
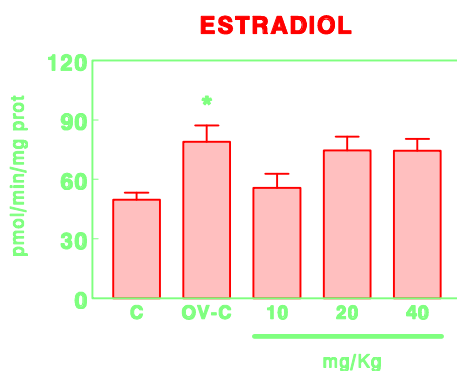


Figura R.45. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de glutamato aminopeptidasa (GluAP) soluble en las glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (*p<0.05).

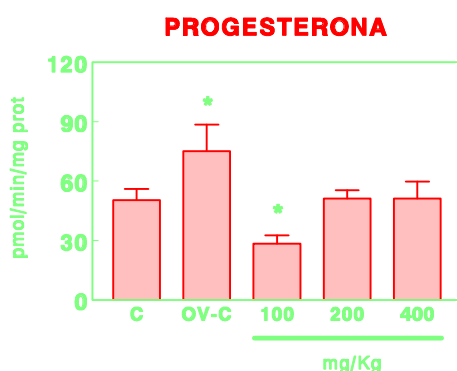
GluAP Membrana

Glándulas adrenales

A



B



C

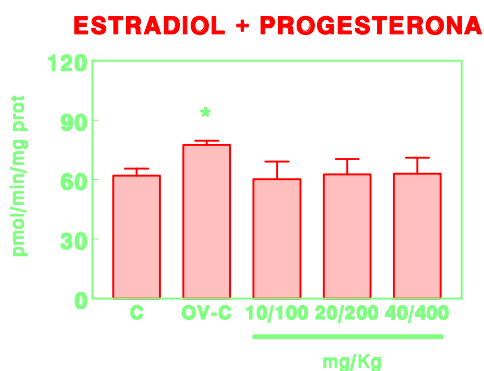


Figura R.46. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de glutamato aminopeptidasa (GluAP) unida a membrana en las glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (*p<0.05).

2.6. Efecto de la ovariectomía y la administración de estradiol y progesterona sobre la actividad específica de piroglutamato aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP) soluble en el hipotálamo de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía provoca un incremento significativo medio ($p<0.05$) de la actividad pGluAP soluble del 99.22% (*Tabla R.24., Tabla R.25., Tabla R.26., Figura R.46.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados provoca un cambio en la actividad específica de pGluAP soluble. Así, la administración de 20 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 109.77%, la administración de 40 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 216.88%, mientras que la administración de 10 mg/Kg no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.24., Figura R.46A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados también provoca un cambio en la actividad específica de pGluAP soluble. Así, la administración de 200mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 135.14%, la administración de 400 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 215.20%, si bien la administración de 100 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.25., Figura R.46B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados provoca del mismo modo, un cambio en la actividad específica de pGluAP soluble. Así, la administración de 20 mg/Kg de estradiol más 200mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 170.72%, la administración de 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 229.73%, si bien la administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.26., Figura R.46C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de pGluAP unida a membrana en el hipotálamo de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía provoca un incremento significativo medio ($p<0.01$) de la actividad pGluAP unida a membrana del 146.86% (*Tabla R.24., Tabla R.25., Tabla R.26., Figura R.47.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad pGluAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.24., Figura R.47A.*). Sin embargo, la administración de progesterona a animales ovariectomizados sí provoca un cambio en la actividad pGluAP unida a membrana. Así, la administración de 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 57.84%, mientras que la administración de 200 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 64.03% y la administración de 400 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 38.86% (*Tabla R.25., Figura R.47B.*). La administración conjunta de estradiol y

progesterona a animales ovariectomizados provoca un cambio en la actividad específica de pGluAP soluble. Así, la administración de 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 66.64%, la administración de 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 100.30%, si bien la administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.26., Figura R.47C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de pGluAP soluble en la hipófisis de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía provoca un incremento significativo medio ($p<0.01$) de la actividad pGluAP soluble del 101.83% (*Tabla R.24., Tabla R.25., Tabla R.26., Figura R.48.*). La administración de 10 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 20 mg/Kg de estradiol provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 100.64% en la actividad pGluAP soluble (*Tabla R.24., Figura R.48A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados provoca un cambio en la actividad específica de pGluAP soluble. Así, la administración de 200mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 101.78%, la administración de 400 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 195.60%, si bien la administración de 100 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.25., Figura R.48B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad pGluAP soluble en la hipófisis a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.26., Figura R.48C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de pGluAP unida a membrana en la hipófisis de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía provoca un incremento significativo medio ($p<0.05$) de la actividad pGluAP unida a membrana del 88.04% (*Tabla R.24., Tabla R.25., Tabla R.26., Figura R.49.*). La administración de 10 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 20 mg/Kg de estradiol provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 103.82% en la actividad pGluAP unida a membrana (*Tabla R.24., Figura R.49A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de pGluAP unida a membrana, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p<0.05$) del 62.57%, la administración de 200 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 111.74%, mientras que la administración de 400 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.25., Figura R.49B.*). La administración conjunta

de las dosis más bajas de estradiol más progesterona (10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona y 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona) a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) del 134.08% en la actividad pGluAP unida a membrana (*Tabla R.26., Figura R.49C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de pGluAP soluble en las glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad pGluAP soluble (*Tabla R.24., Tabla R.25., Tabla R.26., Figura R.50.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados provoca un cambio en la actividad específica de pGluAP soluble. Así, la administración de 20mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) del 58.62%, la administración de 40 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) del 58.73%, si bien la administración de 10 mg/Kg de estradiol no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.24., Figura R.50A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados provoca un cambio en la actividad específica de pGluAP soluble. Así, la administración de 200mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 42.73%, la administración de 400 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 47.60%, mientras que la administración de 100 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.25., Figura R.50B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad pGluAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.26., Figura R.50C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de pGluAP unida a membrana en las glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad pGluAP unida a membrana (*Tabla R.24., Tabla R.25., Tabla R.26., Figura R.51.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad pGluAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.24., Figura R.51A.*). La administración de las dosis más altas de progesterona (200 mg/Kg y 400 mg/Kg) a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) del 41.55% en la actividad pGluAP unida a membrana (*Tabla R.25., Figura R.51B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad pGluAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.26., Figura R.51C.*).

pGluAP						
	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	9.2 ± 3.2	11.1 ± 3.8	28.2 ± 2.7	11.2 ± 3.1	37.7 ± 6.8	28.3 ± 4.7
OV-C	19.9 ± 1.3	26.9 ± 3.4	56.0 ± 3.1	19.1 ± 2.9	49.2 ± 4.6	30.9 ± 4.8
E 10 mg/Kg	7.2 ± 2.2	9.2 ± 1.9	18.6 ± 4.0	11.3 ± 2.7	49.0 ± 6.3	28.8 ± 6.3
E 20 mg/Kg	19.4 ± 2.9	15.2 ± 2.4	56.7 ± 10.8	22.8 ± 4.8	59.8 ± 6.0	38.6 ± 3.3
E 40 mg/Kg	33.5 ± 4.1	16.2 ± 2.4	50.6 ± 6.0	16.1 ± 3.3	59.8 ± 5.9	32.8 ± 2.6

Tabla R.24. Valores de actividad específica de piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol (E). Los resultados se expresan como picomoles de piroglutamato-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

pGluAP						
	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	9.8 ± 2.9	11.7 ± 2.0	27.0 ± 1.6	11.1 ± 0.9	35.0 ± 2.0	24.5 ± 3.1
OV-C	18.3 ± 1.2	27.2 ± 1.0	55.1 ± 2.1	21.2 ± 2.0	37.1 ± 4.3	27.6 ± 3.2
P 100 mg/Kg	7.2 ± 1.1	4.9 ± 0.9	14.1 ± 3.6	4.1 ± 0.6	34.9 ± 4.0	14.3 ± 2.3
P 200 mg/Kg	23.1 ± 2.0	19.2 ± 1.5	54.7 ± 6.0	23.5 ± 3.6	50.0 ± 4.3	23.1 ± 2.4
P 400 mg/Kg	31.0 ± 5.2	16.3 ± 2.0	79.8 ± 16.9	17.0 ± 2.0	51.7 ± 3.9	17.6 ± 2.6

Tabla R.25. Valores de actividad específica de piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona (P). Los resultados se expresan como picomoles de piroglutamato-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

pGluAP						
	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	Soluble	Membrana	Soluble	Membrana	Soluble	Membrana
C	9.4 ± 0.7	10.8 ± 0.9	27.6 ± 3.1	10.4 ± 2.3	35.0 ± 5.2	24.1 ± 1.6
OV-C	18.4 ± 2.5	28.7 ± 3.7	56.0 ± 11.1	21.0 ± 2.9	34.6 ± 6.8	25.5 ± 3.4
E + P 10 + 100 mg/Kg	7.4 ± 0.9	10.6 ± 1.6	15.4 ± 2.9	18.7 ± 4.0	38.9 ± 7.1	18.4 ± 1.8
E + P 20 + 200 mg/Kg	25.4 ± 3.6	18.0 ± 2.1	24.7 ± 5.1	19.5 ± 6.1	28.6 ± 4.3	24.1 ± 2.8
E + P 40 + 400 mg/Kg	30.9 ± 5.1	21.6 ± 3.0	38.0 ± 6.6	24.4 ± 6.3	21.6 ± 3.4	24.3 ± 2.0

Tabla R.26. Valores de actividad específica de piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona (E + P). Los resultados se expresan como picomoles de piroglutamato-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

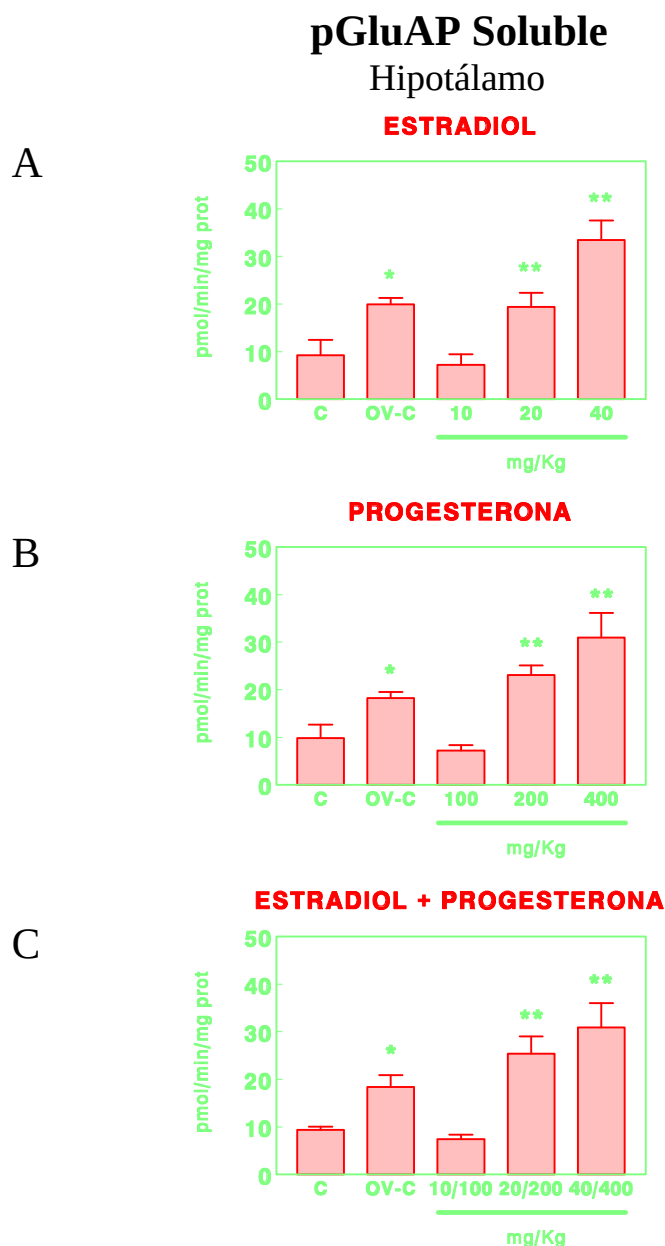


Figura R.47. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP) soluble en el hipotálamo de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de piroglutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

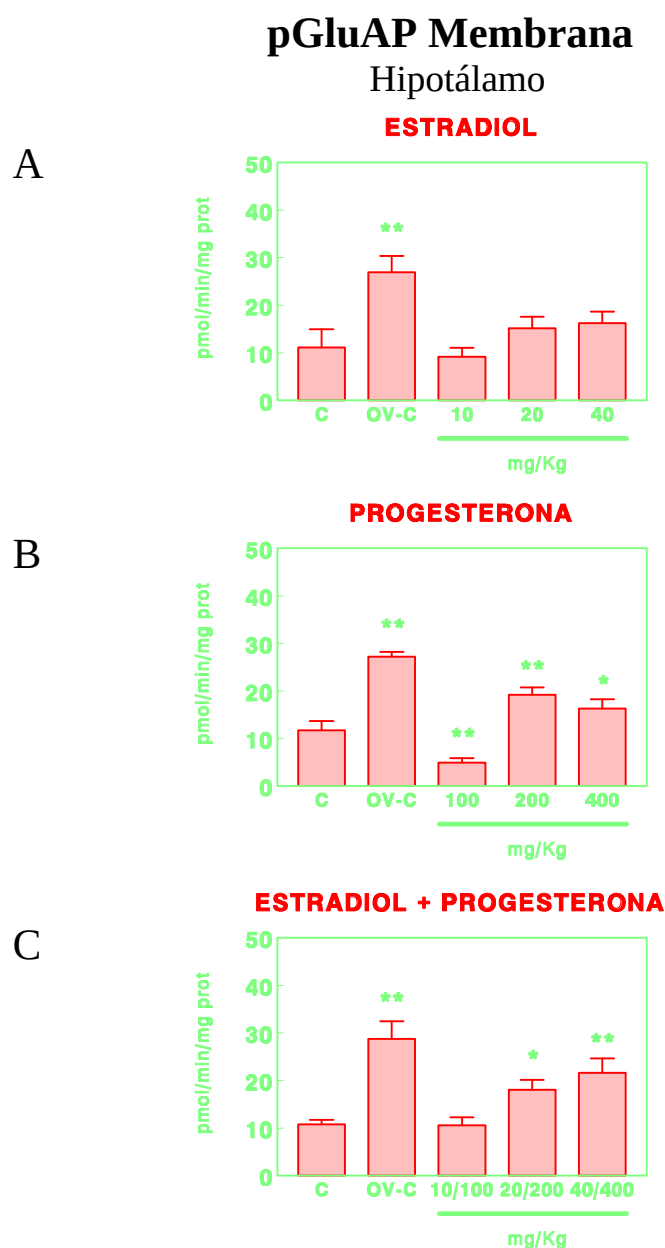


Figura R.48. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP) unida a membrana en el hipotálamo de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de piroglutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

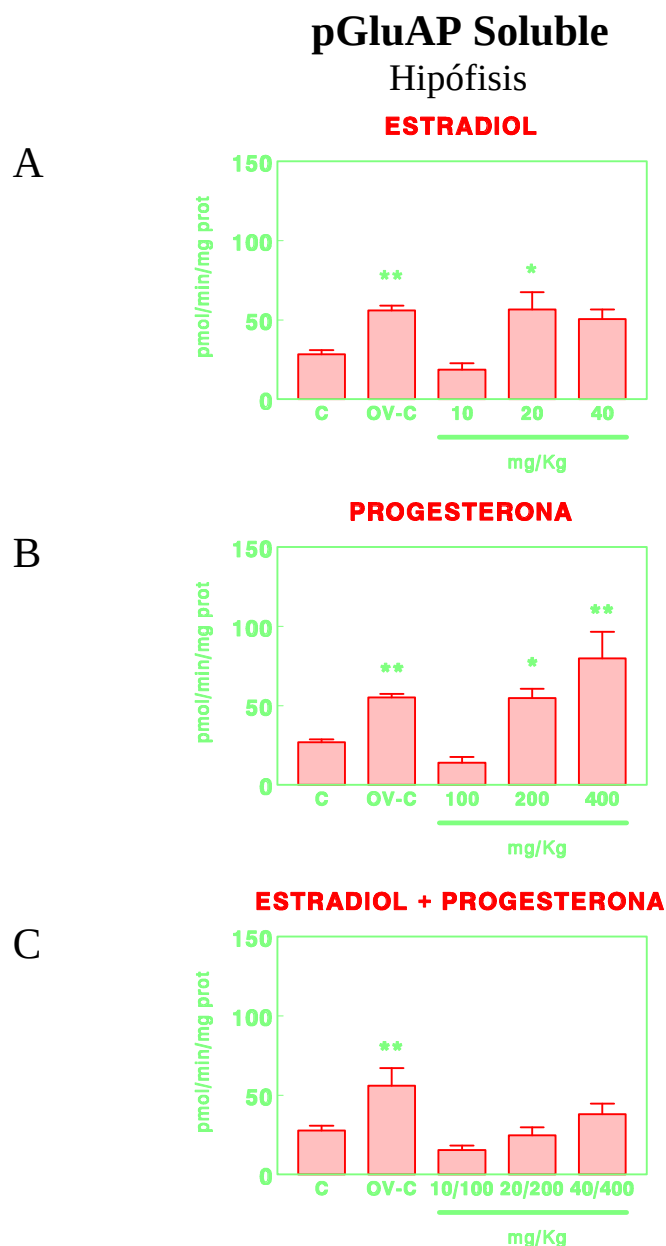


Figura R.49. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP) soluble en la hipófisis de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de piroglutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

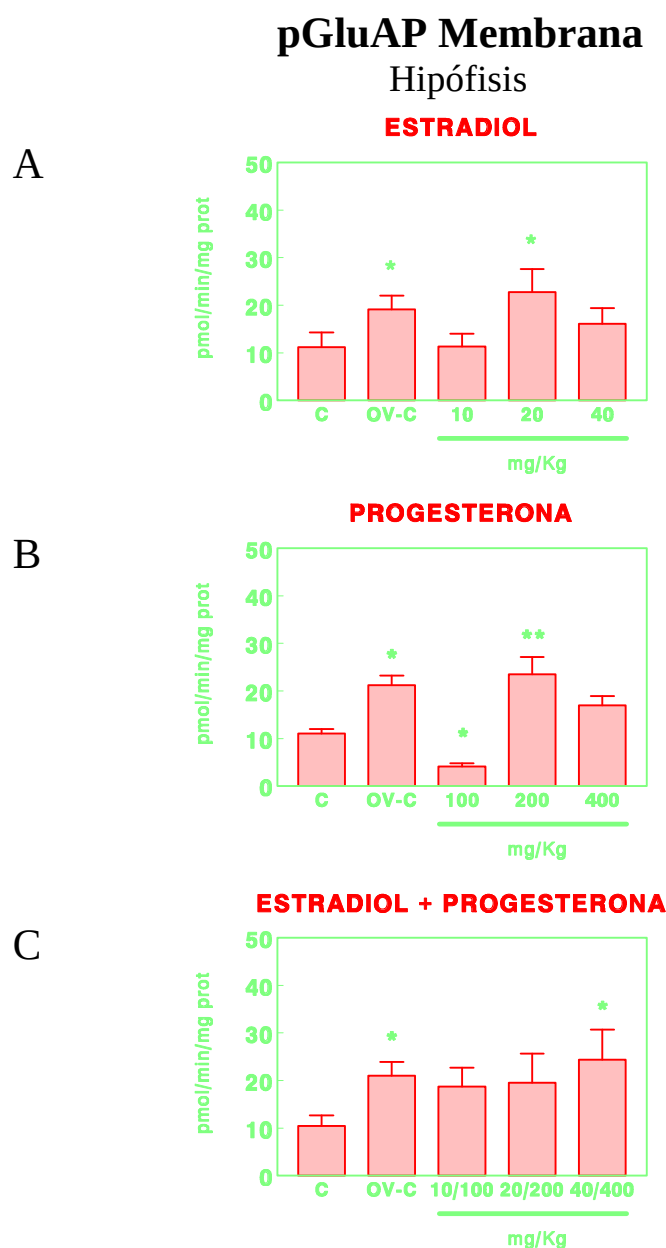


Figura R.50. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP) unida a membrana en la hipófisis de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de piroglutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=8) (* p <0.05; ** p <0.01).

pGluAP Soluble

Glándulas adrenales

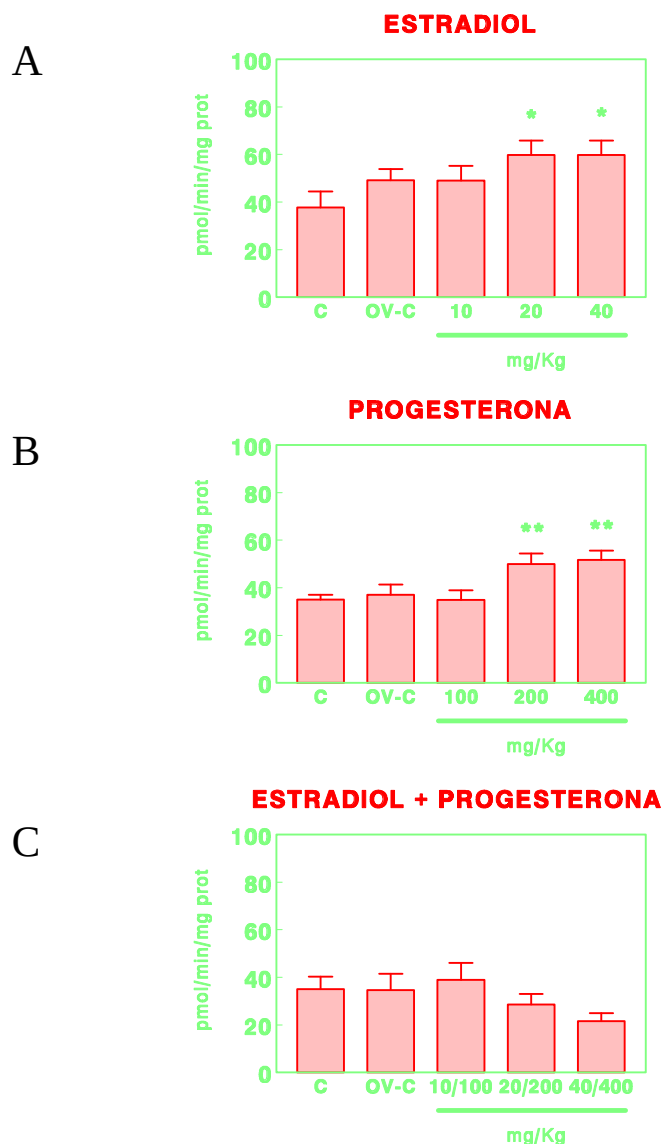


Figura R.51. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP) soluble en las glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de piroglutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (*p<0.05; **p<0.01).

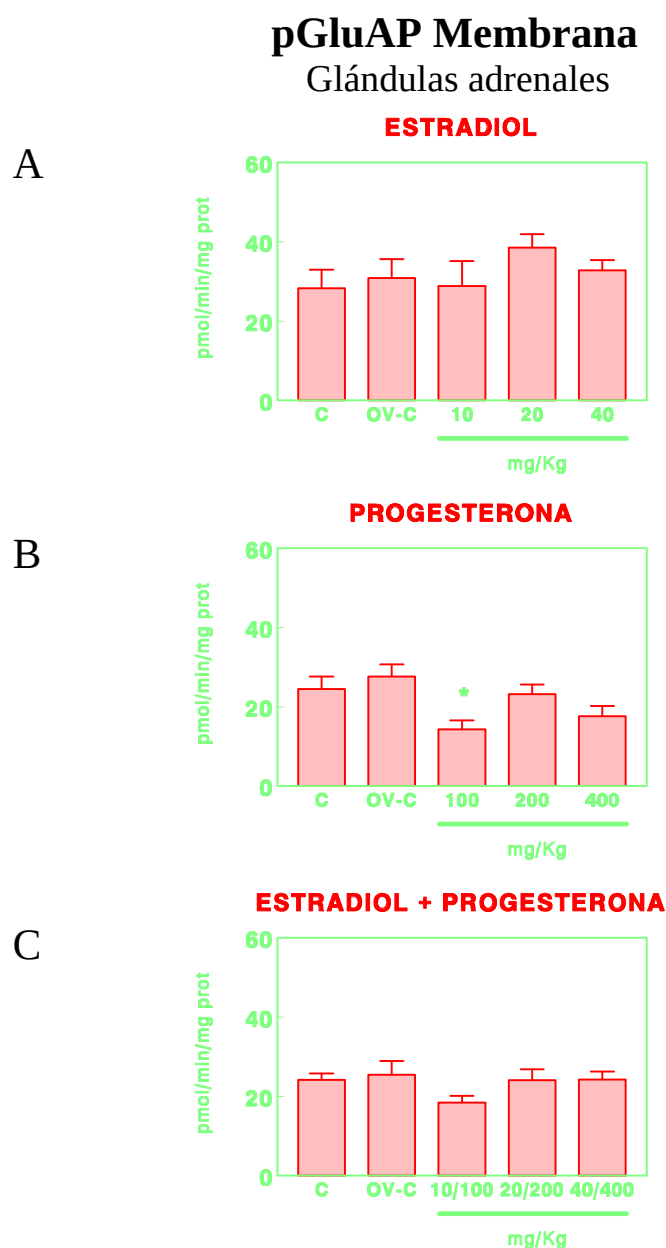


Figura R.52. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP) unida a membrana en las glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de piroglutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; $n=10$) (* $p<0.05$).

2.7. Efecto de la ovariectomía y la administración de estradiol y progesterona sobre la actividad específica de leucina aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de leucina aminopeptidasa (LeuAP) soluble en el hipotálamo de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad LeuAP soluble (*Tabla R.27., Tabla R.28., Tabla R.29., Figura R.52.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad LeuAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.27., Figura R.52A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados sí provoca cambios en la actividad específica de LeuAP soluble. Así, la administración de 200mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 24.53%, la administración de 400 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 69.76%, si bien la administración de 100 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.28., Figura R.52B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad LeuAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.29., Figura R.52C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de LeuAP unida a membrana en el hipotálamo de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía provoca un incremento significativo medio ($p<0.05$) de la actividad LeuAP unida a membrana del 39.28% (*Tabla R.27., Tabla R.28., Tabla R.29., Figura R.53.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad LeuAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.27., Figura R.53A.*). La administración de las dosis más bajas de progesterona (100 mg/Kg y 200 mg/Kg) a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 400 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 35.81% en la actividad LeuAP unida a membrana (*Tabla R.28., Figura R.53B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad LeuAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.29., Figura R.53C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de LeuAP soluble en la hipófisis de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad LeuAP soluble (*Tabla R.27., Tabla R.28., Tabla R.29., Figura R.54.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad LeuAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.27., Figura R.54A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados provoca un cambio dosis-dependiente en la actividad LeuAP soluble. Así, la administración de 100 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 58.41%, la administración de 200 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 82.66% y la administración de 400 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 86.61% (*Tabla R.28., Figura R.54B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de LeuAP soluble, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 34.14% (*Tabla R.29., Figura R.54C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de LeuAP unida a membrana en la hipófisis de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad LeuAP unida a membrana (*Tabla R.27., Tabla R.28., Tabla R.29., Figura R.55.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad LeuAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.27., Figura R.55A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados sí provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de LeuAP unida a membrana, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 100 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 200 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 67.33% (*Tabla R.28., Figura R.55B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad LeuAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.29., Figura R.55C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de LeuAP soluble en las glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad LeuAP soluble (*Tabla R.27., Tabla R.28., Tabla R.29., Figura R.56.*). Sin embargo, la administración de estradiol a animales ovariectomizados sí provoca cambios en la actividad LeuAP soluble. Así, la administración de 10 mg/Kg provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 21.71%, la administración de 20 mg/Kg provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 25.49%, y la administración de 40 mg/Kg provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 22.06% (*Tabla R.27., Figura R.56A.*). Por el contrario, la administración de progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad LeuAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.28., Figura R.56B.*). La administración conjunta de las dosis más bajas de estradiol más progesterona (10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona y 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona) a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p<0.05$) del 25.35% en la actividad LeuAP soluble (*Tabla R.29., Figura R.56C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de LeuAP unida a membrana en las glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía provoca un incremento significativo medio ($p<0.05$) de la actividad LeuAP unida a membrana del 27.72% (*Tabla R.27., Tabla R.28., Tabla R.29., Figura R.57.*). La administración de las diferentes dosis de estradiol a animales ovariectomizados también provoca cambios en la actividad LeuAP unida a membrana. Así, la administración de 10 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 29.58%, la administración de 20 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 33.56% y la administración de 40 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 33.47% (*Tabla R.27., Figura R.57A.*). Por el contrario, la administración de progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna de la actividad LeuAP unida a membrana a ninguna de las dosis empleadas (*Tabla R.28., Figura R.57B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados también modifica la actividad específica de LeuAP unida a membrana. Así, la administración de 20mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.05$) del 25.27%, la administración de 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 36.68%, mientras que la administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.29., Figura R.57C.*).

LeuAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	677.0 ± 97.1	55.8 ± 8.1	451.8 ± 37.7	356.4 ± 49.4	372.0 ± 31.9	307.0 ± 31.5
OV-C	729.7 ± 118.5	77.3 ± 6.2	550.6 ± 21.0	353.7 ± 67.3	390.9 ± 30.0	391.0 ± 21.0
E 10 mg/Kg	486.0 ± 88.6	50.0 ± 5.7	384.3 ± 31.5	325.9 ± 31.5	291.2 ± 19.4	397.8 ± 21.8
E 20 mg/Kg	597.4 ± 103.7	51.1 ± 3.6	501.7 ± 18.9	326.1 ± 34.2	277.2 ± 11.0	410.0 ± 23.5
E 40 mg/Kg	479.2 ± 102.0	61.6 ± 6.5	435.7 ± 34.2	304.3 ± 44.8	289.9 ± 11.7	409.7 ± 12.6

Tabla R.27. Valores de actividad específica de leucina aminopeptidasa (LeuAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol (E). Los resultados se expresan como picomoles de leucina-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

LeuAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	678.5 ± 56.9	58.0 ± 4.5	454.3 ± 55.5	350.7 ± 47.8	352.8 ± 14.2	315.5 ± 38.4
OV-C	737.9 ± 38.0	79.6 ± 5.8	572.7 ± 61.4	429.8 ± 28.4	329.0 ± 16.3	412.0 ± 14.4
P 100 mg/Kg	735.7 ± 38.4	56.9 ± 9.1	719.6 ± 62.8	337.3 ± 50.3	339.1 ± 31.5	277.3 ± 46.5
P 200 mg/Kg	845.0 ± 50.4	72.1 ± 5.3	829.7 ± 64.9	586.9 ± 105.5	320.1 ± 43.9	288.5 ± 28.3
P 400 mg/Kg	1151.9 ± 32.2	78.8 ± 7.4	847.7 ± 67.7	332.3 ± 56.4	378.4 ± 18.1	282.3 ± 69.5

Tabla R.28. Valores de actividad específica de leucina aminopeptidasa (LeuAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona (P). Los resultados se expresan como picomoles de leucina-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

LeuAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	678.5 ± 42.7	60.5 ± 4.4	456.6 ± 48.3	352.4 ± 100.0	360.0 ± 26.3	312.5 ± 18.8
OV-C	733.3 ± 23.1	85.9 ± 5.6	577.7 ± 32.4	423.3 ± 108.5	357.9 ± 38.4	391.2 ± 31.8
E + P 10 + 100 mg/Kg	651.7 ± 52.3	68.8 ± 8.7	494.3 ± 46.5	378.7 ± 89.7	342.6 ± 26.9	341.0 ± 21.5
E + P 20 + 200 mg/Kg	715.4 ± 41.3	76.3 ± 11.7	612.4 ± 74.1	442.5 ± 142.2	340.3 ± 17.8	391.5 ± 32.7
E + P 40 + 400 mg/Kg	741.9 ± 58.0	77.5 ± 9.8	539.4 ± 41.2	526.4 ± 124.1	268.7 ± 29.3	427.2 ± 33.5

Tabla R.29. Valores de actividad específica de leucina aminopeptidasa (LeuAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona (E + P). Los resultados se expresan como picomoles de leucina-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

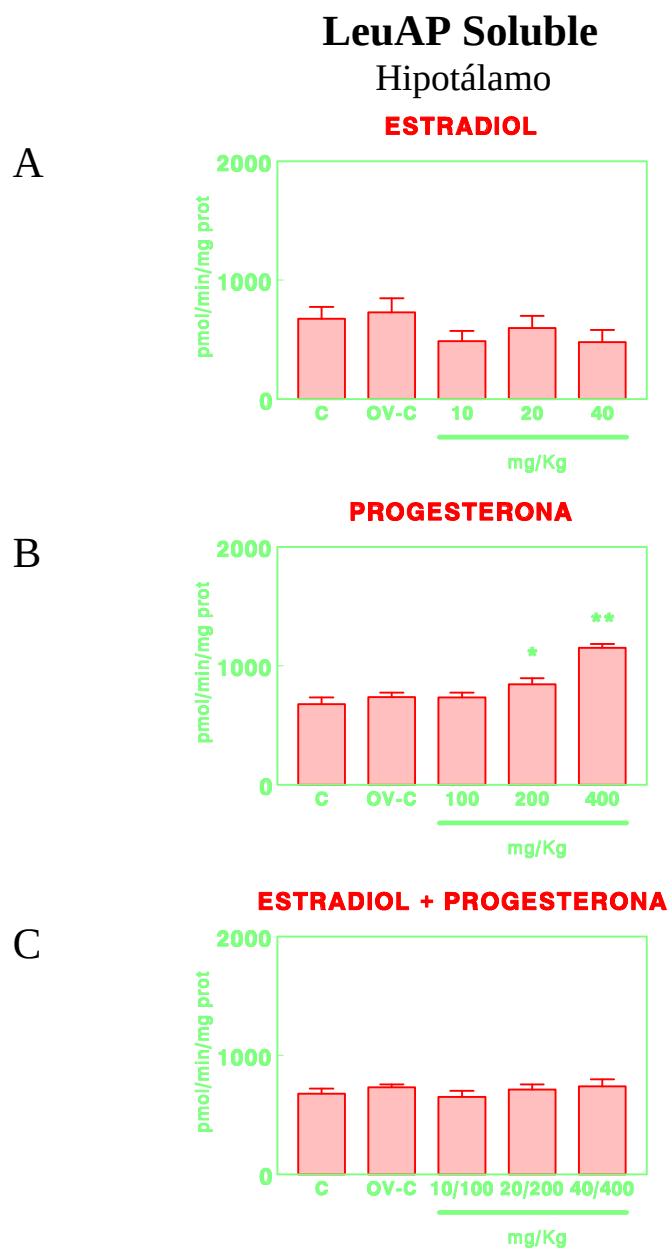


Figura R.53. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de leucina aminopeptidasa (LeuAP) soluble en el hipotálamo de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

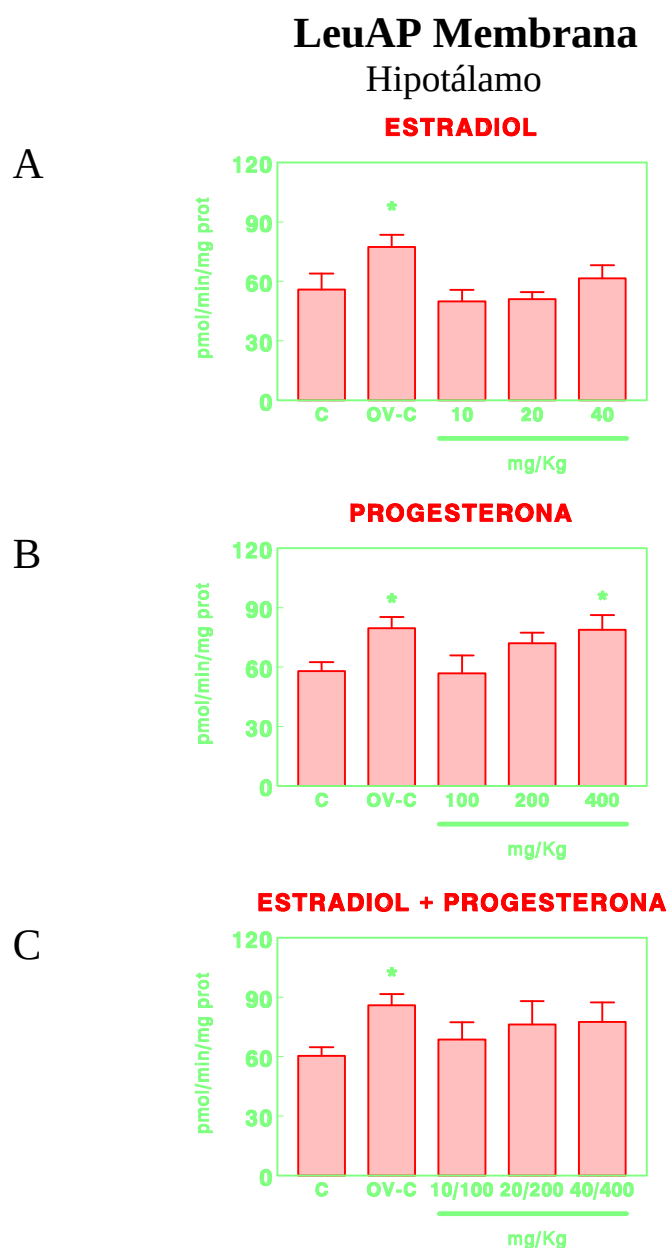


Figura R.54. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de leucina aminopeptidasa (LeuAP) unida a membrana en el hipotálamo de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; $n=10$) (* $p<0.05$).

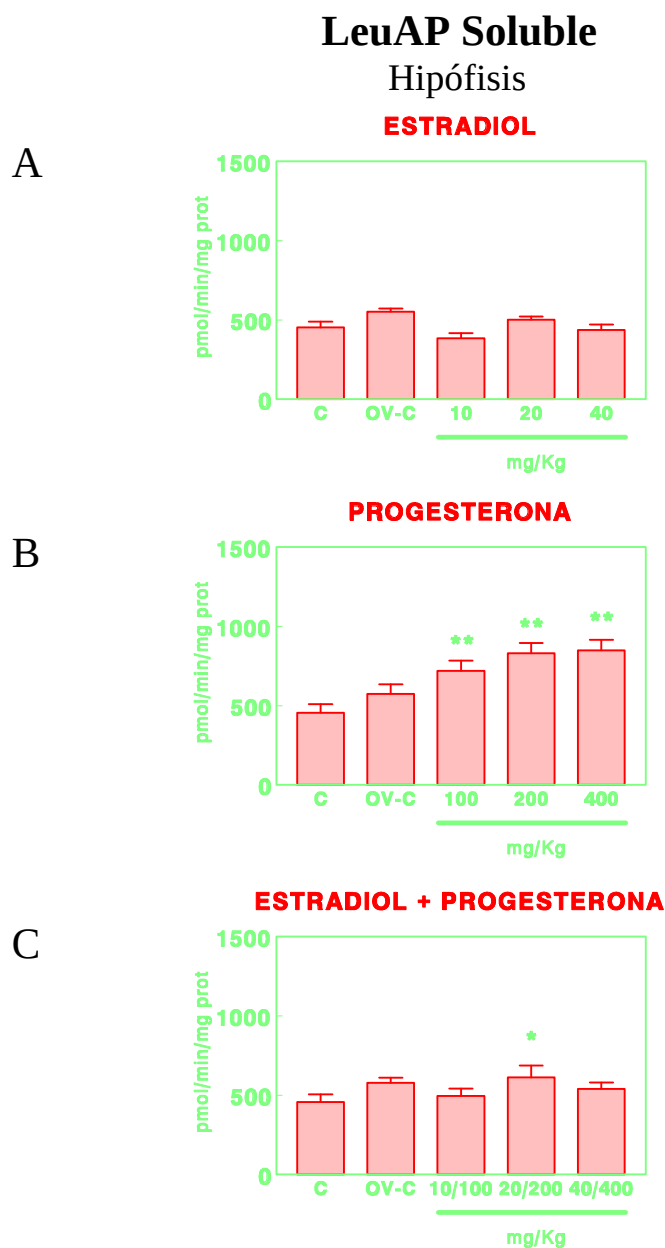


Figura R.55. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de leucina aminopeptidasa soluble en la hipófisis de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

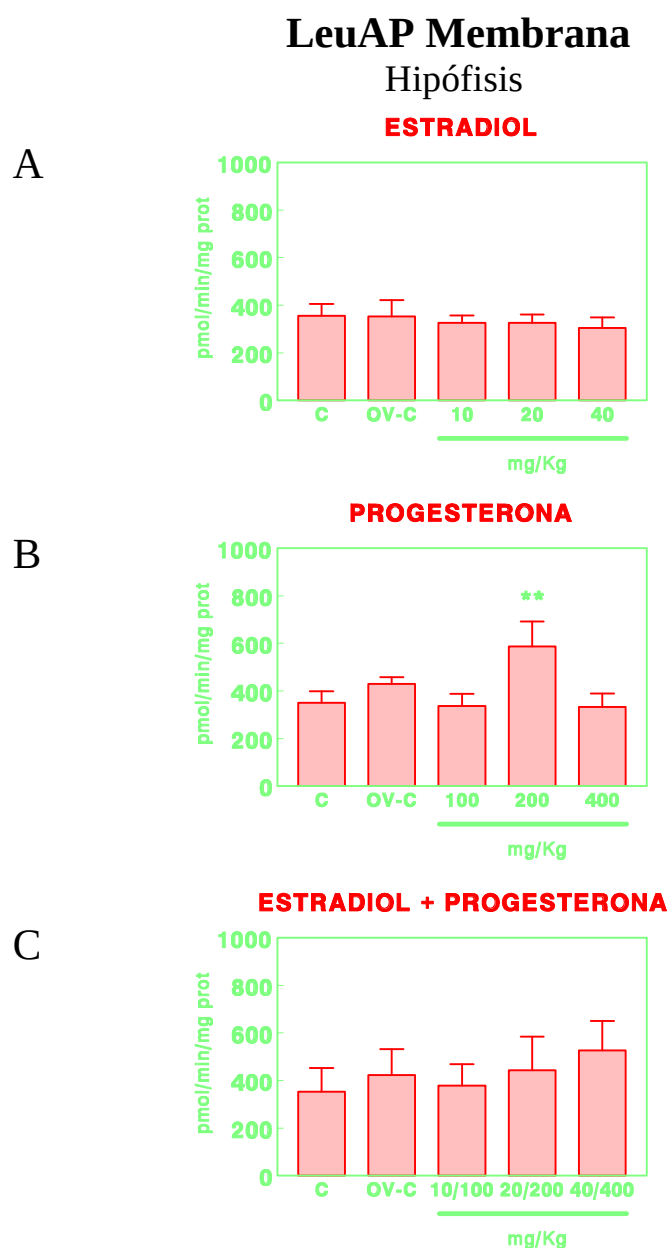
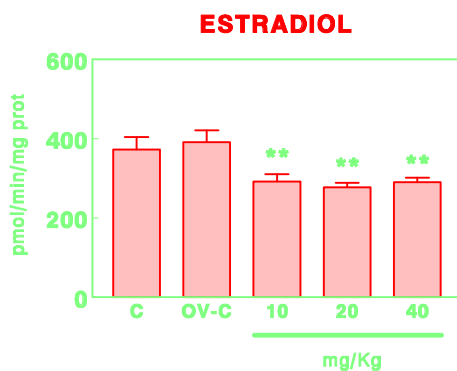


Figura R.56. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de leucina aminopeptidasa (LeuAP) unida a membrana en la hipófisis de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=8) (** $p < 0.01$).

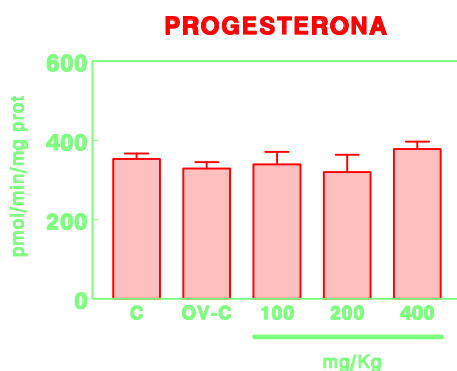
LeuAP Soluble

Glándulas adrenales

A



B



C

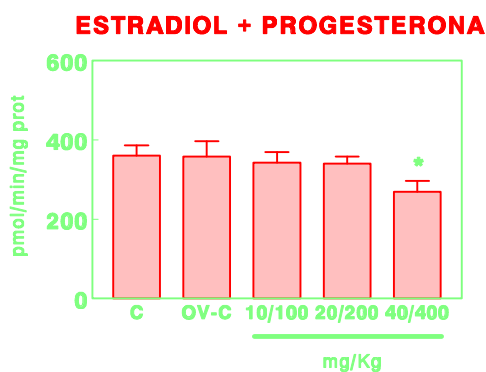
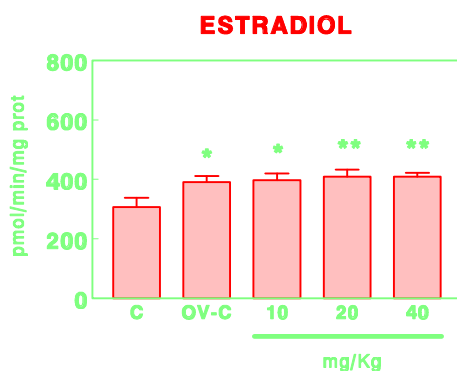


Figura R.57. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de leucina aminopeptidasa (LeuAP) soluble en las glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

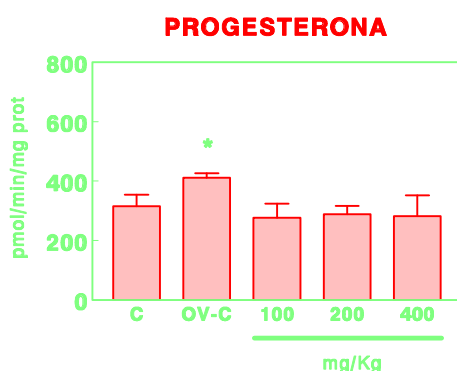
LeuAP Membrana

Glándulas adrenales

A



B



C

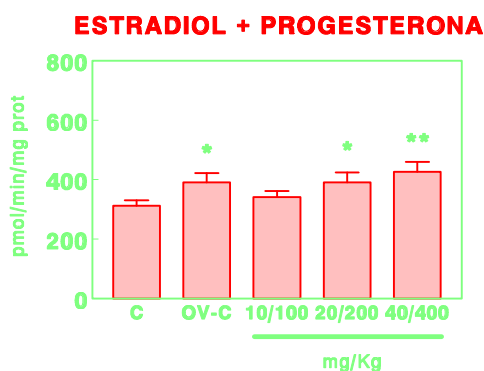


Figura R.58. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de leucina aminopeptidasa (LeuAP) unida a membrana en las glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

2.8. Efecto de la ovariectomía y la administración de estradiol y progesterona sobre la actividad específica de tirosina aminopeptidasa soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón.

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de tirosina aminopeptidasa (TyrAP) soluble en el hipotálamo de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía provoca un incremento significativo medio ($p < 0.05$) de la actividad TyrAP soluble del 30.90% (*Tabla R.30., Tabla R.31., Tabla R.32., Figura R.58.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad TyrAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.30., Figura R.58A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados sí provoca un incremento dosis-dependiente en la actividad específica de TyrAP soluble. Así, la administración de 100 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 59.50%, la administración de 200 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 70.44% y la administración de 400 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 110.98% (*Tabla R.31., Figura R.58B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad TyrAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.32., Figura R.58C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de LeuAP unida a membrana en el hipotálamo de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía provoca un incremento significativo medio ($p < 0.01$) de la actividad TyrAP unida a membrana del 64.52% (*Tabla R.30., Tabla R.31., Tabla R.32., Figura R.59.*) La administración de las dosis más bajas de estradiol (10 mg/Kg y 20 mg/Kg) a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 40 mg/Kg de estradiol provoca un incremento significativo ($p < 0.01$) del 100.64% en la actividad TyrAP unida a membrana (*Tabla R.30., Figura R.59A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad TyrAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.31., Figura R.59B.*). La administración de las dosis más altas de estradiol más progesterona (20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona) a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p < 0.01$) del 66.23% en la actividad TyrAP unida a membrana (*Tabla R.32., Figura R.59C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de TyrAP soluble en la hipófisis de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad TyrAP soluble (*Tabla R.30., Tabla R.31., Tabla R.32., Figura R.60.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad TyrAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.30., Figura R.60A.*). Sin embargo, la administración de progesterona a animales ovariectomizados sí provoca un cambio en la actividad específica de TyrAP soluble. Así, la administración de 200mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 62.01%, la administración de 400 mg/Kg provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 86.67%, mientras que la administración de 100 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.31., Figura R.60B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad TyrAP soluble a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.32., Figura R.60C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de TyrAP unida a membrana en la hipófisis de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía provoca un incremento significativo medio ($p<0.05$) de la actividad TyrAP unida a membrana del 40.83% (*Tabla R.30., Tabla R.31., Tabla R.32., Figura R.61.*). La administración de 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol a animales ovariectomizados no provoca cambios significativos con respecto al control, mientras que la administración de 10 mg/Kg de estradiol provoca un descenso significativo ($p<0.05$) del 65.67% en la actividad TyrAP unida a membrana (*Tabla R.30., Figura R.61A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad específica de TyrAP unida a membrana, dependiendo de la dosis empleada. Así, la administración de 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p<0.01$) del 60.25%, la administración de 200 mg/Kg de progesterona provoca un incremento significativo ($p<0.01$) del 74.95%, mientras que la administración de 400 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.31., Figura R.61B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca variación significativa alguna sobre la actividad TyrAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.32., Figura R.61C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de TyrAP soluble en las glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad TyrAP soluble (*Tabla R.30., Tabla R.31., Tabla R.32., Figura R.62.*). Sin embargo, la administración de estradiol a animales ovariectomizados sí provoca cambios en la actividad TyrAP soluble. Así, la administración de 10 mg/Kg, provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) del 31.06%, la administración de 20 mg/Kg provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) del 25.31% y la administración de 40 mg/Kg provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) del 17.69% (*Tabla R.30., Figura R.62A.*). La administración de progesterona a animales ovariectomizados también provoca cambios en la actividad TyrAP soluble. Así, la administración de 100 mg/Kg provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) del 17.05%, la administración de 200 mg/Kg provoca un descenso significativo ($p < 0.01$) del 22.11%, mientras que la administración de 400 mg/Kg de progesterona no provoca variación significativa alguna de la TyrAP soluble (*Tabla R.31., Figura R.62B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados provoca un efecto diferencial sobre la actividad TyrAP soluble dependiendo de la dosis utilizada. Así, la administración de 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) del 24.56%, la administración de 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona provoca un descenso significativo ($p < 0.01$) del 39.35%, mientras que la administración de 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona no provoca cambios significativos con respecto al control (*Tabla R.32., Figura R.62C.*).

El análisis del efecto de la ovariectomía y la posterior administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona sobre la actividad específica de TyrAP unida a membrana en las glándulas adrenales de ratón, muestra los siguientes resultados:

La ovariectomía no provoca variación significativa alguna de la actividad TyrAP unida a membrana (*Tabla R.30., Tabla R.31., Tabla R.32., Figura R.63.*). La administración de estradiol a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad TyrAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.30., Figura R.63A.*). De igual modo, la administración de progesterona a animales ovariectomizados tampoco provoca variación significativa alguna sobre la actividad TyrAP unida a membrana a ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.31., Figura R.63B.*). La administración conjunta de estradiol y progesterona a animales ovariectomizados no provoca, igualmente, variación significativa alguna sobre la actividad TyrAP unida a membrana ninguna de las dosis utilizadas (*Tabla R.32., Figura R.63C.*).

TyrAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	202.2 ± 22.2	30.5 ± 3.6	326.0 ± 68.2	68.5 ± 12.9	83.7 ± 9.6	78.7 ± 4.2
OV-C	281.8 ± 46.1	57.2 ± 5.2	398.8 ± 63.0	79.4 ± 17.7	87.8 ± 7.4	96.8 ± 7.2
E 10 mg/Kg	205.8 ± 42.2	29.5 ± 3.9	151.6 ± 30.4	23.5 ± 4.8	57.7 ± 5.4	78.9 ± 6.3
E 20 mg/Kg	266.2 ± 39.4	35.0 ± 5.3	366.9 ± 65.2	54.7 ± 7.6	62.5 ± 4.5	97.4 ± 5.9
E 40 mg/Kg	222.8 ± 45.1	61.1 ± 4.1	340.1 ± 31.8	42.9 ± 11.2	68.9 ± 4.1	100.0 ± 5.3

Tabla R.30. Valores de actividad específica de tirosina aminopeptidasa (TyrAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol (E). Los resultados se expresan como picomoles de tirosina-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

TyrAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	209.9 ± 18.0	27.9 ± 3.7	319.1 ± 30.3	65.8 ± 7.3	80.8 ± 3.2	76.8 ± 10.0
OV-C	274.0 ± 16.9	43.2 ± 3.1	399.2 ± 28.9	98.9 ± 6.7	88.2 ± 6.4	87.7 ± 6.5
P 100 mg/Kg	334.8 ± 30.7	25.6 ± 5.0	337.5 ± 33.4	26.1 ± 4.1	67.0 ± 3.3	60.1 ± 10.6
P 200 mg/Kg	357.7 ± 21.1	38.8 ± 3.3	516.9 ± 31.8	115.1 ± 15.4	62.9 ± 6.1	69.9 ± 7.9
P 400 mg/Kg	442.8 ± 21.4	38.8 ± 4.5	595.6 ± 47.7	56.9 ± 11.9	74.4 ± 4.1	63.5 ± 12.7

Tabla R.31. Valores de actividad específica de tirosina aminopeptidasa (TyrAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona (P). Los resultados se expresan como picomoles de tirosina-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media ± SEM; n = 10).

TyrAP

	HIPOTÁLAMO		HIPÓFISIS		ADRENAL	
	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>	<i>Soluble</i>	<i>Membrana</i>
C	212.1 ± 12.9	33.9 ± 3.2	326.9 ± 30.1	70.9 ± 17.2	83.7 ± 6.9	72.2 ± 7.8
OV-C	260.5 ± 13.5	51.1 ± 7.3	396.3 ± 43.2	110.8 ± 15.7	84.5 ± 10.8	81.5 ± 4.9
E + P 10 + 100 mg/Kg	191.6 ± 8.6	11.4 ± 2.9	269.0 ± 30.1	75.6 ± 14.5	63.2 ± 5.3	58.8 ± 4.8
E + P 20 + 200 mg/Kg	223.5 ± 14.7	32.3 ± 4.5	421.1 ± 70.8	87.2 ± 26.0	74.9 ± 3.7	78.2 ± 10.5
E + P 40 + 400 mg/Kg	211.5 ± 13.5	32.1 ± 3.7	372.7 ± 38.9	69.3 ± 20.0	50.8 ± 6.2	81.4 ± 7.3

Tabla R.32. Valores de actividad específica de tirosina aminopeptidasa (TyrAP) soluble y unida a membrana del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones control (C), ovariectomizados (OV-C) y ovariectomizados tratados con 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona (E + P). Los resultados se expresan como picomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media $\pm$ SEM; n = 10).

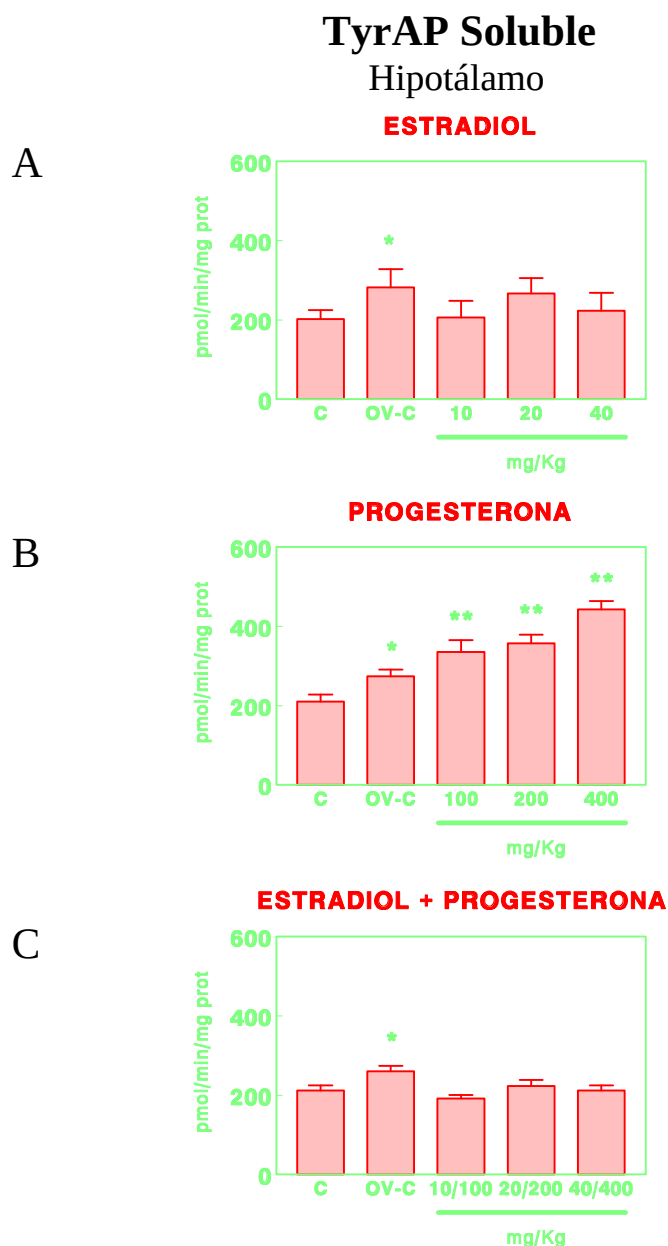


Figura R.59. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de tirosina aminopeptidasa (TyrAP) soluble en el hipotálamo de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

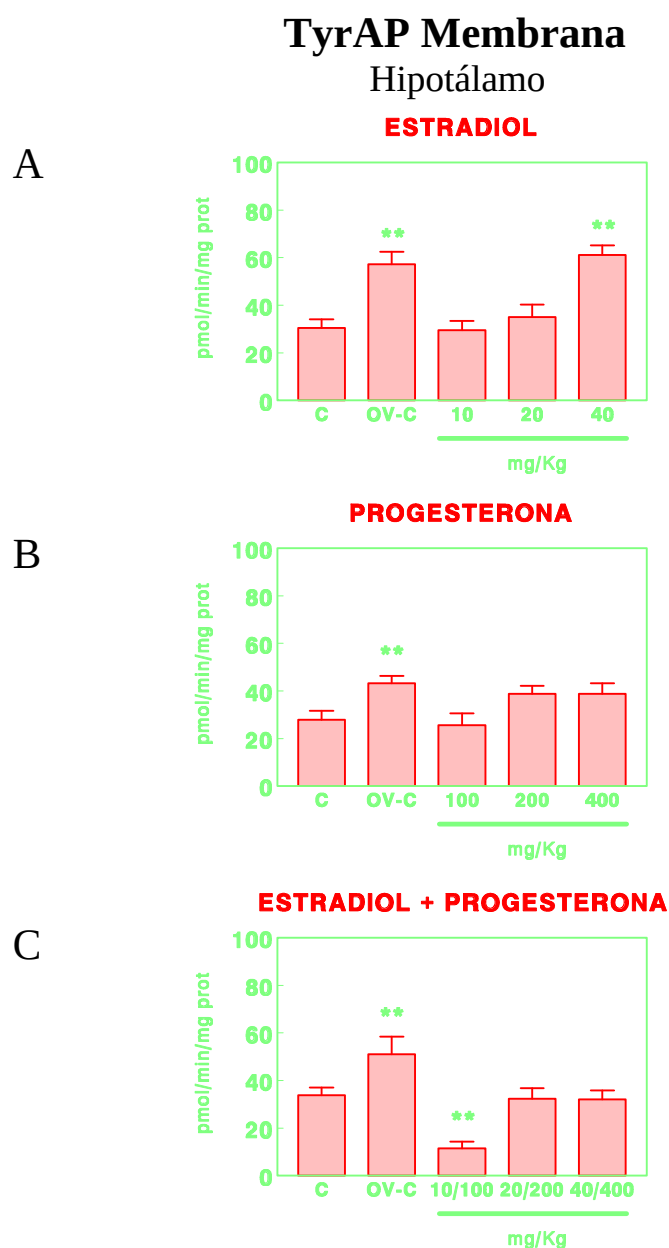


Figura R.60. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de tirosina aminopeptidasa (TyrAP) unida a membrana en el hipotálamo de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (** $p < 0.01$).

TyrAP Soluble

Hipófisis

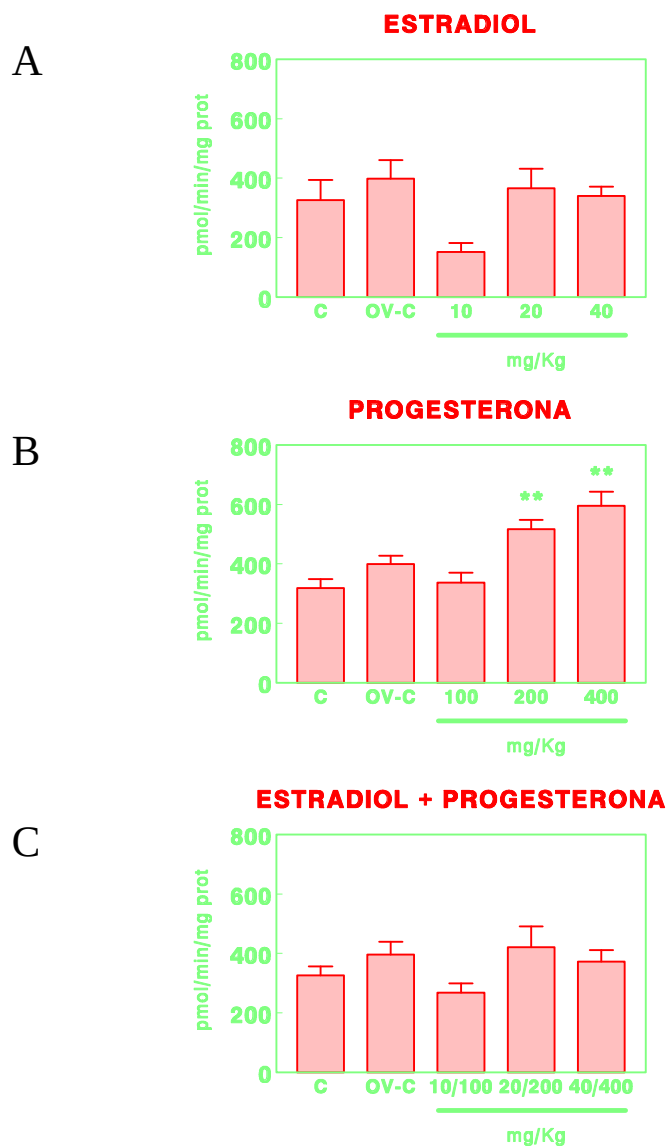


Figura R.61. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de tirosina aminopeptidasa (TyrAP) soluble en la hipófisis de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de tirosina-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media ± SEM; n=10) (**p<0.01).

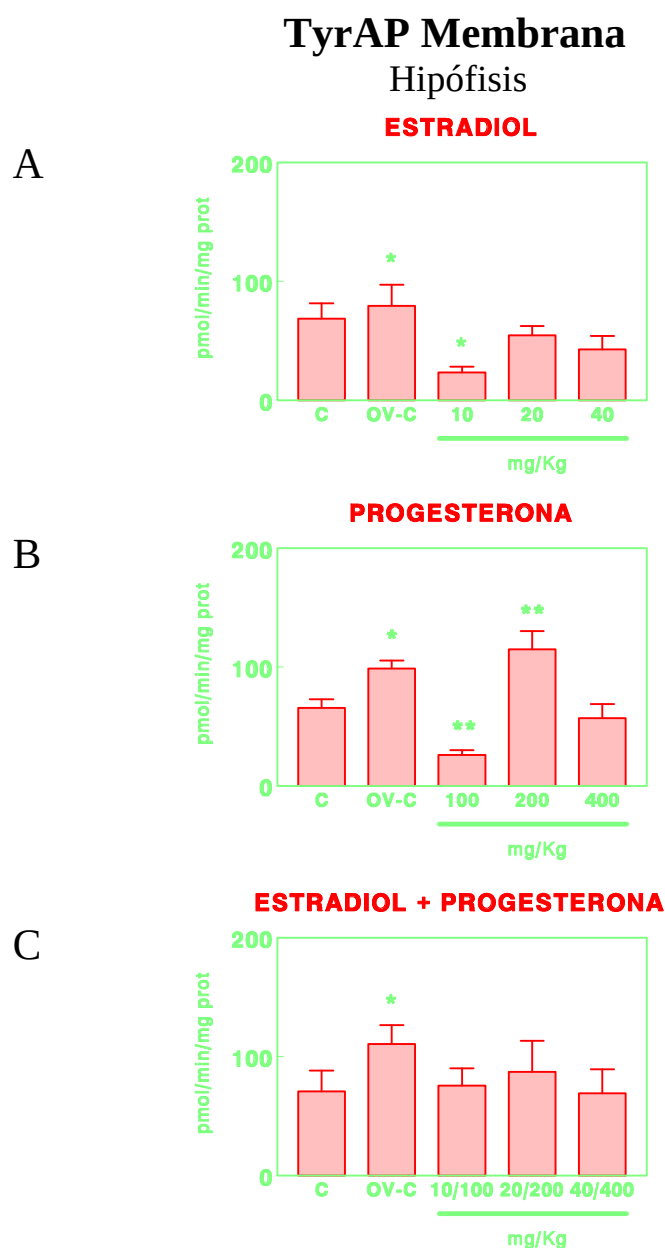


Figura R.62. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de tirosina aminopeptidasa unida a membrana en la hipófisis de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=8) (* p <0.05; ** p <0.01).

TyrAP Soluble

Glándulas adrenales

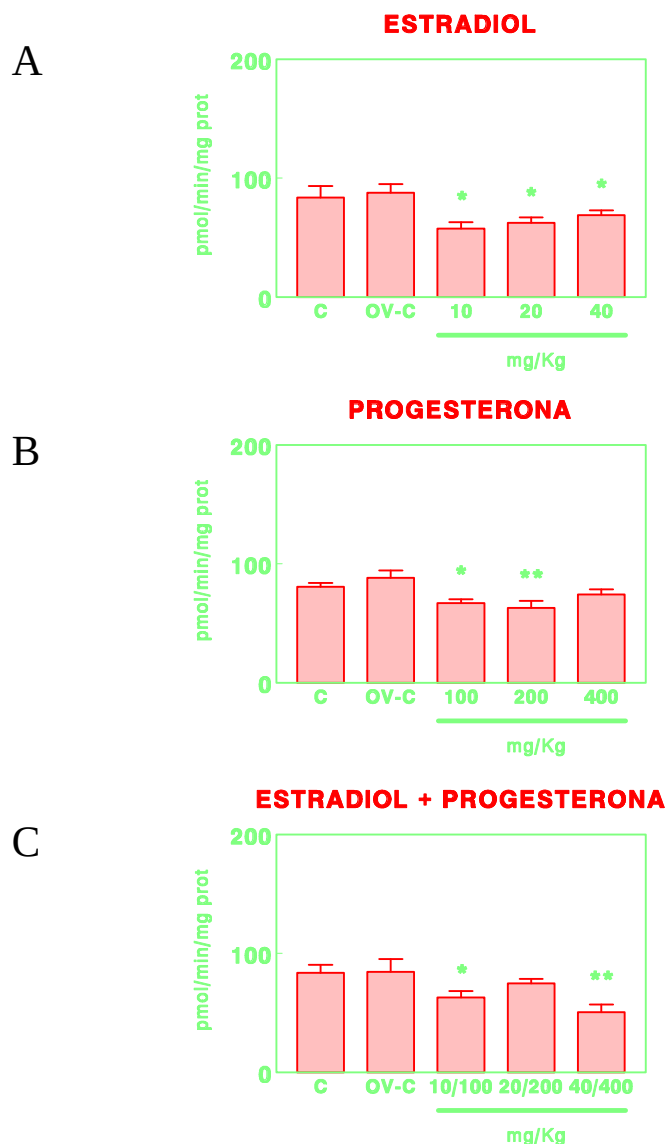
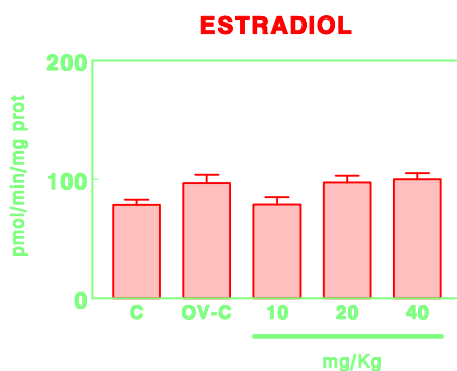


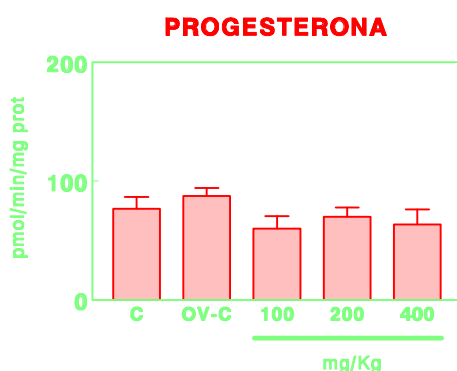
Figura R.63. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de tirosina aminopeptidasa (TyrAP) soluble en las glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10) (* p <0.05; ** p <0.01).

TyrAP Membrana Glándulas adrenales

A



B



C

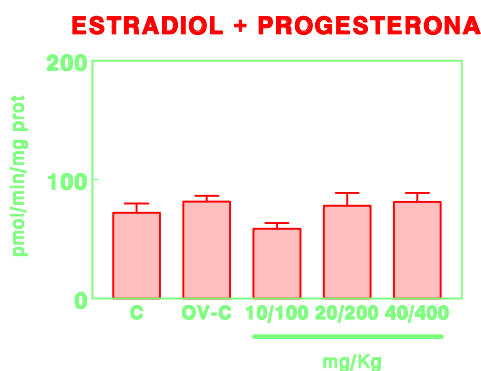


Figura R.64. Representación del efecto de la ovariectomía (OV-C) y la administración de (A) 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de estradiol, (B) 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de progesterona y (C) 10 mg/Kg de estradiol más 100 mg/Kg de progesterona, 20 mg/Kg de estradiol más 200 mg/Kg de progesterona y 40 mg/Kg de estradiol más 400 mg/Kg de progesterona, sobre la actividad específica de tirosina aminopeptidasa (TyrAP) unida a membrana en las glándulas adrenales de ratón. Los resultados se expresan en picomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media $\pm$ SEM; n=10).

V. DISCUSIÓN.

1. SOBRE LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS.

Para la detección de una aminopeptidasa, con absoluta garantía de su naturaleza, se exigen métodos de determinación que pudieran resultar complejos, ya que se necesitaría la presencia de un péptido sustrato para el enzima de secuencia conocida y en estado prácticamente puro y del manejo de técnicas sofisticadas tales como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o los analizadores de aminoácidos. Menos problemáticas resultarían las técnicas de cromatografía en capa fina o en papel, aunque en estos casos existirían problemas de cuantificación de la actividad enzimática.

Tales técnicas pueden ser utilizadas actualmente, de hecho algunos investigadores las utilizan para demostrar la actividad de una aminopeptidasa purificada sobre un determinado péptido, pero no estaban al alcance de los investigadores de hace cincuenta años. Estos decidieron perfeccionar las primitivas determinaciones de la actividad aminopeptidásica (que se realizaban midiendo el incremento del contenido de aminoácidos de la muestra incubada) utilizando sustratos artificiales hidrolizables por estos enzimas y cuyos productos fuesen fácilmente detectables y medibles.

El primer sustrato artificial utilizado para la determinación de una aminopeptidasa fue la L-leucinamida (Linderstrom-Lang, 1929). Inmediatamente se sugirió el nombre de leucina aminopeptidasa para el enzima, dado que no hidrolizaba los derivados N-acetilados de la L-leucinamida. El enzima no restringe su actividad al aminoácido leucina, sino que puede hidrolizar otras amidas sintéticas y distintos polipéptidos biológicamente activos. Los métodos de determinación de los productos de las hidrólisis de la L-leucinamida (leucina y amoniaco) son muy variados, ya que el pH óptimo de la reacción es de 8-9, y a pH 7.4 el enzima es prácticamente inactivo.

Es dudoso que la actividad de hidrólisis de L-leucinamida sea la misma que la detectada con otros sustratos artificiales. Por tanto, la clásica leucina aminopeptidasa es distinguible de otras aminopeptidasas que funcionan a pH próximo al neutro.

Sin lugar a duda, los sustratos artificiales más usados para la determinación de aminopeptidasas han sido las aminoacil- β -naftilamidas, derivados amídicos de la β -naftilamina. Estos sustratos fueron introducidos por primera vez por Gomori (1954), y desde entonces se han obtenido derivados de todos los aminoácidos, de muchos dipéptidos e, incluso, compuestos que han permitido la detección de diversas endopeptidasas mediante el bloqueo del grupo amino terminal del aminoácido con diversos grupos químicos. En principio, la β -naftilamina liberada por acción enzimática se acopla a una sal diazólica para producir un color rojo o azul dependiendo de la sal de acoplamiento considerada, y se mide espectrofotométricamente a 520 - 540nm. Este ha sido el método seguido en este trabajo de investigación para la determinación

de la actividad aminopeptidásica (véase material y métodos). Este método se ha aplicado también a la determinación histoquímica de aminopeptidasas (Gomori, 1954). Pero existe otro método para medir la β -naftilamida, y este es el método fluorimétrico, sin necesidad del posterior acoplamiento, a 335 nm de excitación y 412 nm de emisión. A los enzimas que hidrolizan las aminoacil- β -naftilamidas (arilamidas), y para diferenciarlos de otras aminopeptidasas que no hidrolizan a estos sustratos, se los ha denominado “arilamidases”.

Dado que la β -naftilamida es, con toda probabilidad, un agente carcinógeno y no es recomendable su uso rutinario, se han sintetizado otros sustratos de aminopeptidasas en los últimos años que también se utilizan en la actualidad. Nagatsu *et al.* (1976) introdujeron las aminoacil-p-nitroanilidas como sustratos que liberan p-nitroanilina y que se determinan espectrofotométricamente a 380 nm. Finalmente, Prusak *et al.* (1980) e Imai *et al.* (1983), han utilizado las aminoacil-7-amido-4-metil-cumarinas como sustratos de aminopeptidasa. La 4-metil-cumarina liberada por estos enzimas puede medirse fluorimétricamente a 460 nm, con excitación a 380 nm.

2. SOBRE LOS RESULTADOS.

2.1. Sobre la actividad de APA, APM, APB y CysAP.

La presente Tesis Doctoral describe por primera vez la influencia de los esteroides sexuales sobre las aminopeptidasas implicadas en la regulación del sistema renina angiotensina APA, APB y APM, así como sobre la CysAP, implicada en la regulación de la arginina-vasopresina, en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales de ratones machos y hembras.

En el caso de los machos, observamos como la orquidectomía modifica la actividad APA soluble, APM soluble y APB soluble en el hipotálamo. En la hipófisis, se ven modificadas la APM soluble y APB soluble, mientras que en las glándulas adrenales, tanto AspAP soluble como de membrana, GluAP soluble, APM soluble, APB soluble y CysAP soluble se modifican con la orquidectomía. Por el contrario, la administración de testosterona a animales orquidectomizados vuelve la actividad de estos enzimas hasta los niveles controles e incluso los disminuye, dependiendo de la dosis utilizada. También observamos que la administración de las dosis más elevadas de testosterona a los animales orquidectomizados modifica algunas actividades que no se alteraban con la orquidectomía. Esto se debe, probablemente, a un efecto farmacológico más que a un efecto fisiológico. De hecho, este efecto también aparece cuando se administran las dosis más altas de testosterona en situaciones donde las dosis más bajas devolvían la actividad de los enzimas a los niveles de los controles tras haber sido modificadas por la orquidectomía.

Por lo que respecta a las hembras, observamos que la ovariectomía incrementa la actividad APA (AspAP de membrana y GluAP soluble y de membrana) a nivel hipotalámico y la GluAP de membrana a nivel de las glándulas adrenales. En el hipotálamo, la administración de estradiol, progesterona y estradiol más progesterona retorna la actividad de AspAP de membrana y GluAP soluble y de membrana a los niveles controles, si bien la administración de progesterona sola o conjuntamente con estradiol tiene efectos diferenciales dependiendo de la dosis utilizada. En las glándulas adrenales, el incremento de actividad GluAP de membrana originado por la ovariectomía, se recupera con la administración de estradiol, progesterona o estradiol más progesterona.

En el caso de la actividad APM (AlaAP y LeuAP), la ovariectomía incrementó la actividad LeuAP de membrana en el hipotálamo y la actividad AlaAP y LeuAP de membrana en las glándulas adrenales. En el hipotálamo, la administración de estradiol, progesterona o estradiol más progesterona retorna la actividad LeuAP de membrana a los niveles controles. Sin embargo, en el caso de las glándulas adrenales, la administración de estradiol no solo no retorna la actividad de AlaAP y LeuAP de membrana a los niveles controles, sino que incluso los incrementa. Por el contrario, la administración de progesterona sí vuelve la actividad a los niveles controles. La administración conjunta de las dosis más bajas de estradiol y progesterona retornan la actividad a los niveles controles, si bien las dosis más altas incrementan de nuevo la actividad, probablemente como consecuencia del incremento provocado por el estradiol, como citábamos anteriormente.

La actividad APB de membrana aumentó significativamente con la ovariectomía en el hipotálamo y las glándulas adrenales y la APB soluble en la hipófisis. En el hipotálamo y las glándulas adrenales, la administración de estradiol, progesterona o estradiol más progesterona hace que la actividad APB de membrana vuelva a los niveles controles. En la hipófisis, fue la administración de estradiol, pero no de progesterona, la que retornó los valores de APB soluble a sus niveles controles.

Por último la actividad Cys AP de membrana se incrementó tras la ovariectomía solamente en el hipotálamo. Estas actividades vuelven a los valores observados antes de la cirugía tras la administración de estradiol o las dosis más bajas de progesterona, en este caso, incluso por debajo de los niveles controles. No obstante, la administración de las dosis más altas de progesterona incrementan nuevamente la actividad CysAP de membrana hipotalámica, aunque este efecto se anula con la administración conjunta de estradiol y progesterona.

En el caso de las hembras, también hemos observado que la administración de estradiol, progesterona y/o estradiol más progesterona a los animales ovariectomizados modifica algunas actividades que no se alteraban con la ovariectomía. Como indicábamos en su momento, estas observaciones son, probablemente, un efecto farmacológico más que a un efecto fisiológico. De

hecho, este efecto también aparece cuando se administran las dosis más altas de estradiol, progesterona o ambos en situaciones donde las dosis más bajas devolvían la actividad de los enzimas a los niveles de los controles tras haber sido modificadas por la ovariectomía.

El sistema renina angiotensina está implicado en el control de la presión sanguínea así como en la homeostasis de fluidos y electrolitos. Además del sistema renina angiotensina sistémico, se ha descrito, utilizando distintos tipos de anticuerpos, la existencia de diferentes sistemas renina-angiotensina tisulares o locales en el cerebro, la hipófisis y las glándulas adrenales en diferentes especies de mamíferos (Kon, 1996; Vila Porcile y Corvol, 1998; Deschepper *et al.*, 1986; Mulrow, 1993). Estos sistema renina angiotensina locales están implicados respectivamente en la regulación central del sistema cardiovascular así como en el equilibrio hídrico del cuerpo, en la secreción de hormonas de la hipófisis (Wright *et al.*, 1995) y en la secreción de aldosterona de las glándulas adrenales (Volpe *et al.*, 1997).

Aunque clásicamente, la Ang II se ha considerado como el péptido efector del sistema renina angiotensina, éste no es el único péptido activo. Numerosos productos de su degradación, incluyendo la Ang III y la Ang IV también poseen actividad biológica. Estos péptidos se obtienen debido a la acción de diversas aminopeptidasas (Chansel y Ardaillou, 1998). Así, la Ang III es obtenida por escisión del residuo Asp en la posición N-terminal por la GluAP y la AspAP. Estos enzimas han sido denominados conjuntamente como AP A o angiotensinasa. La Ang III a su vez, es convertida en Ang IV por la ArgAP, AlaAP y LeuAP (denominadas también como APB y APM respectivamente) (Barret y Rawlings, 1998; Ward *et al.*, 1990). La Ang III tiene la mayoría de las propiedades de la Ang II y afinidad por sus mismos receptores. Este péptido es particularmente importante a nivel cerebral y desempeña un papel crucial en la fisiología de la hipófisis ya que participa activamente en la secreción de arginina-vasopresina (Ardaillou, 1997), implicada también en la regulación de la presión sanguínea (Szczepanska-Sadowska, 1996). La CysAP se ha descrito como el enzima encargado de metabolizar a la arginina-vasopresina.

Por tanto, se puede afirmar que tanto las aminopeptidasas A, B y M como la CysAP desempeñan un papel muy importante en la regulación de las angiotensinas y de la arginina-vasopresina. Además, puesto que es bien conocido que el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal está implicado en la regulación de la presión sanguínea y además se ve afectado por las hormonas sexuales, es importante poner de manifiesto las alteraciones que los esteroides sexuales podrían provocar en los distintos niveles del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales. Dentro de este contexto, hay que indicar que el mantenimiento de la función cardiovascular y la homeostasis de fluidos requiere de la participación de mecanismos que regulen la cantidad total de agua y sodio en el cuerpo así como su apropiada distribución y compartimentalización regional. Pues bien, la mayoría de estos mecanismos son mediados por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, aunque ha sido solo en los últimos años cuando se ha admitido definitivamente que la hiperactividad de este eje incrementa la presión sanguínea. Así, se ha comprobado que la acción de determinados

factores de liberación hipotalámicos, destacando el factor liberador de corticotropina y la arginina-vasopresina del núcleo paraventricular, provoca un marcado incremento en la liberación de adrenocorticotropina (ACTH) en la hipófisis anterior (Whitnall, 1993). Esta hormona a su vez provoca la liberación de glucocorticoides (y probablemente de aldosterona) (Lumbers, 1999) desde la corteza adrenal hasta la circulación, incrementándose de este modo la presión sanguínea (Kelly *et al.*, 1998). En este mismo sentido se ha descrito que este efecto hipertensor de la ACTH se puede mimetizar por administración intravenosa u oral de glucocorticoides, siendo la respuesta dosis dependiente (Kelly *et al.*, 1998; 2001; Whitworth *et al.*, 1997; 2000).

Por otro lado, también está bien establecida la influencia de los esteroides sexuales sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, además, estos efectos se producen a todos los niveles del eje. Así, se ha descrito la acción de los esteroides sexuales sobre los receptores de glucocorticoides de tipo I y II tanto a nivel del hipocampo como del hipotálamo (Turner y Weaver, 1985; Carey *et al.*, 1995; MacLusky *et al.*, 1996), sobre la expresión de factor liberador de corticotropina y arginina vasopresina en el hipotálamo (Vamvakopoulos y Chrousos, 1993; Paulmyer-Lacroix *et al.*, 1996; Viau y Meaney, 1996), sobre la secreción de ACTH por la hipófisis anterior (Gallucci *et al.*, 1993) así como en el tamaño y potencial esteroidogénico de las glándulas adrenales (Kitay, 1961; Gaskin y Kitay, 1970; Roelfsma *et al.*, 1993; El-Migdadi *et al.*, 1995). Además se piensa que estos efectos de los esteroides sexuales sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal se debe a la modificación de numerosas proteínas que participan en la regulación del propio eje a diferentes niveles (Hirts *et al.*, 1992; Herbison, 1995; Bethea *et al.*, 1996; Madigou *et al.*, 1996).

Estos efectos de los esteroides sexuales sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales podría explicar las diferencias sexuales en la presión sanguínea descritas en individuos hipertensos tanto humanos como en modelos animales de hipertensión (fundamentalmente en rata).

En humanos, el sexo, tiene una gran influencia sobre la presión sanguínea; así, se ha descrito, utilizando técnicas de monitorización ambulatoria de la presión arterial durante 24 horas, que las mujeres premenopáusicas presentan valores de presión arterial menores que los hombres de las mismas edades. Además, las mujeres postmenopáusicas tienen valores de presión arterial mayores que las premenopáusicas (Khoury *et al.*, 1992; Wiinberg *et al.*, 1995; Reckelhoff *et al.*, 1998), por tanto, estos datos sugieren que las hormonas ováricas (estradiol y/o progesterona) podrían participar en la modulación de la presión sanguínea. Diferentes estudios (Weiss, 1972; Staessen *et al.*, 1989; 1997) han mostrado un incremento significativo de las presiones sistólica y diastólica tras la menopausia. Staessen y colaboradores (1989) han descrito que la incidencia de la hipertensión en mujeres postmenopáusicas es cuatro veces superior a la de mujeres premenopáusicas. En una evaluación convencional y ambulatoria de la presión sanguínea en mujeres premenopáusicas, perimenopáusicas y postmenopáusicas se observó como estas últimas presentaban una presión sistólica mayor que las mujeres premenopáusicas y perimenopáusicas (Staessen *et al.*, 1997). Además, el incremento de la presión sistólica por

décadas fue de 5 mm de Hg más en las mujeres perimenopaúsicas y postmenopaúsicas que en las premenopaúsicas. Ya que la menopausia está asociada con un descenso en la síntesis de estradiol, es lógico suponer que los cambios observados en la presión sanguínea durante este estadio pueden ser en parte debidos a una disminución en la producción de estradiol. Esta hipótesis de que el estradiol actúa disminuyendo la presión sanguínea en mujeres es apoyada por el hecho de que durante el ciclo menstrual la presión sanguínea es menor durante la fase luteínica (cuando existe un pico de estradiol) que durante la fase folicular (Dunne *et al.*, 1991; Karpanou *et al.*, 1993; Chapman *et al.*, 1997).

Otras observaciones llevadas a cabo durante el embarazo aportan información adicional sobre los efectos hipotensores del estradiol. Así, durante el embarazo, la concentración de estradiol se incrementa considerablemente (Kletzky *et al.*, 1980). Sin embargo, los periodos de mínima presión sanguínea y máxima concentración de estradiol no coinciden totalmente. Así, en los tres trimestres del embarazo el estradiol se incrementa 8, 15 y 186 veces respectivamente (Kletzky *et al.*, 1980). Sin embargo, la presión sanguínea es menor en el primer y segundo trimestre y se incrementa en el tercer trimestre (Siamopoulos *et al.*, 1996). Estos datos sugieren que otros factores además del estradiol modulan la presión sanguínea durante el embarazo (August *et al.*, 1990) y otras hormonas y/o moduladores locales generados durante el embarazo anulan los efectos hipotensores del estradiol en el tercer trimestre de gestación.

Partiendo de estos datos y considerando que el estradiol endógeno disminuye la presión sanguínea, era predecible que la administración de preparados estrogénicos tuviera un efecto similar. Sin embargo, los resultados obtenidos de los estudios con estos preparados sobre la presión sanguínea son incluso contradictorios. Algunos autores describen un descenso de la presión sanguínea tras su administración (Butkevich *et al.*, 2000; Mercuro *et al.*, 1997; 1998; van Itersum *et al.*, 1998; Regensteiner *et al.*, 1991; Cacciatori *et al.*, 2001; Szekacs *et al.*, 2000; Pripp *et al.*, 1999; Sorensen *et al.*, 2000; Manwaring *et al.*, 2000; Cagnacci *et al.*, 1999; Akkad *et al.*, 1997; Seely *et al.*, 1999; Manhem *et al.*, 1998; Lind *et al.*, 1979; Elias *et al.*, 1992). Otros encuentran incrementos de presión (Crane *et al.*, 1971; Notelovitz, 1975; Utian, 1978; Pfeffer, 1977; Grane y Harris, 1978; Wren y Routledge, 1981). Finalmente un tercer grupo muestra efectos neutros (Lip *et al.*, 1994; Schunkert *et al.*, 1997).

Efectos similares a los descritos en humanos se han encontrado también en animales. En ratas, los machos presentan presiones sanguíneas mayores que las de las hembras (Masubuchi *et al.*, 1982; Rowland y Fregly, 1992; Cheu y Meng, 1991; Ashton y Balment, 1991). Así, p.ej. en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), los machos presentan valores de presión arterial mayores que las hembras de la misma edad (Masabuchi *et al.*, 1982; Kumai, 1991). Aunque el/los mecanismo(s) responsables de que la presión sanguínea sea mayor en machos que en hembras no se conocen bien, en ratas los andrógenos provocan hipertensión. Del mismo modo, el estradiol disminuye la presión sanguínea en algunos modelos animales de hipertensión, como es el caso

de ratas SHR (Cambotti *et al.*, 1984), Dahl (Sasaki *et al.*, 2000) o incluso con hipertensión pulmonar (Farhat *et al.*, 1993; Resta *et al.*, 2001).

También se han estudiado los efectos de la progesterona y sus derivados sintéticos sobre la presión sanguínea. Tanto en humanos como en animales se ha comprobado que la progesterona tiene un efecto neutro o depresor sobre la presión sanguínea. Así, por ejemplo, se ha descrito que los descensos de presión sanguínea observados durante la gestación correlacionan positivamente con incrementos en los niveles de progesterona (Kristiansson y Wang, 2001). Además, la administración de progesterona natural a pacientes hipertensos disminuye de un modo significativo la presión sanguínea tanto en hombres como en mujeres postmenopáusicas (Rylance *et al.*, 1985). Por el contrario, la administración oral de 200 mg de progesterona a mujeres tras el climaterio no produce efecto alguno sobre la presión sanguínea (Tapanainen *et al.*, 1989). En animales, concretamente en ratas, la administración de progesterona tampoco modificó los niveles de presión sanguínea (Barbagallo *et al.*, 2001). El uso de progestágenos sintéticos como anticonceptivos o en terapia hormonal tiene un efecto hipertensor (Rosenthal y Oparil, 2000) debido en líneas generales a una retención de Na⁺.

En cuanto a los efectos de los andrógenos sobre la presión sanguínea y las enfermedades cardiovasculares existen algunos datos que pueden considerarse incluso contradictorios. Así, en algunos trabajos se sugiere la existencia de niveles bajos de testosterona (Phillips *et al.*, 1993; Jaffe *et al.*, 1996; Hughes *et al.*, 1989) y androstenediona (Hughes *et al.*, 1989) circulantes en hombres hipertensos. Del mismo modo, también se han descrito niveles bajos de testosterona circulante en hombres con alteraciones en las arterias coronarias (Phillips *et al.*, 1994) o infarto de miocardio (Kalin y Zumhoff, 1990). Por tanto, estos estudios sugerirían que los niveles bajos de andrógenos están asociados a las citadas patologías. Sin embargo, los niveles bajos de testosterona observados en los anteriores trabajos podrían ser reflejo del estrés. De hecho, los niveles de testosterona disminuyen en respuesta al estrés inducido por infarto, cirugía, quemaduras, hipoxia, falta de sueño o incluso por causas psicológicas (Kalin y Zumhoff, 1990), por tanto los descensos de testosterona descritos anteriormente no son indicativos del efecto hipotensor y protector de la testosterona sobre el sistema cardiovascular. Existen otras observaciones que apoyan estas conclusiones, así, hombres con déficits de testosterona tras una orquidectomía presentan un riesgo débil de padecer enfermedades cardiovasculares (Kalin y Zumhoff, 1990) y por el contrario mujeres sometidas a un tratamiento crónico con anavulatorios y presentando hipertestosteronemia presentan un riesgo elevado para este tipo de enfermedades, por tanto, se puede sugerir que los niveles bajos de testosterona pueden actuar como protectores del sistema cardiovascular.

Estos datos han sido corroborados por los resultados obtenidos en diferentes estudios con animales en los que se ha sugerido que la testosterona es una hormona que favorece la hipertensión.

La presión sanguínea es mayor en machos de diferentes modelos animales de hipertensión (SHR, Dahl, ratas genéticamente hipertensas) que en hembras (Masubuchi *et al.*, 1982; Ouchi *et al.*, 1987; Cheng y Meng, 1991; Ashton y Balment, 1991; Rowland y Fregly, 1992; Crofton *et al.*, 1993; Reckelhoff *et al.*, 1998; 2000). La asociación entre testosterona e incrementos de presión sanguínea se ve apoyada por el hecho de que la castración en edades jóvenes (3-5 semanas) atenúa el desarrollo de la hipertensión en ratas SHR y Dahl (Iams y Wexler, 1977; Masubuchi *et al.*, 1982; Ganten *et al.*, 1989; Cheng y Meng, 1991; Reckelhoff *et al.*, 1998; 2000). Además, el tratamiento con testosterona en ratas gonadectomizadas normales incrementa la presión sanguínea hasta niveles similares a los observados en machos intactos y en hembras SHR ovariectomizadas (Chen y Meng, 1991; Reckelhoff *et al.*, 1998).

Se han propuesto un número elevado de mecanismos responsables del incremento de presión arterial ocasionado por la testosterona entre los que se ha destacado la alteración de numerosos factores hormonales (Kumai *et al.*, 1994; 1995).

Como se ha citado anteriormente, estudios recientes empleando la técnica de monitorización ambulatoria de la presión sanguínea durante 24 horas también han confirmado que en humanos la presión sanguínea es mayor en hombres que en mujeres premenopáusicas de edades similares. De hecho, aunque el mecanismo o los mecanismos responsables de esta mayor presión sanguínea en hombre que en mujeres no están claros, en ratas, los andrógenos se han presentado como promotores de la hipertensión, teniendo en cuenta que la orquidectomía en machos SHR disminuyen la presión sanguínea, pero la ovariectomía no afecta al desarrollo de la hipertensión en estas ratas (Reckelhoff *et al.*, 2000) por lo que se ha sugerido que los efectos del estradiol sobre la presión sanguínea son más farmacológicos que fisiológicos. Por otro lado, el tratamiento crónico de ratas SHR ovariectomizadas con testosterona incrementan la presión sanguínea (Masubuchi *et al.*, 1982). Estos datos sugieren que no son los estrógenos los que protegen a las hembras SHR de desarrollo de la hipertensión sino la ausencia de andrógenos. En humanos, la relación entre andrógenos y presión sanguínea se ha fortalecido mediante la utilización de estudios de monitorización de la presión sanguínea en niños. Estos estudios han demostrado que los varones presentaban presiones sanguíneas mayores que las niñas de la misma edad y también han puesto de manifiesto que en la pubertad existe un marcado incremento de la presión sanguínea tanto en hombres como en mujeres (Ouchi *et al.*, 1987; Bachmann *et al.*, 1987).

En modelos animales, se ha descrito que la elevación de la presión sanguínea encontrada en todos los sexos de SHR es disminuida por tratamientos con enalapril (un inhibidor del enzima convertidor de angiotensina) implicando de este modo al sistema renina angiotensina en el desarrollo de la hipertensión en ratas SHR independientemente del sexo. Además, también ha sido muy importante, el hallazgo de que la presión sanguínea elevada en machos SHR y hembras SHR ovariectomizadas tratadas con testosterona volvía a la normalidad tras el tratamiento crónico con enalapril, por tanto, se podría implicar al sistema renina angiotensina en la

hipertensión mediada por hormonas sexuales (Reckelhoff *et al.*, 1999). De hecho, es conocido que el estradiol regula la expresión del enzima convertidor de angiotensina tanto en el suero como en los vasos sanguíneos (Hassager *et al.*, 1987; Proudler *et al.*, 1995; Schunkert *et al.*, 1997; Gallagher *et al.*, 1999) y disminuye la liberación de renina así como la formación de Ang II (Schunkert *et al.*, 1997), y la expresión de sus receptores tipo I (Nickenig *et al.*, 1998).

También se ha demostrado que los niveles del RNA mensajero del angiotensinógeno renal en ratas normotensas se ve afectado por el sexo, siendo los niveles de RNAm mayores en machos que en hembras (Guyton *et al.*, 1972; Kaufman *et al.*, 1998). La gonadectomía disminuye, mientras que el tratamiento con testosterona de ratas hembras ovariectomizadas incrementa los niveles de este RNAm (Guyton *et al.*, 1972; Kaufman *et al.*, 1998).

La administración de estrógenos a ratas ovariectomizadas también ha puesto de manifiesto una disminución en la actividad del enzima convertidor de angiotensina y en su ARN mensajero (Hall *et al.*, 1990).

En humanos también se han llevado a cabo estudios en los que se demuestra la influencia de las hormonas sexuales sobre el sistema renina-angiotensina. Así, p.ej. la actividad de la renina plasmática es mayor en hombres que en mujeres considerando siempre grupos de la misma edad (Reckelhoff *et al.*, 1997; Ely *et al.*, 1991). Del mismo modo, la actividad de la renina plasmática es mayor en mujeres postmenopáusicas que en mujeres premenopáusicas o postmenopáusicas sometidas a un tratamiento hormonal (Marks *et al.*, 1999). En estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio se han evaluado diferentes aminopeptidasas en suero de hombres y mujeres a lo largo de la edad. Así, en el caso de la GluAP, se observó un incremento progresivo de la actividad desde edades tempranas hasta edades avanzadas, tanto en hombres como en mujeres. Sin embargo, la AspAP presentó un comportamiento diferente, no se modifica en hombres y en la mujer, tras un descenso en edades posteriores a la menopausia, aparece un marcado incremento en edades avanzadas. Los estudios de correlación de la actividad enzimática con la edad del individuo muestra una correlación positiva significativa en hombres y mujeres para la GluAP pero no para la AspAP. Estos resultados sugieren la existencia de diferencias sexuales además de las relacionadas con la edad en dichas actividades aminopeptidasas en sueros humanos. Es interesante recordar que la presión sanguínea se incrementa progresivamente en hombres y mujeres, pero sin embargo, la renina y angiotensina II disminuyen paulatinamente con la edad del individuo.

En cualquier caso, se conoce poco de la influencia de las hormonas esteroideas sobre la actividad aminopeptidasa. Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado la influencia de la gonadectomía así como el efecto in vitro de diferentes hormonas sexuales sobre diversas actividades aminopeptidasas. Concretamente, las actividades APM y B fueron medidas en el suero de ratones machos y hembras gonadectomizados. Nuestros resultados

mostraron importantes diferencias sexuales así como una influencia directa de las hormonas esteroideas sobre diferentes actividades aminopeptidasas. Estas enzimas responden de un modo diferente a la gonadectomía y a la presencia en el medio de incubación de diferentes hormonas dependiendo de su naturaleza (Martínez *et al.*, 1998).

En relación con los diferentes niveles del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, es bien conocido que algunos núcleos hipotalámicos están implicados en la regulación neuroendocrina por medio de la acción del sistema renina-angiotensina. De hecho, la administración *in vivo* de Ang II parece actuar estimulando la secreción de factor liberador de corticotropina (Ganong y Murakami, 1987). Además, la Ang III es como ya se ha comentado anteriormente uno de los principales péptidos del sistema renina-angiotensina implicado en el control de la liberación de arginina-vasopresina, otra hormona implicada en el control de la presión sanguínea (Zini *et al.*, 1996; 1998).

Considerando estos datos, nuestros resultados podrían indicarnos que en ausencia de andrógenos, la Ang II es convertida en Ang III por la APA más rápidamente en el hipotálamo. Además, la transformación de Ang III a Ang IV por la acción de la APB y APM también se encuentra favorecido. Aunque la Ang IV se ha implicado principalmente en los mecanismos de memoria así como en los procesos cognitivos y en la integración sensorial y motora (Wright *et al.*, 1995) también se ha descrito que actúa de una forma opuesta a la Ang II en el control del flujo sanguíneo tisular a nivel local, regulando en cierto modo las funciones de la Ang II y Ang III (Swanson *et al.*, 1992). De acuerdo con estos resultados, las funciones de la Ang II y Ang III podrían estar disminuidas y la liberación de factor liberador de corticotropina así como de arginina-vasopresina en el hipotálamo bloqueada. De hecho, Haas y George (1988) describieron que la orquidectomía disminuye el contenido de factor liberador de corticotropina en el hipotálamo. Además, algunos estudios sugieren que los efectos de los andrógenos en el sistema nervioso central para aumentar la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales son en parte secundarios a la interacción con los mecanismos de feed back negativo de los corticosteroides.

En machos, la orquidectomía incrementa la respuesta de ACTH, mientras que un tratamiento con andrógenos disminuye dicha respuesta (Handa *et al.*, 1994). Por otro lado, el tratamiento con testosterona en animales orquidectomizados parece disminuir los niveles de arginina-vasopresina en la eminencia media (Viau y Meaney, 1996). Estudios más recientes han sugerido que el efecto primario de la testosterona es disminuir los ARNm de la arginina-vasopresina más que los de factor liberador de corticotropina (Viau *et al.*, 1999). Este efecto sobre los mensajeros de la arginina-vasopresina se ha observado como una interacción con los esteroides adrenales (Viau *et al.*, 1999). Tomados juntos, los resultados sugieren que los andrógenos interactúan con los esteroides adrenales en la regulación de la síntesis de arginina-vasopresina en el hipotálamo. Estos resultados también podrían indicar que el lugar de acción de las hormonas esteroideas es el hipotálamo más que la hipófisis.

En el sistema renina-angiotensina hipofisario, la Ang II estimula de un modo paracrino la secreción de adrenocorticotropina (Ganong, 1989). Nuestros resultados podrían poner de manifiesto que la falta de andrógenos no modifica la actividad AP A pero favorece la conversión de Ang III en Ang IV más rápidamente, manteniéndose los niveles de Ang II, los cuales podrían ser también regulados por la Ang IV, ayudando de este modo a mantener niveles bajos de ACTH. En este sentido Leswieswska y colaboradores (1990) han descrito que la orquidectomía disminuye los niveles de ACTH hipofisarios en las ratas. Estos datos podrían sugerir la existencia de niveles menores de glucocorticoides en machos orquidectomizados.

A nivel adrenal, existen algunas dudas de si tanto el sistema renina-angiotensina circulante como el sistema renina-angiotensina intra-adrenal pueden estimular la secreción de aldosterona, siendo la Ang II el principal péptido implicado en la regulación de dicha secreción en animales adultos (Lumbers, 1999).

Nuestros resultados muestran el mismo patrón de actividad para las AP implicadas en la regulación del sistema renina-angiotensina hipotalámico. Por tanto, la Ang II podría convertirse en Ang III por la AP A rápidamente, para posteriormente convertirse también con rapidez en Ang IV por la acción de la AP B y M, la cual podría ser responsable de los bajos niveles de aldosterona.

En cualquier caso, pueden existir otras funciones del sistema renina-angiotensina intra-adrenal además de los efectos directos sobre la producción de aldosterona que también estén implicados en la regulación del flujo sanguíneo adrenal. Por tanto, se puede concluir que los incrementos en la presión sanguínea debidos a la testosterona pueden ser mediados por cambios en las actividades de las aminopeptidasas implicadas en la regulación del sistema renina-angiotensina a diferentes niveles del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales.

2.2. Sobre la actividad TyrAP (encefalinas).

Una segunda observación importante de la presente Tesis Doctoral es la influencia de los esteroides sexuales sobre la actividad TyrAP o encefalinasa, implicada en la degradación de las encefalinas, en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales de ratones machos y hembras.

En el caso de los machos, observamos como la orquidectomía solo modifica la actividad TyrAP, tanto soluble como de membrana, a nivel de las glándulas adrenales. La administración de testosterona a los animales orquidectomizados hace que esta actividad vuelva a sus niveles controles. No obstante, hay que apuntar que la administración de testosterona provoca cambios en la actividad TyrAP soluble en el hipotálamo y TyrAP soluble y de membrana en la hipófisis, en condiciones en las que la orquidectomía no provocaba alteración de estas actividades. Nuevamente debemos sugerir la posibilidad de que los resultados obtenidos sean la consecuencia

de un efecto farmacológico más que un efecto fisiológico. En cualquier caso, también pueden ser la consecuencia de un efecto indirecto de la testosterona, que altere otros sistemas neurotransmisores/neuromoduladores que influyan en la actividad encefalinas a nivel hipotalámico e hipofisiario.

En el caso de las hembras, por el contrario, la ovariectomía incrementa los niveles de TyrAP soluble y de membrana en el hipotálamo y la actividad TyrAP de membrana en la hipófisis, no provocando ninguna alteración en esta actividad enzimática a nivel de las glándulas adrenales. Del mismo modo, la administración de estradiol retorna los niveles de TyrAP soluble y de membrana a sus niveles controles, si bien las dosis más altas de estradiol tienen un efecto activador sobre la actividad TyrAP de membrana hipotalámica. Por lo que respecta a la progesterona, esta devuelve a sus niveles control los valores de actividad TyrAP de membrana en el hipotálamo, pero no los de TyrAP soluble, que incluso se incrementan tras la administración de esta hormona. Cuando se administra conjuntamente estradiol y progesterona, se vuelven a obtener unos niveles semejantes a los controles tanto para la actividad TyrAP soluble como de membrana. En la hipófisis, la administración de progesterona incrementa la actividad TyrAP soluble, efecto que no aparece cuando se administra conjuntamente estradiol y progesterona. En el caso de la actividad TyrAP de membrana en la hipófisis, la administración de estradiol retorna los valores a unos niveles control, si bien la administración de progesterona tiene efectos diferentes dependiendo de la concentración utilizada. En cualquier caso, estos efectos se ven anulados cuando se administran conjuntamente estradiol y progesterona. En las glándulas adrenales, a pesar de que no se aprecian diferencias como consecuencia de la ovariectomía, la administración de estradiol, progesterona o estradiol más progesterona, disminuye significativamente la actividad TyrAP soluble, mientras que la actividad TyrAP de membrana no se ve modificada en ningún caso. Como se ha comentado para los machos, es posible que las alteraciones de la actividad TyrAP tras la administración de hormonas sea un efecto farmacológico y/o el efecto indirecto sobre otros sistemas neurotransmisores/neuromoduladores. Este hecho destaca particularmente para los casos en los que la administración de estradiol más progesterona tiene un efecto diferencial al provocado por la administración de cada hormona por separado.

Numerosos estudios apoyan la idea de que los péptidos opiáceos endógenos contribuyen en gran medida en la mediación, modulación y regulación de la respuesta al estrés a través del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales (Drolet *et al.*, 2001). En este sentido, se ha implicado a las encefalinas en un amplio rango de procesos fisiológicos, entre los cuales los mejores documentados son los relacionados con el comportamiento, la neuroendocrinología y la transmisión del dolor (Hertz, 1993). Actualmente se asume que las encefalinas son hidrolizadas por enzimas específicos, cuya actividad provoca su inactivación. Hasta la fecha, la mayor información sobre la degradación de las encefalinas se refiere al tejido nervioso. En este, hay dos rutas enzimáticas importantes que se encargan de la degradación de las encefalinas (Hersch,

1982). En la primera ruta, tiene lugar la rotura del enlace glicina-fenilalanina por un enzima de membrana denominado nefrilisina (Roques *et al.*, 1993), mientras que en la segunda ruta, tiene lugar la rotura del enlace aminoterminal entre tirosina y glicina por la TyrAP (Fernández *et al.*, 2002). Como hemos descrito para otras actividades, trabajos previos habían sugerido la influencia de los esteroides sexuales sobre ciertas actividades aminopeptidasas (Martínez *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 1998), sugiriendo la posibilidad de que estas sustancias ayuden a crear un ambiente hormonal que regule, al menos en parte, la actividad de estos enzimas. Como hemos indicado en varias ocasiones, el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal está sujeto a influencias gonadales, como se ha demostrado por las diferencias sexuales en la función del eje en condiciones basales y estresantes, o por las neuropatologías asociadas con la disfunción del eje (Canny *et al.*, 1999; Viau 2002). Se piensa que las diferencias observadas entre machos y hembras reflejan efectos diferentes de los esteroides sexuales en el eje. De hecho, la actividad de muchas proteínas que regulan el eje está directamente regulada por los esteroides, y hay receptores para esteroides sexuales a muchos niveles del eje (Hirst *et al.*, 1992; Herbinson, 1995; Bethea *et al.*, 1996; Madigou *et al.*, 1996). En la presente Tesis Doctoral, también hemos analizado la actividad TyrAP soluble y unida a membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en ratones macho y hembra gonadectomizados y tras la administración de testosterona, estradiol, progesterona o estradiol más progesterona, para discriminar la influencia del estado hormonal sobre estas actividades enzimáticas, y con ello, sobre las funciones reguladoras de sus correspondientes sustratos endógenos, mostrando cómo existen diferencias sexuales a distintos niveles del eje.

Los esteroides gonadales están implicados de forma crítica en diversos aspectos funcionales del cerebro, incluyendo su desarrollo, con un considerable interés en su papel sobre el control del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales. En los últimos años se han acumulado datos que demuestran que la respuesta neuroendocrina al estrés muestra profundas diferencias específicas para cada sexo, siendo la manifestación de cada una de ellas dependiente de la presencia de esteroides gonadales (Viau y Meaney, 1991; Burgess y Handa, 1992). Los esteroides sexuales, aparentemente, muestran un efecto “organizador” y “activador” en diversos mecanismos neuronales que controlan la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, bien bajo condiciones basales o bien en condiciones relacionadas con el estrés (Patchev y Almeida, 1996). El sistema de los péptidos opioides participa en la mediación, modulación y regulación de la respuesta al estrés a través del eje (Drolet *et al.*, 2001).

La metionina encefalina liberada de la médula adrenal en respuesta al estrés, modula la antinocepción que acompaña al estrés. Anticuerpos específicos contra la metionina-encefalina disminuyen parcialmente la analgesia inducida por electroacupuntura tanto a nivel del cerebro medio como a nivel de la médula espinal (Han y Terenius, 1982). Un análogo de la encefalina denominado FK 33-824, tiene una potente actividad analgésica frente al dolor experimental en humanos, actuando a través de los receptores de tipo μ (Roby *et al.*, 1983).

Otras evidencias han aparecido para conectar los mecanismos de acción de algunas drogas antidepresivas con la inhibición de los enzimas responsables de la degradación de las encefalinas (Gallego *et al.*, 1998). Algunos inhibidores de la TyrAP tienen efectos antidepresivos (De Felipe *et al.*, 1986; Tejedor-Real *et al.*, 1995), y algunas drogas antidepresivas incrementan los niveles de encefalinas (De Felipe *et al.*, 1985). De hecho, parece ser que el incremento en los niveles de encefalinas en cerebro de rata provocados por las drogas antidepresivas podría deberse, al menos en parte, a la disminución de su degradación. Otros hallazgos sugieren que las hormonas sexuales pueden modular la antinocepción mediada por opioides, y que en particular, el estradiol puede modificar la magnitud de la respuesta a drogas tales como las anfetaminas y/o la morfina (Negus y Mello, 2002).

Las observaciones anteriormente descritas con respecto a la influencia de la testosterona en machos y el estradiol y/o la progesterona en hembras sobre la actividad TyrAP en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, y en especial en las glándulas adrenales en el caso de los machos y en el hipotálamo e hipófisis en el caso de las hembras, podrían indicar una regulación diferencial de la disponibilidad de sustratos endógenos, la cual podría ser responsable de la disminución de las funciones de las glándulas adrenales inducidas por los andrógenos o la activación de la función hipotálamo-hipofisiaria inducida por los estrógenos (McCormick *et al.*, 2002). Por tanto, las hormonas sexuales influyen la actividad TyrAP a distintos niveles del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, sugiriendo que la regulación de las funciones de péptidos tales como las encefalinas puede alterarse por el estado hormonal del individuo, modulando su función, lo que es interesante para diversos y/o futuros estudios sobre estrés, depresión o dolor.

2.3. Sobre la actividad pGluAP.

En tercer lugar, la presente Tesis Doctoral muestra la influencia de los esteroides sexuales sobre la actividad pGluAP, implicada en la degradación de la TRH, en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales de ratones machos y hembras.

En el caso de los machos, observamos como la orquidectomía modifica la actividad pGluAP soluble en el hipotálamo y las glándulas adrenales, y la pGluAP de membrana en las glándulas adrenales, no encontrándose modificaciones a nivel de la hipófisis. Por su lado, la administración de testosterona retorna la actividad a sus niveles controles, dependiendo su eficacia de la concentración administrada, ocurriendo incluso para algunas dosis una disminución de la actividad por debajo de los niveles controles.

Del mismo modo, y como ocurría con otras actividades enzimáticas, también observamos que la administración de las dosis más elevadas de testosterona a los animales orquidectomizados modifica algunas actividades que no se alteraban con la orquidectomía, en este caso a nivel de la pGluAP tanto soluble como de membrana hipofisiaria.. Esto se debe, probablemente, y como

venimos citando, a un efecto farmacológico más que a un efecto fisiológico. También puede ser la consecuencia de un efecto indirecto de la testosterona, que altere otros sistemas neurotransmisores/neuromoduladores que influyan en la actividad pGluAP a nivel hipofisiario.

En el caso de las hembras, por el contrario, la ovariectomía incrementa los niveles de pGluAP soluble y de membrana en el hipotálamo y la hipófisis, no provocando ninguna alteración en esta actividad enzimática a nivel de las glándulas adrenales. Del mismo modo, la administración de las dosis más bajas de estradiol, progesterona o estradiol más progesterona, retorna los niveles de pGluAP soluble y de membrana a sus niveles controles, si bien las dosis más altas de ambas hormonas, juntas o por separado, tienen un efecto activador sobre la actividad pGluAP soluble hipotalámica. En el caso de la pGluAP de membrana, es la administración de progesterona sola o conjuntamente con estradiol, la que provoca efectos diferenciales dependiendo de la concentración utilizada. En la hipófisis, la administración de las dosis más bajas de estradiol, progesterona o estradiol más progesterona retorna los niveles de actividad pGluAP tanto soluble como de membrana a sus niveles controles o por debajo de los controles en el caso de la progesterona para la pGluAP de membrana. No obstante, dosis más elevadas de estradiol o progesterona provocan incrementos de la actividad pGluAP tanto soluble como de membrana. En las glándulas adrenales, a pesar de que no se aprecian diferencias como consecuencia de la ovariectomía, la administración de las dosis más elevadas de estradiol o progesterona, incrementan la actividad pGluAP soluble, si bien la administración conjunta de estradiol más progesterona no provoca ningún efecto sobre esta actividad. Por lo que respecta a la actividad pGluAP de membrana en las glándulas adrenales, solamente la dosis más baja de progesterona modifica esta actividad. Hemos de indicar también en este caso la posibilidad de mostrar un efecto farmacológico más que fisiológico, para explicar estas alteraciones, así como el posible efecto indirecto por la actuación a través de otros mecanismos que finalmente alteren la actividad pGluAP.

Como venimos refiriendo en la presente Tesis Doctoral, el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales está sujeto a una influencia de los esteroides sexuales, como indican las diferencias sexuales encontradas tanto en las funciones basales del eje como en las funciones relacionadas con el estrés, así como por las neuropatologías asociadas a las disfunciones del eje (Canny *et al.*, 1999; Viau, 2002). Es lógico pensar, por tanto, que las diferencias observadas entre machos y hembras reflejen diferentes efectos de los esteroides sexuales sobre los distintos niveles del eje. De hecho, la actividad de muchas proteínas que participan en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, depende, a su vez, de una regulación por esteroides sexuales. Del mismo modo, los receptores para dichos esteroides sexuales están presentes a muy diferentes niveles a lo largo del eje (Hirst *et al.*, 1992; Herbison, 1995; Bethea *et al.*, 1996; Madigou *et al.*, 1996). Nuestros resultados demuestran que el estado hormonal tanto de machos como de hembras modifica las actividades pGluAP soluble y de membrana, a distintos niveles del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, con evidentes diferencias sexuales, y que estas alteraciones son la expresión

de los diferentes mecanismos de regulación de las funciones de los sustratos endógenos de estas actividades enzimáticas en estos niveles distintos del eje, que tienen lugar en ratones macho y hembra.

Hasta la fecha, se han descrito tres formas de pGluAP en los tejidos de mamífero. La primera, denominada pGluAP tipo I, se localiza a nivel citosólico (Mudge y Fellows, 1973; Browne y O'Cuinn, 1983; Lauffart *et al.*, 1989), y presenta una amplia especificidad de sustratos piroglutamilo-terminales. Se ha demostrado que este enzima rompe in vitro el residuo piroglutamilo del extremo N-terminal de un amplio rango de péptidos biológicamente activos, entre los que se encuentran la TRH, la TRH ácida, GnRH, neurotensina, bombesina y el péptido anorexogénico (Browne y O'Cuinn, 1983). El segundo tipo, la pGluAP tipo II, es un enzima de membrana, que, al contrario que la pGluAP de tipo I, muestra una especificidad de sustrato restringida casi exclusivamente a la unión piroglutamilo-histidina la TRH o de péptidos íntimamente relacionados (O'Connor y O'Cuinn, 1984; Elmore *et al.*, 1990; Kelly *et al.*, 2000). Una tercera actividad pGluAP, denominada tiroliberinasa, se ha descrito en el suero de varias especies de mamíferos. Este enzima muestra unas características bioquímicas muy similares a las de la pGluAP de tipo II, con una especificidad de sustrato restringida casi exclusivamente a la TRH o péptidos relacionados (Taylor y Dixon, 1978; Bauer y Novak, 1979; Bauer *et al.*, 1981; Bauer, 1994). De hecho, se ha propuesto que la tiroliberinasa sérica es la forma soluble de la pGluAP de tipo II (Yamada y Mori, 1990).

Como decíamos, nuestros resultados muestran la influencia de la gonadectomía y la administración de esteroides sexuales (testosterona en el caso de los machos o estradiol, progesterona y estradiol más progesterona en el caso de las hembras) sobre la actividad pGluAP soluble y de membrana en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratón. Handa y colaboradores han descrito la existencia de diferencias sexuales en la respuesta de diversas funciones del eje. Así, las hembras reaccionan de forma más robusta que los machos al estrés, y en ambos sexos, los productos del eje inhiben la función reproductora. Por lo tanto, las funciones del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales son, al menos en parte, debidas a las diferencias en los niveles circulantes de esteroides sexuales, presentando la testosterona un papel inhibitorio de las funciones del eje, mientras que los estrógenos presentan un papel potenciador (Handa *et al.*, 1994).

La biosíntesis hipotalámica de TRH está regulada por esteroides (Akinsanya *et al.*, 1995; Wilber y Xu, 1998; Pekary y Sattin, 2001). Muchos autores han observado una disminución significativa de la liberación in vitro de TRH a partir del hipotálamo tras la gonadectomía, que en el caso de los machos es cuantitativamente reversible tras la administración de testosterona (Pekary *et al.*, 1990; Rondeel *et al.*, 1995; Borges *et al.*, 1998; Pekary y Sattin, 2001). Nuestros resultados confirman estas observaciones porque la gonadectomía provoca un incremento de la actividad pGluAP que es anulado por la administración de hormonas sexuales, es decir, que un

mecanismo semejante implicaría a las hormonas sexuales femeninas a este nivel. No obstante, no hemos encontrado en machos este comportamiento en la pGluAP de membrana con la orquidectomía. Esto podría corroborar la función reguladora de la actividad pGluAP soluble sobre el procesamiento intracelular de la TRH a nivel citosólico. Además, se ha descrito que la testosterona estimula la liberación hipotalámica de TRH, provocando el agotamiento tanto de la propia TRH como de sus precursores en las neuronas productoras de TRH que proyectan a la eminencia media y la hipófisis (Pekary *et al.*, 1990; Rondeel *et al.*, 1995). Más aún, la hipófisis posterior está bajo un control estricto, positivo para las hormonas esteroideas y negativo para la TRH (Joseph-Bravo *et al.*, 1998). Esto podría explicar porqué ni la actividad pGluAP soluble ni la de membrana se modifican tras la orquidectomía en la hipófisis, pero la administración de testosterona modifica ambas actividades, o porqué, en el caso de las hembras, el control hormonal sería radicalmente opuesto.

Aunque la TRH es un péptido hipofisiotrópico que actúa principalmente a través del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, la inmunoreactividad a la TRH si que se detecta en una gran cantidad de tejidos periféricos, incluyendo las glándulas adrenales, donde la TRH parece tener actividad biológica (Montagne *et al.*, 1999). Se ha sugerido que la TRH inhibe la liberación de corticosterona in vitro (Mitsuma *et al.*, 1996). Nuestros resultados muestran que la orquidectomía, aunque no la ovariectomía, incrementa tanto la actividad pGluAP soluble como de membrana en las glándulas adrenales, lo que puede provocar la disminución de los niveles de TRH, y con ello, provocar la liberación de corticosterona. De hecho, se ha descrito que la orquidectomía incrementa la concentración de corticosterona en las glándulas adrenales (Malendowicz y Mlynarczyk, 1996). Del mismo modo, la administración de testosterona retorna la actividad pGluAP soluble y de membrana a los niveles control, y la administración de testosterona, también retorna los niveles de corticosterona a sus niveles control (Malendowicz y Mlynarczyk, 1996).

El conocimiento de la regulación de la TRH es importante porque en los desórdenes afectivos se han descrito profundas alteraciones tanto del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides como del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, especialmente a nivel de la hipófisis. Así, los pacientes con depresión presentan un marcado pico de TSH (Weeke y Weeke, 1980), una respuesta deficiente de la TSH a la TRH (Loosem, 1986) y una respuesta nocturna deficiente a los pulsos repetidos de TRH (Duval *et al.*, 1990). Diversos autores han sugerido también la existencia de una liberación insuficiente, bien cuantitativamente, bien en términos relativos, de TRH o péptidos relacionados, que puede jugar un papel patogénico en la depresión, probablemente interaccionando con funciones diversas reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. De hecho, la administración de TRH tiene un rápido y profundo efecto antidepresivo (Marangell *et al.*, 1997; Pekary y Sattin, 2001; Peteranderl *et al.*, 2002). Por lo tanto, las hormonas esteroideas pueden influenciar los desórdenes afectivos así como a otras funciones cognitivas superiores, donde es bien conocido el papel de la TRH, como son la percepción del dolor, la actividad

locomotora o la destreza (Heuer *et al.*, 2000). Podemos concluir, por tanto, que el estado hormonal en ratones macho y hembra influye en las actividades pGluAP soluble y de membrana a distintos niveles del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, y que de este modo, la regulación del metabolismo de sus sustratos endógenos, como la TRH, se ven afectados por los niveles circulantes de hormonas sexuales.

VI. CONCLUSIONES.

- Primera:** El análisis de las actividades aminopeptidasas en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales de ratones macho y hembra es importante porque refleja el estado funcional de sus correspondientes sustratos endógenos, los cuales tienen importantes funciones como neurotransmisores/neuromoduladores en los distintos niveles del eje.
- Segunda:** Los esteroides sexuales regulan la actividad de diversas aminopeptidasas, y por tanto, de los sustratos endógenos sobre los que actúan, a distintos niveles del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales, siendo esta regulación diferente en ratones macho y hembra.
- Tercera:** Los esteroides sexuales participan en la regulación de las actividades aminopeptidasas implicadas en el sistema renina-angiotensina. En ratones macho, participan en la regulación de la actividad aminopeptidasa A, a nivel del hipotálamo en su fracción soluble, y de las glándulas adrenales, y de las aminopeptidasas M y B, en la fracción soluble de todos los niveles del eje, mientras que en ratones hembra, los esteroides sexuales regulan la actividad de la aminopeptidasa A en el hipotálamo, en su fracción soluble y de membrana, y glándulas adrenales, en su fracción de membrana, de la aminopeptidasa M, en la fracción de membrana del hipotálamo y glándulas adrenales, y de la aminopeptidasa B, en la fracción de membrana de hipotálamo y glándulas adrenales y en la fracción soluble de la hipófisis.
- Cuarta:** En ratones macho, los esteroides sexuales participan en la regulación de la actividad cisteína aminopeptidasa, implicada en la degradación de la vasopresina, a nivel de las glándulas adrenales, en su fracción soluble, mientras que en ratones hembra, los esteroides sexuales regulan dicha actividad a nivel del hipotálamo, en su fracción de membrana.
- Quinta:** En ratones macho, los esteroides sexuales participan en la regulación de la actividad tirosina aminopeptidasa, implicada en la degradación de las encefalinas, a nivel de las glándulas adrenales, mientras que en ratones hembra, los esteroides sexuales regulan dicha actividad a nivel del hipotálamo y la hipófisis, en su fracción de membrana.
- Sexta:** En ratones macho, los esteroides sexuales participan en la regulación de la actividad piroglutamato aminopeptidasa, implicada en la degradación de la TRH, a nivel del hipotálamo, en su fracción soluble, y las glándulas adrenales, mientras que en ratones hembra, los esteroides sexuales regulan dicha actividad a nivel del hipotálamo y la hipófisis.

Séptima: El papel regulador de las hormonas esteroideas sobre las actividades aminopeptidasas en los distintos niveles del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales, puede ser responsable, al menos en parte, de las diferencias sexuales descritas para las diversas funciones del eje, tanto en situaciones basales como en situaciones de estrés.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

Ackerman GE, Smith ME, Mendelson CR, MacDonald PC, Simpson ER. Aromatization of androstenedione by human adipose tissue stromal cells in monolayer culture. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981;53:412-417.

Adachi S, Masataka O. The regulation of oxytocin receptor expression in human myometrial monolayer culture. *J Smooth Muscle Res.* 1995;31:175-197.

Adashi EY. The ovarian follicular apparatus. En: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z (eds). *Reproductive endocrinology, surgery, and technology.* Philadelphia: Lippincott-Raven. 1996;7-40.

Advis JP, McCann SM, Negro-Vilar A. Evidence that catecholaminergic and peptidergic (luteinizing hormone-releasing hormone) neurons in suprachiasmatic-medial preoptic, medial basal hypothalamus and median eminence are involved in estrogen-negative feedback. *Endocrinology.* 1980;107:892-901.

Aguilera G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Frontier Neuroendocrinol.* 1994;15:321-350.

Akerlund M, Stromberg P, Hauksson A, Andersen LF, Lyndrup J, Trojnar J, Melin P. Inhibition of uterine contractions of premature labour with and oxytocin analogue. Results from a pilot study. *BJOG.* 1987;94:1040-1044.

Akinsanya KO, Ghatel MA, Bloom SR. Gonadal steroids regulate rat anterior pituitary levels of TSH-releasing hormone- and pyroglutamyl-glutamyl-proline amide-like immunoreactivity. *Endocrinology.* 1995;136:734-740.

Akinci MK, Johnston GA. Sex differences in the effects of gonadectomy and acute swim stress on GABAA receptor binding in mouse forebrain membranes. *Neurochem Int.* 1997;31:1-10.

Akkad AA, Halligan AWF, Abrams K, Al-Azzawi F. Differing responses in blood pressure over 24 hours in normotensive women receiving oral or transdermal estrogen replacement therapy. *Obstet Gynecol.* 1997;89:97-103.

Al-Baldawi NF, Stockand JD, Al-Khalili OK, Yue G, Eaton DC. Aldosterone induces ras methylation in AG epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279:C429-439.

Alexandrova M, Soloff MS. Oxytocin receptors and parturition. III. Increase in oestrogen receptor and oxytocin receptor concentration in the rat myometrium at term. *Endocrinology.* 1980;106:739-743.

Allen E, Doisy EA. An ovarian hormone: preliminary report on its localization, extraction, and partial purification and action in test animals. *JAMA.* 1923;81:819-821.

Alves SE, López V, McEwen BS, Weiland NG. Differential colocalization of estrogen receptor beta (ER beta) with oxytocin and vasopressin in the paraventricular and supraoptic nuclei of the female rat brain: an immunocytochemical study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:3281-3286.

Amory JK, Bremner W. Endocrine regulation of testicular function in men: implications for contraceptive development. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;186:205-209.

Amoss M, Burges R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemin R. Purification, amino acid composition and n-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone factor (LRF) of ovine origin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971;44:205-210.

Amsterdam A, Dantes A, Hosokawa K, Schere-Levy CP, Kotsuji F, Aharoni D. Steroid regulation during apoptosis of ovarian follicular cells. *Steroids*. 1998; 63:314-318.

Andersson B. Thirst and central control of water balance. *Am Sci*. 1971;59:408-415.

Ansos ML. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol*. 1938;22:79-89.

Antoni FA. Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes to age. *Front Neuroendocrinol*. 1993;14:76-122.

Antonićević IA, Douglas AJ, Dye S, Bicknell RJ, Leng G, Russell JA. Oxytocin antagonists delay the initiation of parturition and prolong its active phase in rats. *J Endocrinol*. 1995;145:97-103.

Ardailou R. Active fragments of Ang II: enzymatic pathways of synthesis and biological effects. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1997;6:8-34.

Ashton N, Balment RJ. Sexual dimorphism in renal function and hormonal status of New Zealand genetically hypertensive rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1991;124:91-97.

Auersperg N, Wong AST, Choi KC, Kang SK, Leung PCK. Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology. *Endocr Rev*. 2001;22:255-288.

Avrech OM, Golan A, Weinraub Z, Bukovsky I, Caspi E. Mifepristone (RU486) alone or in combination with a prostaglandin analogue for termination of early pregnancy: a review. *Fertil Steril*. 1991;56:385-393.

Ayres PJ, Gould RR, Simpson SA, Tait JF. The in vitro demonstration of differential corticosteroid production within the ox adrenal gland. *Biochem J*. 1956;63:19-.

Babcock AM, Block GJ, Micevych PE. Injections of cholecystokinin into the ventromedial hypothalamic nucleus inhibit lordosis behavior in the rat. *Physiol Behav*. 1988;43:195-199.

Bachmann H, Horacek U, Leowsky M, Hirche H. Blood pressure in children and adolescents aged 4 to 18: correlation of blood pressure values with age, sex, body height, body weight, and skinfold thickness. *Monatsschri Kinderheilkd*. 1987;135:128-134.

Badzyska B, Grzelec-Mojzesowicz M, Dobrowolski L, Sadowski J. Differential effect of angiotensin II on blood circulation in the renal medulla and cortex of anaesthetised rats. *J Physiol*. 2002; 538:159-166.

Bankir L. Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. *Cardiovasc Res*. 2001;51:372-390.

Barbagallo M, Dominguez LJ, Licata G, Shan J, Bing L, Karpinski E, Pang PKT, Resnick LM. Vascular effects of progesterone. Role of cellular calcium regulation. *Hypertension*. 2001;37:142-147.

Barberis C, Mouillac B, Durroux T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol*. 1998;156:223-229.

Barberis C, Seibold A, Ishido M, Rosenthal W, Birnbaumer M. Expression cloning of the human V₂ vasopressin receptor. *Reg Pept.* 1993;45:61-66.

Barbry P, Lazdunski M. Structure and regulation of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *Ion Channel.* 1996;4:115-167.

Barraclough CA. Sex differentiation of cyclic gonadotropin secretion. En: Kaye AM, Kaye M (eds). *Advances in the Biosciences.* Oxford: Pergamon Pres. 1979;433-450.

Barrett AJ, McDonald JK. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem J.* 1986;237:935.

Barrett AJ, Rawlings ND. Families and clans of serine peptidases. *Arch Biochem Biophys.* 1995;318:247-250.

Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. *Handbook of proteolytic enzymes.* London: Academic Press. 1998.

Basaria S, Dobs AS. Hypogonadism and androgen replacement therapy in elderly men. *Am J Med.* 2001;110:563-572.

Bassiri RM, Utiger RD. Thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamus of the rat. *Endocrinology.* 1974;94:188-197.

Bauer K. Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie.* 1988;70:69-74.

Bauer K. Purification and characterization of the thyrotropin-releasing -hormone-degrading ectoenzyme. *Eur J Biochem.* 1994;224:387-396.

Bauer K. Inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH). The TRH-degrading enzyme as a regulator and/or terminator of TRH signals?. En: O'Cuinn G (ed). *Metabolism of Brain Peptides.* Fla: Boca Raton, CRC Press. 1995;201-213.

Bauer K, Nowak P. Characterization of a thioliberin-degrading serum enzyme catalyzing the hydrolysis of thyroliberin at the pyroglutamyl-histidine bond. *Eur J Biochem.* 1979;99:239-346.

Bauer K, Nowak P, Kleinkauf H. Specificity of a serum peptidase hydrolysing thyroliberin at the pyroglutamyl-histidine bond. *Eur J Biochem.* 1981;118:173-176.

Bauer-Dantoin AC, Jameson JL. Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the ovary during the rat estrous cycle. *Endocrinology.* 1995;136:4432-4438.

Bauer-Dantoin AC, Weiss J, Jameson JL. Roles of estrogen, progesterone, and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the control of pituitary GnRH receptor gene expression at the time of the preovulatory gonadotropin surges. *Endocrinology.* 1995;136:1014-1019.

Beaulieu S, Di Paolo T, Cote J, Barden N. Participation of the central amygdaloid nucleus in the response of adrenocorticotropin secretion to immobilization stress: opposing roles of the noradrenergic and dopaminergic systems. *Neuroendocrinology.* 1987;45:37-46.

Becchetti A, Kemendy AE, Stockand JD, Sariban-Sohraby S, Eaton DC. Methylation increases the open probability of the epithelial sodium channel in A6 epithelia. *J Biol Chem.* 2000; 275:16550-16559.

Behal FJ, Klein RA, Dawson FB. Separation and characterization of aminopeptidase and arylamidase components of human liver. *Arch Biochem Biophys*. 1966;115:545-554.

Beitins IZ, Padmanabhan V. Bioactivity of gonadotropins. *Endocrinol Metab Clin N Amer*. 1991;20:85-120.

Bek MJ, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. Dopamine receptors in hypertension. *Mt Sinai J Med*. 2001;68:362-369.

Bennett LL. The long and Evans monograph on the oestrus cycle in the rat. *Endocrinology*. 1991;129:2812-2814.

Berga SL. Behaviorally induced reproductive compromise in women and men. *Semin Reprod Endocrinol*. 1997;15:47-53.

Bern HA, Pearson D, Larson BA, Nishioka RS. Neurohormones from fish tails: the caudal neurosecretory system. I. "Urophysiology" and the caudal neurosecretory system of fishes. *Rec Prog Horm Res*. 1985;41:533-552.

Besecke LM, Guendner MJ, Scheneyer AL, Bauer-Dantoin AC, Jameson JL, Weiss J. Gonadotropin-releasing hormone regulates follicle-stimulating hormone- β gene expression through an activin/follistatin autocrine or paracrine loop. *Endocrinology*. 1996;137:3667-3673.

Bethea CL, Brown NA, Kohama SG. Steroid regulation of estrogen and pregestin receptor messenger ribonucleic acid in monkey hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*. 1996;137:4372-4383.

Billig H, Furuta I, Hsueh AJW. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa apoptosis. *Endocrinology*. 1993;133:2204-2212.

Billig H, Furuta I, Hsueh AJW. Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology*. 1994;134:245-252.

Birnbaumer M. The V2 vasopressin receptor mutations and fluid homeostasis. *Cardiovasc Res*. 2001;51:409-415.

Bisset GW. Milk ejection. En: Knobil E, Sawyer WH (eds). *Handbook of physiology section 7. Endocrinology*. Washington, D.C.: Amer Physiol Soc. 1974.

Blair Bell W. The pituitary body. *Br Med J*. 1909;2:1609-1613.

Blake CA. Stimulation of pituitary prolactin and TSH release in lactating and proestrus rats. *Endocrinology*. 1974;94:503-508.

Blazer-Yost BL, Geheb M, Preston A, Handler JS, Cox M. Aldosterone-induced proteins in renal epithelia. *Biochim Biophys Acta*. 1982;719:158-161.

Bloch GJ, Dornan WA, Babcock AM, Gorski RA, Micevych PE. Effects of site-specific CNS microinjection of cholecystokinin on lordosis behavior in the male rat. *Physiol Behav*. 1989;46:725-730.

Bojanowska E, Juszczak LM, Guzek JW, Dabrowski R. The pineal and oxytocin synthesis. *J Physiol Pharmacol*. 1999;50:121-128.

- Boler J, Enzmann F, Folkers K, Bowers CY, Schally AV. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl- proline amide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1969;37:705-710.
- Bonavera JJ, Kalra PS, Kalra SP. L-arginine nitric oxide amplifies the magnitude and duration of the luteinizing hormone surge induced by estrogen. Involvement of neuropeptide Y. *Endocrinology.* 1996;137:1956-1962.
- Bonser J, Walker J, Purohit A, Reed MJ, Potter BV, Willis DS, Franks S, Mason HD. Human granulosa cells are a site of sulphatase activity and are able to utilize dehydroepiandrosterone sulphate as a precursor for oestradiol production. *J Endocrinol.* 2000;167:465-71.
- Boon WC, Coghlan JP, Curnow KM, McDougall JG. Aldosterone secretion. A molecular perspective. *TEM.* 1997;8:346-354.
- Booth RE, Johnson JP, Stockand JD. Aldosterone. *Adv Physiol Educ.* 2002;26:8-20.
- Borges PP, Curty FH, Pazos-Moura CC, Moura EG. Effect of testosterone propionate treatment on thyrotropin secretion of young and old rats in vitro. *Life Sci.* 1998;62:2035-2043.
- Borsook D, Hyman SE. Proenkephalin gene regulation in the neuroendocrine hypothalamus: a model of gene regulation in the CNS. *Am J Physiol.* 1995;269:E393-408.
- Bourque CW, Oliet SH, Richard D. Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol.* 1994;15:231-274.
- Boyd J, Mulrow PJ, Palmore WP, Silvo P. Importance of potassium in the regulation of aldosterone production. *Circ Res.* 1973;32:39-45.
- Brabant G, Prank K, Ranft U, Schuermeyer TH, Wagner TOF, Hauser H, Kummer B, Feistner H, Hesch RD, von zur Muhlen A. Physiological regulation of circadian and pulsative thyrotropin secretion in normal man and woman. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1990;70:403-409.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
- Brinkmann AO. Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;179:105-109.
- Brinkmann AO, Trapman J. Genetic analysis of androgen receptors in development and disease. *Adv Pharmacol.* 2000;47:317-341.
- Brinkmann AO, Faber PW, van Rooy HCJ, Kuiper GGJM, Ris C, Klaassen P, van der Korput JAGM, Voorhorst MM, van Laar JH, Mulder E, Trapman J. The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1989;34:307-310.
- Brochu M, Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J. In vivo regulation of enzymes controlling aldosterone synthesis in pregnant rats. *Endocr Res.* 1998;24:575-579.
- Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Receptor-mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. *Rec Prog Horm Res.* 1979;35:215-257.

Browne P, O’Cuinn G. An evaluation of the role of a pyroglutamate aminopeptidase, a post-proline cleaving enzyme and a post-proline dipeptidyl aminopeptidase, each purified from the soluble fraction of guinea-pig brain, in the degradation of thyroliberin in vitro. *Eur J Biochem.* 1983;137:75-87.

Bulun SE, Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M, Sebastian S. Estrogen Production and Metabolism in Endometriosis. *Ann NY Acad Sci.* 2002;955:75-85.

Burbach JP, Adan RA. The rat oxytocin gene. Physiological changes in expression of the hypothalamo-neurohypophyseal system and responsiveness of promoter activity. *Ann NY Acad Sci.* 1993;689:34-49.

Burger K, Fahrenholz F, Gimpl G. Non-genomic effects of progesterone on the signaling function of G protein-coupled receptors. *FEBS Lett.* 1999;464:25-29.

Burgess LH, Handa RJ. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology.* 1992;131:1261-1269.

Burgus R, Dunn TF, Desiderio D, Guillemin R. Molecular structure of the hypothalamic hypophysiotropic TRF factor of ovine origin: mass spectrometry demonstration of the PCA-His-Pro-NH₂ sequence. *Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 1969;269:1870-1873.

Burgus R, Dunn TF, Desiderio D, Ward DN, Vale W, Guillemin R. Characterization of ovine hypothalamic hypophysiotropic TSH-releasing factor. *Nature.* 1970;226:321-325.

Burns PD, Mendes JO Jr, Yemm RS, Clay CM, Nelson SE, Hayes SH, Silvia WJ. Cellular mechanisms by which oxytocin mediates ovine endometrial prostaglandin F_{2α} synthesis: role of G(i) proteins and mitogen-activated protein kinases. *Biol Reprod.* 2001;65:1150-1155.

Butkevich A, Abraham C, Phillips RA. Hormone replacement therapy and 24-hour blood pressure profile of postmenopausal women. *Am J Hypertens.* 2000;13:1039-1041.

Cacciatore B, Paakkari I, Hasselblatt R, Nieminen MS, Toivonen J, Tikkanen MI, Ylikorkala O. Randomized comparison between orally and transdermally administered replacement therapy regimens of long-term effects on 24-hour ambulatory blood pressure in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184:904-909.

Cagnacci A, Rovati L, Zanni A, Malmusi S, Facchinetti F, Volpe A. Physiological doses of estradiol decrease nocturnal blood pressure in normotensive postmenopausal women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1999;276:H1355-H1360.

Callard IP, Callard GV. The adrenal gland in reptilia. En: Jones C, Henderson IW (eds). *General, comparative and clinical endocrinology of the adrenal cortex.* New York: Academic Press, Inc. 1978; 419-494.

Calogero AE, Burrello N, Negri-Cesi P, Papale L, Palumbo MA, Cianci A, Sanfilippo S, D’Agara R. Effects of corticotropin-releasing hormone on ovarian estrogen production in vitro. *Endocrinology.* 1996;137:4161-4166.

Cambotti LJ, Cole FE, Gerall AA, Frohlich ED, MacPhee AA. Neonatal gonadal hormones and blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol*. 1984;247:E258-E264.

Canny BJ, O'Farrell KA, Clarke IJ, Tilbrook AJ. The influence of sex and gonadectomy on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis of the sheep. *J Endocrinol*. 1999;162:215-225.

Canteros G, Rettori V, Franchi A, Genaro A, Cebal E, Faletti A, Gimeno M, McCann SM. Ethanol inhibits luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) secretion by blocking the response of LHRH neuronal terminals to nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:3416-3420.

Canteros G, Rettori V, Suburo A, Genaro A, Gimeno M, McCann SM. Nitric oxide synthase (NOS) content of hypothalamic explants: Increased by norepinephrine and inactivated by NO and cyclic GMP. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:4246-4250.

Carey MP, Deterd CH, deKoning J, Helmerhorst F, deKloet ER. The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in the female rat. *J Endocrinol*. 1995;144:311-321.

Carey RM, McGrath HE, Pentz ES, Gomez RA, Barrett PQ. Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J Clin Invest*. 1997;100:1566-1574.

Carmel PW, Araki S, Ferin M. Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys: Evidence for pulsative release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *Endocrinology*. 1976;99:243-248.

Carmichael MC, Kumar R. Molecular biology of vasopressin receptors. *Semin Nephrol*. 1994;14:341-348.

Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud-Denis I, Genissel C, Bilinska B, Benahmed M, Levallet J. Aromatase expression in male germ cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001;79:203-208.

Carsten ME, Miller JD. A new look at uterine muscle contraction. *Am J Obstet Gynecol*. 1987;157:1303-1315.

Catt KJ. Angiotensin II receptors. En: Robertson JIS, Nicholls MG (eds). *The renin-angiotensin system*. New York and London: Gower Medical Publishing. 1993;12.1-12.14.

Chabbert-Buffet N, Skinner DC, Caraty A, Bouchard P. Neuroendocrine effects of progesterone. *Steroid*. 2000;65:613-620.

Chalas A, Conway EL. No evidence for involvement of angiotensin II in spatial learning in rats. *Behav Brain Res*. 1996;81:199-205.

Challis JRG, Lye SJ. Parturition. En: Knobil E, Neil JD (eds). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. 1994;985-1031.

Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev*. 2000;21:514-550.

Chan WY. The separate uterotonic and prostaglandin-releasing actions of oxytocin. Evidence and comparison with angiotensin and methacholine in the isolated rat uterus. *J Pharmacol Exp Ther*. 1980;213:575-579.

Chan WY, Berezin I, Daniel EE. Effects of inhibition of prostaglandin synthesis on uterine oxytocin receptor concentration and myometrial gap junction density in parturient rats. *Biol Reprod.* 1988;39:1117-1128.

Chan WY, Berezin I, Daniel EE, Russell KC, Hruby VJ. Effects of inactivation of oxytocin receptor and gap junction formation on labor in the rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 1991;69:1262-1267.

Chansel D, Ardaillou R. Active metabolites derived from angiotensin II. *Nephrologie.* 1998;19:427-432.

Chapman AB, Zamudio S, Woodmansee W, Merouani A, Osorio F, Johnson A, Moore LG, Dahms T, Coffin C, Abraham WT, Schrier R W. Systemic and renal hemodynamic changes in the luteal phase of the menstrual cycle mimic early pregnancy. *Am J Physiol.* 1997;273:F777-F782.

Chard T. Fetal and maternal oxytocin in human parturition. *Am J Perinatol.* 1989;2:145-152.

Chard T, Hudson CN, Edwards CRW, Boyd NRH. Release of oxytocin and vasopressin by humans foetus during labour. *Nature.* 1971; 234:352-354.

Chauvet J, Rouille Y, Michel G, Ouedraogo Y, Acher R. Adaptive differential processing of neurohypophysial vasotocin in amphibians: occurrence of hydrexin 2 (vasotocinyl-glycine) in Anura but not in Urodela. *Endocrinology.* 1991;133:353-358.

Chen HJ, Meites J. Effects of biogenic amines and TRH on release of prolactin and TSH in the rat. *Endocrinology.* 1975;96:10-14.

Chen YF, Meng QM. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent. *Life Sci.* 1991;48:85-96.

Cheung HS, Cushman DW. A soluble aspartate aminopeptidase from dog kidney. *Biochim Biophys Acta.* 1971;242:190-193.

Chibbar R, Miller FD, Mitchell FD. Synthesis of oxytocin in amnion chorion and decidua may influence the timing of human parturition. *J Clin Invest.* 1993;91:185-192.

Childs GV, Westlund KW, Tibolt RE, Lloyd JM. Hypothalamic regulatory peptides and their receptors: cytochemical studies of their role in regulation at the adenohypophyseal level. *J Electron Microsc Tech.* 1991;19:21-41.

Christenson LK, Strauss JF. 3rd. Steroidogenic acute regulatory protein: an update on its regulation and mechanism of action. *Arch Med Res.* 2001;32:576-586.

Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: Clinical implications. *Ann Intern Med.* 1998;129:229-240.

Churchill PC. Cellular mechanism of renin release. *Clin Exp Hypertens A.* 1988;10:1189-1202.

Cigliano L, Spagnuolo MS, Dale B, Balestrieri M, Abrescia P. Estradiol esterification in the human preovulatory follicle. *Steroids.* 2001;66:889-896.

Clarke IJ. Evidence that the switch from negative to positive feedback at the level of the pituitary gland is an important timing event for the onset of the preovulatory surge in LH in the ewe. *J Endocrinol.* 1995;145:271-282.

Clarke IJ, Cummins JT. Direct pituitary effects of estrogen and progesterone on gonadotropin secretion in the ovariectomized ewe. *Neuroendocrinology.* 1984;39:267-274.

Clarke IJ, Cummins JT. Increased gonadotropin-releasing hormone pulse frequency associated with estrogen-induced luteinizing hormone surges in ovariectomized ewes. *Endocrinology.* 1985;116:2376-2383.

Clayton RN. Regulation of gonadotropin subunit gene expression. *Hum Reprod.* 1993;8:29-36.

Coffey JW, De Duve C. Digestive activity of lysosomes. *J Biol Chem.* 1968;243:3255-3263.

Coiro V, Volpi R, Cataldo S, Capretti L, Caffarri G, Pilla S, Chiodera P. Dopaminergic and cholinergic involvement in the inhibitory effect of dexamethasone on the TSH response to TRH. *J Investig Med.* 2000;48:133-136.

Conn PM. The molecular mechanism of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary. En: Knobil E, Neil JD (eds). *The Physiology of Reproduction.* New York: Raven Press Ltd. 1994;1815-1826.

Conn PM, Crowley WF. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *New Engl J Med.* 1991;324:93-103.

Conn PM, McArdle CA, Andrews WV, Huckle WR. The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action in the pituitary gonadotrope. *Biol Reprod.* 1987b;36:17-35.

Conn PM, Huckle WR, Andrews WV, McArdle CA. The molecular mechanism of action of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the pituitary. *Rec Prog Horm Res.* 1987a;43:29-68.

Conn PM, Janovick JA, Stanislaus D, Kuphal D, Jennes L. Molecular and cellular bases of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary and central nervous system. *Vitam Horm.* 1995;50:151-214.

Coplan JD, Andrews MW, Rosenblum LA, Owens MJ, Friedman S, Gorman JM, Nemeroff CB. Persistent elevations of cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing factor in adult nonhuman primates exposed to early-life stressor: implications for the pathophysiology of mood and anxiety disorders. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:1619-1623.

Cordone A, Angelini F, Varriale B. Autorregulation of estrogen and androgen receptor mRNAs and downregulation of androgen receptor mRNA by estrogen in primary cultures of lizard testis cells. *Gen Comp Endocrinol.* 1998;110:227-36.

Coventry TL, Jessop DS, Finn DP, Crabb MD, Kinoshita H, Harbuz MS. Endomorphins and activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J Endocrinol.* 2001;169:185-193.

Crane MG, Harris JJ, Winsor IIIW. Hypertension, oral contraceptive agents, and conjugated estrogens. *Ann Intern Med.* 1971;74:13.

Crane MG, Harris JJ. Estrogens and hypertension: effect of discontinuing estrogens on blood pressure, exchangeable sodium, and the renin-aldosterone system. *Am J Med Sci*. 1978;276:33-55.

Critchlow V, Liebelt RA, Bar-Sela M, Mountcastle W, Lipscomb HS. Sex difference in resting pituitary-adrenal function in the rat. *Am J Physiol*. 1963;205:807-815.

Crofton JT, Ota M, Share L. Role of vasopressin, the renin-angiotensin system, and sex in Dahl salt-sensitive hypertension. *J Hypertens*. 1993;11:1031-1038.

Crowley WR, Armstrong WE. Neurochemical regulation of oxytocin secretion in lactation. *Endocr Rev*. 1992;13:33-65.

Csapo A. The "see-saw" theory of parturition. En: Knight J, O'Connor M (eds). *The Fetus and Birth* (Ciba Foundation Symposium). Amsterdam: Elsevier. 1977;159-172.

Cummins PM, O'Connor B. Pyroglutamyl peptidase: an overview of the three known enzymatic forms. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1429:1-17.

Cunningham ET Jr, Sawchenko PE. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol*. 1988;274:60-76.

Cunningham ET Jr, Bohn MC, Sawchenko PE. Organization of adrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol*. 1990;292:651-667.

D'Angelo SA, Wall NR, Bowers CY, Rosa CG. Effects of acute and chronic administration of TRH on TSH and prolactin secretion in normal and hypothyroid rats. *Neuroendocrinology*. 1975;18:161-175.

Dale HH. On some physiological actions of ergot. *J Physiol*. 1906;34:163-206.

Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC. The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*. 1989;125:917-924.

Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Suhr A, Marshall JC. Gonadal regulation of gonadotropin subunit gene expression: evidence for regulation of follicle-stimulating hormone- β messenger ribonucleic acid by nonsteroidal hormones in female rats. *Endocrinology*. 1990;127:798-806.

Dalkin AC, Burger LL, Aylor KW, Haisenleder DJ, Workman LJ, Cho S, Marshall JC. Regulation of gonadotropin subunit gene transcription by gonadotropin-releasing hormone: measurement of primary transcript ribonucleic acids by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Endocrinology*. 2001;142:139-146.

Dawood MY. Neurohypophysial hormones. En: Fuchs F, Klopfer A. (eds). *Endocrinology of pregnancy*. Philadelphia: Harper and Row. 1983:204-228.

Dawood MY, Khan-Dawood FS. Oxytocin. En: Shearman RF (ed). *Clinical reproductive endocrinology*. New York: Churchill Livingstone. 1985:233-249.

Dawood MY, Raghaven KS, Fuchs F. Oxytocin in human pregnancy and parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 1978a;51:138-142.

Dawood MY, Wang CF, Gupta R, Fuchs F. Fetal contribution to oxytocin in human labor. *Obstet Gynecol.* 1978b;52:205-209.

Dawood MY, Ylikorkala O, Trivedi D, Fuchs F. Oxytocin in maternal circulation and amniotic fluid during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1979;49:429-434.

De Bree FM. Trafficking of the vasopressin and oxytocin prohormone through the regulated secretory pathway. *J Neuroendocrinol.* 2000;12:589-594.

De Felipe C, De Ceballos ML, Gil C, Fuentes JA. Chronic antidepressant treatment increases enkephalin levels in n. Acumbens and striatum of the rat. *Eur J Pharmacol.* 1985;112:119-122.

De Felipe C, De Ceballos ML, Gil C, Fuentes JA. Hypoalgesia induced by antidepressants in mice: a case of opioids and serotonin. *Eur J Pharmacol.* 1986;125:193-199.

De Gandarias JM, Casis L, Irazusta J, Echevarria E, Ramirez M. Changes of aminopeptidase activity levels in serum and brain during the estrous cycle of the rat. *Horm Metab Res.* 1988;20:776.

De Gandarias JM, Casis L, Irazusta J, Echevarria E, Arechaga G, Ramirez M. Lys- and Tyr-arylamidase activities in serum and brain during the estrous cycle of the rat. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1989;121:671-673.

De Gandarias JM, Ramirez M, Echevarria E, Irazusta J, Casis L. Serum and brain aminopeptidase activities in cyclic rats. *Gen Physiol Biophys.* 1990;9:385-389.

De Gandarias JM, Irazusta J, Fernández D, Varona A, Gil J, Casis L. Effect of lidocaine administration on the enkephalin-degrading aminopeptidase activities in discrete areas of the rat brain. *Gen Pharmac.* 1997;29:489-493.

De Lean A, Garon M, Kelly PA, Labrie F. Changes of pituitary thyrotropin releasing hormone (TRH) receptor level and prolactin response to TRH during the rat estrous cycle. *Endocrinology.* 1977a;100:1505-1510.

De Lean A, Ferland L, Drouin J, Kelly PA, Labrie F. Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones. *Endocrinology.* 1977b;100:1496-1504.

Demay F, de Monti M, Tiffocche C, Vaillant C, Thieulant ML. Steroid-Independent Activation of ER by GnRH in Gonadotrope Pituitary cells. *Endocrinology.* 2001;142:3340-3347.

DeMayo FJ, Zhao B, Takamoto N, Tsai SY. Mechanisms of Action of Estrogen and Progesterone. *Ann NY Acad Sci.* 2002;955:48-59.

De Moura MD, Choi D, Adashi EY, Payne DW. Insulin-like growth factor-I-mediated amplification of follicle-stimulating hormone-supported progesterone accumulation by cultured rat granulosa cells: enhancement of steroidogenic enzyme activity and expression. *Biol Reprod.* 1997;56:946-953.

Deschepper CF. The renin-angiotensin system in the pituitary gland. *Trends Endocrinol Metab.* 1991;2:104-107.

Deschepper CF, Mellon SH, Cummin F, Baxter JD, Ganong WF. Analysis by immunochemistry and in-situ hibridation of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal and pituitary of the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:7552-7556.

Dhandapani KM, Brann DW. The role of glutamate and nitric oxide in the reproductive neuroendocrine system. *Biochem Cell Biol*. 2000;78:165-179.

DiBona GF. Peripheral and central interactions between the renin-angiotensin system and the renal sympathetic nerves in control of renal function. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;940:395-406.

Dieleman SJ, Kruip AM, Fontljne P, de Jong WHR, van der Weyden GC. Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. *J Endocrinol*. 1983;97:31-42.

Dierschke DJ, Bhattacharya AN, Atkinson IE, Knobil E. Circhoral oscillations of plasma LH levels in the ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology*. 1970;87:850-853.

Dihn DT, Frauman AG, Johnston, C.I, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin-Sci-(Lond)*. 2001;100:481-492.

Doi N, Brown CH, Cohen HD, Leng G, Russel JA. Effects of the endogenous opioid peptide, endomorphin 1, on supraoptic nucleus oxytocin and vasopressin neurones in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol*. 2001;132:1136-1144.

Dorrington JH, Armstrong DT. Effects of FSH on gonadal functions. *Recent Prog Horm Res*. 1979;35:301-342.

Dorton AM. The pituitary gland: embryology, physiology, and pathophysiology. *Neonatal Netw*. 2000;19:9-17.

Douglas A, Scullion S, Antonijevic I, Brown D, Russel J, Leng G. Uterine contractile activity stimulates supreoptic neurons in term pregnant rats via a noradrenergic pathway. *Endocrinology*. 2001;142:633-644.

Driancourt MA. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 2001;55:1211-1239.

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 Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat*. 2001;25:729-741.

Dubey AK, Plant TM. A suppression of gonadotropin secretion by cortisol in castrated male rhesus monkeys (*Macaca Mulatta*) mediated by the interruption of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release. *Biol Reprod*. 1985;33:423-431.

Ducsay CA, Cook MJ, Walsh SW, Novy MJ. Circadian patterns and dexamethasone-induced changes in uterine activity in pregnant rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol*. 1983;145:389-396.

Dufau ML, Miyagawa Y, Takada S, Khanum A, Miyagawa H, Buczko E. Regulation of androgen synthesis: the late steroidogenic pathway. *Steroids*. 1997;62:128-132.

Dufloth DL, Morris M, Michelini LC. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitari. *Am J Physiol*. 1997;273:R1271-1282.

Dukes M, Chester R, Atkinson P. Effects of oestradiol and prostaglandin F2 alpha on the timing of parturition in the rat. *J Reprod Fertil.* 1974;38:325-334.

Dunne FP, Barry DG, Ferriss JB, Grealy G, Murphy D. Changes in blood pressure during the normal menstrual cycle. *Clin Sci.* 1991;81:515-518.

Duval F, Macher JP, Mokrani MC. Difference between evening and morning thyrotropin responses to protirelin in major depression. *Arch Gen Psychiatry.* 1990;47:443-448.

Dziedzic B, Walczewska A. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) content in the median eminence after superior cervical ganglionectomy in ovariectomized and estrogen-treated rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1997;105:57-62.

Ecelbarger CA, Kim GH, Wade JB, Knepper MA. Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin. *Exp Neurol.* 2001;171:227-234.

El-Hajdoubi M, Poulain DA, Theodosios DT. Activity-dependent morphological plasticity in an adult neurosecretory system: magnocellular oxytocin neurons of the hypothalamus. *Biochem Cell Biol.* 2000;78:317-327.

El-Migdadi F, Gallant S, Brownie AC. Sex differences in cytochrome oxidase and P-450_{11β} in the rat adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol.* 1995;112:185-194.

Elias AN, Meshkinpour H, Valenta LJ. Attenuation of hypertension by conjugated estrogens. *Nephron.* 1992;30:89-92.

Elmore MA, Griffiths EC, O'Connor B, O'Cuinn G. Further characterisation of the substrate specificity of TRH hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Neuropeptides.* 1990;15:31-36.

Ely DL, Salisbury R, Hadi D, Turner M, Hohnson ML. Androgen receptor and the testes influence hypertension in a hybrid rat model. *Hypertension.* 1991;17:1104-1110.

Emanuele NV, Jurgens J, La Paglia N, Williams DW, Kelley MR. The effect of castration on steady state levels of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) mRNA and proLHRH processing: time course study utilizing semi-quantitative reverse transcription/polymerase chain reaction. *J Endocrinol.* 1996;148:509-515.

Engelmann M, Wotjak CT, Ebner K, Landgraf R. Behavioural impact of intraseptally released vasopressin and oxytocin in rats. *Exp Physiol.* 2000;85:25S-130S.

Enmark E, Gustafsson JA. Oestrogen receptors. An overview. *J Intern Med.* 1999;246:133-138.

Epifano O, Dean J. Genetic control of early folliculogenesis in mice. *Trends Endocrinol Metabol.* 2002;13:169-173.

Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction.* 2001;122:829-938.

Erickson GF. The ovary: basic principles and concepts. En: Felig P, Baxter JD, Frohman LA (eds). *Endocrinology and metabolism.* New York: McGraw-Hill. 1995;973-1015.

Erickson GF, Shimasaki S. The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11:193-198.

Erickson GF, Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil Steril*. 2001;76:943-949.

Eskay RL, Mical RS, Porter JC. Relationship between luteinizing hormone releasing hormone concentration in hypophyseal portal blood and luteinizing hormone release in intact, castrated and electrochemically-stimulated rats. *Endocrinology*. 1977;100:263-270.

EtLiu J, Heikkila P, Meng QH, Kahri AI, Tikkanen MJ, Voutilainen R. Expression of low and high density lipoprotein receptor genes in human adrenals. *Eur J Endocrinol*. 2000;142:677-682.

Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 1988;240:889-895.

Everett JW. Pituitary and hypothalamus: Perspectives and overview. En: Knobil E, Neill JD et al., (eds). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. 1994:1509-1526.

Falke N. Oxytocin stimulates oxytocin release from isolated nerve terminals of rat neural lobes. *Neuropeptides*. 1989;14:269-274.

Fang X, Wong S, Mitchell BF. Relationships among sex steroids, oxytocin, and their receptors in the rat uterus during late gestation and at parturition. *Endocrinology*. 1996;137:3213-3219.

Farhat MY, Chen MF, Bhatti T, Iqbal A, Cathapermal S, Ramwell PW. Protection by oestradiol against the development of cardiovascular changes associated with monocrotaline pulmonary hypertension in rats. *Br J Pharmacol*. 1993;110:719-723.

Fausser B, Heusden AV. Manipulation of human ovarian function: Physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev*. 1997;18:71-106.

Fejgin MD, Pak SC, Warnell C, Flouret G, Parsons MT, Wilson L. Oxytocin antagonist inhibitory effect on the rat and baboon uterus may be overcome by prostaglandins. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;171:1076-1080.

Fekete K. Studies on the physiology of pregnancy. *Endokrinologie*. 1930;364-369.

Felgenhauer K, Glenner GG. The enzymatic hydrolysis of aminoacid β -naphthylamidases. II. Partial purification and properties of a peptide-bound cobalt-activated rat kidney aminopeptidase. *J Histochem Cytochem*. 1966;14:401-413.

Feracci H, Maroux S. Rabbit intestinal aminopeptidase N. Purification and molecular properties. *Biochim Biophys Acta*. 1980;599:448-463.

Ferguson AV, Wall KM. Central actions of angiotensin in cardiovascular control: multiple roles for a single peptide. *Can J Physiol Pharmacol*. 1992;70:779-785.

Fernández D, Valdivia A, Irazusta J, Ochoa C, Casis L. Peptidase activities in human semen. *Peptides*. 2002;23:461-468.

Ferrari E, Cravello L, Muzzoni B, Casarotti D, Paltro M, Solerte SB, Fioravanti M, Cuzzoni G, Pontiggia B, Magri F. Age-related changes of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: pathophysiological correlates. *Eur J Endocrinol*. 2001;144:319-329.

Filicori M, Cognigni GE. Clinical review 126: Roles and novel regimens of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in ovulation induction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:1437-1441.

Filipovsky J, Ducimetiere P, Eschwege E, Richard JL, Rosselin G, Claude JR. The relationship of blood pressure with glucose, insulin, heart rate, free fatty acids and plasma cortisol levels according to degree of obesity in middle-aged men. *J Hypertens.* 1996;14:229-235.

Findlay JK, Drummond AE. Regulation of the FSH receptor in the ovary. *Trends Endocrinol Metab.* 1999;10:183-188.

Fisher-Ferraro C, Nahmod VE, Goldstein DJ, Finkelstein S. Angiotensin and renin in the rat and dog brain. *J Exp Med.* 1971;133:353-361.

Fitts DA, Thunhorst RL. Rapid elicitation of salt appetite by an intravenous infusion of angiotensin II. *Am J Physiol.* 1996;270:R1092-R1098.

Fitzpatrick RJ. Blood concentration of oxytocin in labor. *J Endocrinol.* 1961;22:19-24.

Fliers E, Noppen NWAM, Wiersinga WM, Visser TJ, Swaab DK. Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH)-containing cells and fibers in the human hypothalamus. *J Comp Neurol.* 1994;350:311-323.

Flores JA, Garmey JC, Lahav M, Veldhuis JD. Mechanisms underlying endothelin's inhibition of FSH-stimulated progesterone production by ovarian granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1999;156:169-178.

Folk JE. A new pancreatic carboxypeptidase. *J Am Chem Soc.* 1956;78:3541-3542.

Fortune JE, Vincent SE. Progesterone inhibits the induction of aromatase activity in rat granulosa cells in vitro. *Biol Reprod.* 1983;28:1078-1080.

Foster RH, MacFarlane CH, Bustamante MO. Recent progress in understanding aldosterone secretion. *Gen Pharmac.* 1997;5:647-651.

Fox AW. Vascular vasopressin receptors. *Gen Pharmacol.* 1988;19:639-647.

Fox SR, Harlan RE, Shivers BD, Pfaff DW. Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology.* 1990;51:276-283.

Franci CR, Anselmo-Franci JA, McCann SM. Angiotensinergic neurons physiologically inhibit prolactin, growth hormone, and thyroid-stimulating hormone, but not adrenocorticotrophic hormone, release in ovariectomized rats. *Peptides.* 1997;18:971-976.

Francois MH, Nosten-Bertrand M, Roubertoux PL, Kottler ML, Degrelle H. Opponent strain effect on eliciting attacks in NZB mice: physiological correlates. *Physiol Behav.* 1990;47:1181-1185.

Franks S, Mason HD, Shennan KIJ, Sheppard MC. Stimulation of prolactin secretion by oestradiol in the rat is associated with increased hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone. *J Endocrinol.* 1984;103:257-261.

Fraser R, Ingram MC, Anderson NH, Morrison C, Davies E, Connell JMC. Cortisol effects on body mass, blood pressure, and cholesterol in the general population. *Hypertension*. 1999;3:1374-1378.

Freeman ER, Bloom DA, McGuire EJ. A brief history of testosterone. *J Urol*. 2001;165:371-373.

Fruton JS, Irving GW, Bergmann M. On the proteolytic enzymes of animal tissues. II. The composite nature of beef spleen cathepsin. *J Biol Chem*. 1941a;138:249-262.

Fruton JS, Irving GW, Bergmann M. On the proteolytic enzymes of animal tissues. III. The proteolytic enzymes of beef-spleen, beef kidney and swine kidney classification of the cathepsins. *J Biol Chem*. 1941b;141:763-774.

Fuchs AR, Husslein P, Fuchs F. Oxytocin and the initiation of human parturition II. Stimulation of prostaglandins production in human decidua by oxytocin. *Am J Obstet Gynecol*. 1981;141:694-697.

Fuchs AR, Fuchs F, Husslein P, Soloff MS, Fernstrom MJ. Oxytocin receptors and human parturition: A dual role in the initiation of labor. *Science*. 1982;251:1396-1398.

Fuchs AR, Husslein P, Fuchs F. Oxytocin secretion and human parturition: pulse frequency and duration increase during spontaneous labor in women. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;167:1559-1563.

Fujita MQ, Yasui T, Sato B, Uchida N, Uchida K, Shiratori O, Takeda K, Matsumoto K. Maintenance of androgen-, glucocorticoid- or estrogen-responsive growth in shionogi carcinoma 115 subline sustained in castrated mice with high dose of estrogen for 30 generation (3 years). *Jpn J Cancer Res*. 1992;83:995-1001.

Funder JW. Aldosterone action. *Annu Rev Physiol*. 1993;55:115-130.

Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, Chappell MC, Broshihan KB. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension*. 1999;33:323-328.

Gallego M, Casis L, Casis O. Imipramine inhibits soluble enkephalin-degrading aminopeptidase activity in vitro. *Eur J Pharmacol*. 1998;360:113-116.

Gallo RV, Drouva SV. Effects of intraventricular infusion of catecholamines on luteinizing hormone release in ovariectomized and ovariectomized, steroid-primed rats. *Neuroendocrinology*. 1979;29:149-162.

Gallo-Payet N, Guillon G. Regulation of adrenocortical function by vasopressin. *Hom Metab Res*. 1998;30:360-367.

Gallucci WT, Baum A, Laue L, Rabin DS, Chrousos GP, Gold PW, Kling MA. Sex differences in sensitivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Health Psychol*. 1993;12:420-425.

Ganguly A, Davis JS. Role of calcium and other mediators in aldosterone secretion from the adrenal glomerulosa cells. *Pharmacol Rev*. 1994;46:417-447.

Ganong WF. The brain renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol.* 1984;46:17-31.

Ganong WF. Angiotensin II in the brain and pituitary: contrasting roles in the regulation of adenohypophyseal secretion. *Horm Res.* 1989;31:24-31.

Ganong WF. Blood, pituitary, and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior pituitary gland. *Front Neuroendocrinol.* 1993;14:233-249.

Ganong WF. Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000;27:422-427.

Ganong WF, Murakami K. The role of angiotensin II in the regulation of ACTH secretion. *Ann NY Acad Sci.* 1987;512:176-186.

Ganong WF, Deschepper CF, Steele MK, Intebi AD. Renin-angiotensin system in the anterior pituitary gland of the rat. *Am J Hypertens.* 1989;2:320-322.

Ganten D, Speck G. The brain renin-angiotensin system: a model for the synthesis of peptides in the brain. *Biochem Pharmacol.* 1978;27:2379-2389.

Ganten D, Hermann K, Bayer D, Unger T, Lang RE. Angiotensin synthesis in the brain and increased turnover in hypertensive rats. *Science.* 1983;221:869-871.

Ganten U, Schroder G, Witt M, Zimmermann F, Ganten D, Stock G. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effects of anti-androgen treatment. *J Hypertens.* 1989;7:721-726.

Garty H, Edelman IS. Amiloride-sensitive trypsinization of apical Na⁺ channel. Analysis of hormonal regulation of Na⁺ transport in toad bladder. *J Gen Physiol.* 1983;81:785-803.

Garty H, Palmer LG. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev.* 1997;77:359-396.

Gaskin JH, KitayJI. Adrenocortical function in the hamster: sex differences and effects of gonadal hormones. *Endocrinology.* 1970;87:779-786.

Genazzani AR, Bernardi F, Monteleone P, Luisi S, Luisi M. Neuropeptides, neurotransmitters, neurosteroids, and the onset of puberty. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;900:1-9.

George FW, Wilson JD. Sex determination and differentiation. En: Knobil E, Neill JD (eds). *The Physiology of Reproduction.* New York: Raven Press Ltd. 1994;Chapter 1 .

Gerall AA, Givon L. Early androgen and age-related modifications in female rat reproduction. En: Gerall AA, Moltz H, Ward IL (eds). *Handbook of Behavioral Neurobiology.* New York: Plenum Press. 1992;313-354.

Gershengorn MC. Bihormonal regulation of the thyrotropin-releasing hormone receptor in mouse pituitary thyrotropic tumor cells in culture. *J Clin Invest.* 1978;62:937-943.

Gershengorn MC, Marcus-Samuels BE, Geras E. Estrogens increase the number of thyrotropin-releasing hormone receptors on mammatropic cells in culture. *Endocrinology.* 1979;105:171-176.

Gigante B, Rubattu S, Russo R, Porcellini A, Enea I, De Paolis P, Savoia C, Natale A, Piras O, Volpe M. Opposite feedback control of renin and aldosterone biosynthesis in the adrenal cortex by angiotensin II AT₁-subtype receptors. *Hypertension*. 1997;30:563-568.

Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*. 2001;81:629-683.

Gindoff PR, Ferin M. Endogenous opioid peptides modulate the effect of corticotropin-releasing factor on gonadotropin release in the primate. *Endocrinology*. 1987;121:837-842.

Giri M, Gag CQ, Kaufman JM. The N-methyl-D-aspartate-mediated inhibitory control of gonadotropin-releasing hormone release in the hypothalamus of the adult male guinea pig is expressed through opioidergic systems. *Endocrinology*. 1996;137:1468-1473.

Giroud CJP, Stachenko J, Verming EH. Secretion of aldosterone by the zona glomerulosa of rat adrenal glands incubated in vitro. *Proc Soc Exp Biol Mol*. 1956;92:154-158.

Glenner GG, McDillan DJ, Folk JE. A mammalian peptidase specific for the hydrolysis of N-terminal alfa-L-glutamyl and aspartyl residues. *Nature*. 1962;194:867.

Gomori G. Chromogenic substrates for aminopeptidase. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1954;87:559-561.

Goodman DBP, Allen JE, Rasmussen H. Studies on the mechanism of action of aldosterone: hormone-induced changes in lipid metabolism. *Biochemistry*. 1971;10:3825-3831.

Goodman DBP, Wong M, Rasmussen H. Aldosterone-induced membrane phospholipid fatty acid metabolism in the toad urinary bladder. *Biochemistry*. 1975;14:2803-2809.

Goodwin TM, Paul RH, Millar L, Valenzuela G, Silver H, Chez R, Spellacy W, Parsons M, Hayashi R, Mauck C, North L, Merrinan R. The effects of the oxytocin antagonist atosiban on preterm uterine activity in humans. *Am J Obst Gynecol*. 1994;170:474-478.

Gore-Langton RE, Armstrong DT. Follicular steroidogenesis and its control. En: Knobil E, Neill JD (eds). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press. 1994;571-627.

Gosden RG, Telfer E. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *J Zool*. 1987a;211:169-175.

Gosden RG, Telfer E. Scaling of follicular sizes in mammalian ovaries. *J Zool*. 1987b;211:157-168.

Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Rev*. 1996;17:121-155.

Granger JP, Schnackenberg CG. Renal mechanisms of angiotensin II-induced hypertension. *Semin Nephrol*. 2000;20:417-425.

Grantham JJ, Burg MB. Effect of vasopressin and cyclic AMP on permeability of isolated collecting tubules. *Am J Physiol*. 1966;211:255-259.

Grazzini E, Guillon G, Mouillac B, Zingg HH. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature*. 1998;392:509-512.

Green JD. The comparative anatomy of the hypophysis with special reference to its blood supply and innervation. *Amer J Anat.* 1951;88:225-311.

Greenberg LJ. Fluorometric measurement of alkaline phosphatase and aminopeptidase activities in the order of 10^{-14} mole. *Biochem Biophys Res Commun.* 1962;9:430-435.

Greenwald GS, Roy SK. Follicular development. En: Knobil E, Neill JD (eds). *The physiology of reproduction* New York: Raven Press. 1994;629-724.

Greer MA. Studies on the influence of the central nervous system on anterior pituitary function. *Rec Prog Horm Res.* 1957;13:67-104.

Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 1998;9:411-416.

Gross DS. Effects of castration and steroid replacement on immunoreactive gonadotropin-releasing hormone in the hypothalamus and preoptic area. *Endocrinology.* 1980;106:1442-1480.

Grossman M, Wilson JM. Frontiers in gene therapy: LDL receptor replacement for hypercholesterolemia. *J Lab Clin Med.* 1992;119:457-460.

Guillemin R. Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron. *Science.* 1978;202:390-402.

Guillery EN, Robillard JE. The renin-angiotensin system and blood pressure regulation during infancy and childhood. *Pediatr Clin North Amer.* 1993;40:61-78.

Gulledge CC, Burow ME, McLachlan JA. Endocrine disruption in sexual differentiation and puberty. What do pseudohermaphroditic polar bears have to do with the practice of pediatrics?. *Pediatr Clin North Am.* 2001;48:1223-1240.

Guo IC, Wu LS, Lin JH, Chung BC. Differential inhibition of progesterone synthesis in bovine luteal cells by estrogens and androgens. *Life Sci.* 2001;68:1851-1865.

Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J, McCann SM. Atrial natriuretic peptide in brain and pituitary gland. *Physiol Rev.* 1997;77:465-515.

Guyton AC, Coleman TG, Cowley AW Jr., Scheel KW, Manning RD, Norman RA. Arterial pressure regulation: overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *Am J Med.* 1972;52:584-594.

Haas DA, George SR. Gonadal regulation of corticotropin-releasing factor immunoreactivity in hypothalamus. *Brain Res Bull.* 1988;20:361-367.

Haberich FJ. Osmoreceptors in the portal circulation. *Fed Proc.* 1968;27:1137-1141.

Habert R, Lejeune H, Saez JM. Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;179:47-74.

Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev.* 1990;70:1067-1116.

Hadley M. Pituitary hormones. En: Hadley M (ed). *Endocrinology.* London: Prentice-Hall International (UK) Limited. 1996:83-101.

Hadley ME. Endocrinología. Madrid: Prentice Hall. 1997.

Hall JE, Mizelle HL, Hildebrandt DA, Brands MW. Abnormal pressure-natriuresis: a cause or a consequence of hypertension. *Hypertension*. 1990;15:547-559.

Hall JE, Taylor AE, Martin KA, Rivier J, Schoenfeld DA, Crowley WF Jr. Decreased release of gonadotropin-releasing hormone during the preovulatory midcycle luteinizing hormone surge in normal women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:6894-6898.

Han JS, Terenius L. Neurochemical basis of acupuncture analgesia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1982;22:193-220.

Handa RJ, Nunley KM, Lorens SA, Louie JP, McGivern RF, Bollnow MR. Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion in the male rat following novelty and foot shock stressor. *Physiol Behav*. 1994;55:117-124.

Handler JS, Butcher RW, Sutherland EW, Orloff J. The effect of vasopressin and of theophylline on the concentration of adenosine-3',5'-phosphate in the urinary bladder of the toad. *J Biol Chem*. 1965;240:4524-4526.

Hansel W, Fortune J. The applications of ovulation control. En: Crighton DB, Haynes NE, Foxcroft GR, Lammington GE (eds). *Control of ovulation*. London: Butterworths. 1978;435-451.

Harding JW, Sullivan MJ, Hanesworth JM, Cushing LL, Wright JW. Inability of 125ISar¹Ile⁸ angiotensin II to move between the blood and cerebrospinal fluid compartments. *J Neurochem*. 1988;50:554-557.

Harris GC, Nicholson HD. Characterization of the biological effects of neurohypophyseal peptides on seminiferous tubules. *J Endocrinol*. 1998;156:35-42.

Harris HW Jr, Strange K, Zeidel ML. Current understanding of the cellular biology and molecular structure of the antidiuretic hormone-stimulated water transport pathway. *J Clin Invest*. 1991;88:1-8.

Hashimoto R, Kimura F. Inhibition of gonadotropin secretion induced by cholecystokinin implants in the medial preoptic area by the dopamine receptor blocker, pimozide, in the rat. *Neuroendocrinology*. 1986;42:32-37.

Hassager C, Riis BJ, Strom V, Guyene TT, Christiansen C. The long term effects of oral and percutaneous estradiol on plasma renin substrate and blood pressure. *Circulation*. 1987;76:753-758.

Hasser EM, Bishop VS, Hay M. Interactions between vasopressin and baroreflex control of the sympathetic nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997;24:102-108.

Haug E, Gautvik KM. Effects of sex steroids on prolactin secreting rat pituitary cells in culture. *Endocrinology*. 1976;99:1482-1489.

Hedin SG, Rowland S. Untersuchungen über das vorkommen von proteolytischen enzymen im thierkörper. *Hoppe-seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*. 1901;38, 531-540. Citado en Barrett AJ. *Proteinases in mammalian cells and tissues*. North-Holland Publishing Company. Amsterdam. 1977;1.

Heisler LE, Tumber AJ, Reid RL, Van Vugt DA. Vasopressin mediates hypoglycemia-induced inhibition of luteinizing hormone secretion in the ovariectomized rhesus monkey. *Neuroendocrinology*. 1994;60:297-304.

Herbison AE. Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion. *Rev Reprod*. 1997;2:1-6.

Herbison AE, Theodosis DT. Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. *Neuroscience*. 1992;50:283-298.

Hertz RJ (ed). *Opioids I and II*. Springer-Verlag, Berlin: Heidelberg. 1993.

Hess R. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. *Rev Reprod*. 2000;5:84-92.

Hess RA, Bunick D, Bahr J. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract. A review. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;178:29-38.

Heuer H, Schäfer MK, Bauer K. The thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme: The third element of the Thyrotropin-releasing hormone-signaling system. *Thyroid*. 1998;8:915-920.

Higuchi T, Okere CO. Role of the supraoptic nucleus in regulation of parturition and milk ejection revisited. *Microsc Res Tech*. 2002;56:113-121.

Higuchi T, Honda K, Fukuoka T, Negoro H, Wakabayashi K. Release of oxytocin during suckling and parturition in the rat. *J Endocrinol*. 1985;105:339-346.

Higuchi T, Tadokoro Y, Honda K, Negoro H. Detailed analysis of blood oxytocin levels during suckling and parturition in the rat. *J Endocrinol*. 1986;110:251-256.

Hillier SG. Ovarian manipulation with pure gonadotrophins. *J Endocrinol*. 1990;127:1-4.

Hillier SG. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;179:39-46.

Hinkle PM, Goh KBC. Regulation of thyrotropin-releasing hormone receptors and responses by L-triiodothyronine in dispersed rat pituitary cell cultures. *Endocrinology*. 1982;110:1725-1731.

Hirst JJ, Haluska GJ, Cook MJ, Hess DL, Novy MJ. Comparison of plasma oxytocin and catecholamine concentrations with uterine activity in pregnant rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;73:804-810.

Hirst JJ, West NB, Brenner RM, Novy MJ. Steroid hormone receptors in the adrenal glands of fetal and adult rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;75:308-314.

Herbison AE. Neurochemical identity of neurones expressing oestrogen receptors in sheep hypothalami. *J Reprod Fertil*. 1995;49:271-283.

Hirst JJ, Chibbar R, Mitchell BF. Role of oxytocin in the regulation of uterine activity during pregnancy and in the initiation of labor. *Semin Reprod Endocrinol*. 1993;11:219-233.

Hogarty DC, Tran DN, Phillips MI. Involvement of angiotensin receptor subtypes in osmotically induced release of vasopressin. *Brain Res*. 1994;637:126-132.

Hollenberg NK, Chenitz WR, Adams DF, Williams GH. Reciprocal influence of salt intake on adrenal glomerulosa and renal responses to angiotensin II in normal man. *J Clin Invest.* 1974;54:34-42.

Hollenberg AN, Monden T, Flynn TR, Boers ME, Cohen O, Wondisford FE. The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol Endocrinol.* 1995; 9:540-550.

Holmes WN, Phillips JG. The adrenal cortex of birds. En: Jones C, Henderson IW (eds). *General, comparative and clinical endocrinology of the adrenal cortex.* New York: Academic Press, Inc. 1976;293-420.

Holmes CL, Patel BM, Russell JA, Walley KR. Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. *Chest.* 2001;120:989-1002.

Hong JS, Hudson PM, Yoshikawa K, Ali SF, Mason GA. Effects of chlordecone administration on brain and pituitary peptide systems. *Neurotoxicology.* 1985;6:167-182.

Honnebier MBOM, Figueroa JP, Rivier J, Vale W, Nathanielsz P. Studies on the role of oxytocin in late pregnant in the pregnant rhesus monkey: plasma concentrations of oxytocin in the maternal circulation throughout the 24-h day and the effect of synthetic oxytocin antagonist [1- β -Mpa(β -(CH₂)₅)_D, (Me(Tyr², Orn⁸))] oxytocin on spontaneous nocturnal myometrial contractions. *J Dev Physiol.* 1989;12:225-232.

Hopsu VK, Kantonen UM, Glenner GG. A peptidase from rat tissue selectively hydrolyzing N-terminal arginine and lysine residues. *Life Sci.* 1964;3:1449-1453.

Howell WH. The physiological effects of extracts of the hypophysis cerebri and infundibular body. *J Exp Med.* 1898;3:235-258.

Howles CM. Role of LH and FSH in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;161:25-30.

Howlett TA, Rees LH. Endogenous opioid peptides and hypothalamo-pituitary function. *Annu Rev Physiol.* 1986;48:527-536.

Hoyer PB. Regulation of luteal regression: the ewe as a model. *J Soc Gynecol Investig.* 1998;5:49-57.

Hsiung HM, Smith DP, Zhang XY, Bennett T, Rosteck PR Jr, Lai MH. Structure and functional expression of a complementary DNA for porcine growth hormone-releasing hormone receptor. *Neuropeptides.* 1993;25:1-10.

Hu J, Ludwig TE, Salli U, Stormshak F, Mirando MA. Autocrine/paracrine action of oxytocin in pig endometrium. *Biol Reprod.* 2001;64:1682-1688.

Huang SW, Tsai SC, Tung YF, Wang PS. Role of progesterone in regulating the effect of estradiol on the secretion of thyrotropin-releasing hormone and dopamine into hypophysial portal blood in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology.* 1995;61:536-541.

Hughes IA. Minireview: sex differentiation. *Endocrinology.* 2001;142:3281-3287.

Hughes GS, Mathur RS, Margollus HS. Sex steroid hormones are altered in essential hypertension. *J Hypertens.* 1989;7:181-187.

Hui KS, Saito M, Hui M. A novel neuron-specific aminopeptidase in rat brain synaptosomes. Its identification, purification and characterization. *J Biol Chem.* 1998;273:31053-31060.

Hulse GK, Coleman GJ, Copolov DL, Clements JA. Relationship between endogenous opioids and the oestrous cycle in the rat. *J Endocrinol.* 1984;100:271-275.

Hyypä M, Motta M, Martini L. Ultrashort feedback control of follicle-stimulating hormone-releasing factor secretion. *Neuroendocrinology.* 1971;7:227.

Iams SG, Wexler BC. Retardation in the development of spontaneous hypertension in SH rats by gonadectomy. *J Lab Clin Med.* 1977;90:997-1003.

Ichikawa I, Harris C. Angiotensin actions in the kidney: renewed insight into the old hormone. *Kidney Int.* 1991;40:583-596.

Ikeda H, Uchimura H, Greer MA. Comparison of the ability of thyroxine and triiodothyronine to suppress TRH-induced TSH secretion by perfused rat anterior pituitary fragments. *Neuroendocrinology.* 1985;41:79-82.

Imai K, Hama T, Kato T. Purification and properties of rat brain dipeptidyl aminopeptidase. *J Biochem.* 1983;93:431-437.

Imai T, Sarkar D, Shibata A, Funahashi H, Morita-Matsuyama T, Kikumori T, Ohmori S, Seo H. Expression of adrenocorticotropin receptor gene in adrenocortical adenomas from patients with Cushing syndrome: possible contribution for the autonomous production of cortisol. *Ann Surg.* 2001;234:85-91.

Imperato-McGinley J, Canovatchel WJ. Complete androgen insensitivity. Pathophysiology, diagnosis, and management. *TEM.* 1992;3:75-81.

Inoue T, Nonoguchi H, Tomita K. Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct. *Cardiovasc Res.* 2001;51:470-480.

Irianni F, Hodgen GD. Mechanism of ovulation. *Reprod Endocrinol.* 1992;21:19-38.

Ivell R, Balvers M, Rust W, Bathgate R, Einspanier A. Oxytocin and male reproductive function. *Adv Exp Med Biol.* 1987;424:253-264.

Ivell R, Kimura T, Muller D, Augustin K, Abend N, Bathgate R, Telgmann R, Balvers M, Tillmann G, Fuchs AR. The structure and regulation of the oxytocin receptor. *Exp Physiol.* 2001;86:289-296.

Jackson IMD. TRH and CRH. What's the message?. *Endocrinology.* 1995;136:2793-2794.

Jacoby M. Ueber die fermentative eiweisspaltung und ammoniakbildung in der leber. *Zeitschrift für Physiologische Chemie.* 1900;30:149-173. Citado en Barret AJ. Proteinases in mammalian cells and tissues. Amsterdam: North-Holland Publishing Company. 1977;1.

Jaffe A, Chen Y, Kisch ES, Fischel B, Alon M, Stern N. Erectile dysfunction in hypertensive subjects. Assessment of potential determinants. *Hypertension.* 1996;28:859-862.

Janne OA, Palvimo JJ, Kallio P, Mehto M. Androgen receptor and mechanism of androgen action. *Ann Med.* 1993;25:83-89.

Jayes FC, Britt JH, Esbenshade KL. Role of gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in differential regulation of gonadotropins in the gilt. *Biol Reprod.* 1997;56:1012-1019.

Jin Y, Penning TM. Steroid 5-alpha-reductases and 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: key enzymes in androgen metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2001;15:79-94.

Jinnah HA, Conn PM. GnRH action at the pituitary: Basic research and clinical applications. En: Negro-Vilar A, Conn PM (eds). *Peptide Hormones: Effects and Mechanism of Action*. Fla: Boca Raton, CRC Press. 1988;120-142.

Johnston CI. Biochemistry and pharmacology of the renin-angiotensin system. *Drugs.* 1990;39:21-31.

Johnson MH, Everitt BJ. Ovarian function. En: Johnson MH, Everitt B (eds). *Essential Reproduction*. London: Black well science Ltd. 1995;60-78.

Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim Reprod Sci.* 2000;60-61:471-480.

Joseph-Bravo P, Uribe RM, Vargas MA, Pérez-Martínez L, Zoeller T, Charli JL. Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell Mol Neurobiol.* 1998;18:231-247.

Kadekaro M, Summy-Long JY. Centrally produced nitric oxide and the regulation of body fluid and blood pressure homeostases. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000;27:450-459.

Kadekaro M, Terrell ML, Bui V, Summy-Long JY. Central interactions between angiotensin II and PGD(2) in the regulation of vasopressin and oxytocin secretion in dehydrated rats. *Brain Res.* 2001;889:84-88.

Kaipia A, Hsueh AJW. Regulation of ovarian atresia. *Annu Rev Physiol.* 1997;59:349-363.

Kalin MF, Zumhoff B. Sex hormones and coronary artery disease: a review of clinical studies. *Steroids.* 1990;55:330-352.

Kalra SP, Kalra PS. Regulation of gonadotropin secretion: emerging new concepts. En: Imura H (ed). *The pituitary Gland*. New York: Raven Press. 1994;285-308.

Kalra PR, Anker SD, Coats AJ. Water and sodium regulation in chronic heart failure: the role of natriuretic peptides and vasopressin. *Cardiovasc Res.* 2001;51:495-509.

Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, Inagami T. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem.* 1993;268:24543-24546.

Kania RK, Santiago NA, Gray GM. Intestinal surface amino-oligopeptidases. II. Substrate kinetics and topography of the active site. *J Biol Chem.* 1977; 252:4929-4934.

Karpanou EA, Vyssoulis GP, Georgoudi DG, Toutouza MG, Toutouzas PK. Ambulatory blood pressure changes in the menstrual cycle of hypertensive women. Significance of plasma renin activity values. *Am J Hypertens.* 1993;6:654-659.

Karsch FJ. Central actions of ovarian steroids in the feedback regulation of pulsatile secretion of luteinizing hormone. *Annu Rev Physiol.* 1987;49:365-382.

Karsch FJ, Bowen JM, Caraty A, Evans NP, Moenter SM. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol Reprod.* 1997;56:303-309.

Kasier UB, Jakubowiak A, Seinberger A, Chin WW. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. *Endocrinology.* 1997;138:1224-1231.

Katoh A, Nabeshima T, Kameyama T. Behavioral changes induced by stressful situations: effects of enkephalins, dynorphin, and their interactions. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;253:600-607.

Katoh A, Nabeshima T, Ukai R, Kameyama T. Endorphins do not affect behavioral stress responses in mice. *Peptides.* 1992;13:737-739.

Katsoyannis PG, Du Vigneaud V. Arginine-vasotocin a synthetic analogue of the posterior pituitary hormones containing the ring of oxytocin and the side chain of vasopressin. *J Biol Chem.* 1958;233:1352-1354.

Kaufman KD, Olsen EA, Whiting D, Savin R, de Villex R, Bergfeld W, Price VH, Van Neste D, Roberts JL, Hordinsky M, Shapiro J, Binkowitz B, Gormley GJ. Finasterine in the treatment of men with androgenetic alopecia: finasterine male pattern hair loss study group. *J Am Acad Dermatol.* 1998;39:578-589.

Kazmierkiewicz R, Czaplewski C, Ciarkowski J. Elucidation of neurophysin/bioligand interactions from molecular modeling. *Acta Biochim Pol.* 1997;44:453-466.

Kelly JJ, Mangos G, Williamson PM, Whitworth JA. Cortisol and hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1998;25:51-56.

Kelly JA, Slator GR, Tipton KF, Williams CH, Bauer K. Kinetic investigation of the specificity of porcine brain thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme for thyrotropin-releasing hormone-like peptides. *J Biol Chem* 2000;275:16746-16751.

Kelly JJ, Williamson P, Martin A, Whitworth JA. Effects of oral L-arginine on plasma nitrate and blood-pressure in cortisol-treated humans. *J Hypertens.* 2001;19:263-268.

Kero J, Poutanen M, Zhang FP, Raliman N, McNicol AM, Nilson JH, Keri RA, Huhtaniemi IT. Elevated luteinizing hormone induces expression of its receptors and promotes steroidogenesis in the adrenal cortex. *The journal of clinical investigation.* 2000;105:633-641.

Kerr JB. Functional cytology of the human testis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1992;6:235-250.

Keye WR Jr, Jaffe RB. Strength-duration characteristics of estrogen effects on gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in women. I. Effects of varying duration of estradiol administration. *J Clin Endocrinol Metab.* 1975;41:1003-1008.

Khan-Dawood FS, Dawood MY. Oxytocin content of human fetal pituitary glands. *Am J Obstet Gynecol.* 1984;148:420-423.

Khoury S, Yarows SA, O'Brien TK, Sowers JR. Ambulatory blood pressure monitoring in a nonacademic setting: effects of age and sex. *Am J Hypertens*. 1992;5:616-623.

Kimura F, Mitsugi N, Arita J, Akema T, Yoshida K. Effects of preoptic injections of gastrin, cholecystokinin, secretin, vasoactive intestinal peptide and PHI on the secretion of luteinizing hormone and prolactin in ovariectomized estrogen-primed rats. *Brain Res*. 1987;410:315-322.

Kimura N, Arai K, Sahara Y, Suzuki H, Kimura N. Estradiol transcriptionally and posttranscriptionally up-regulates thyrotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells. *Endocrinology*. 1994;134:432-440.

Kimura T, Takemura M, Nomura S, Nobunaga T, Kubota Y, Inoue T, Hashimoto K, Kumazawa I, Ito Y, Ohashi K, Koyama M, Azuma C, Kitamura Y, Saji F. Expression of oxytocin receptor in human pregnant endometrium. *Endocrinology*. 1996;137:7780-7785.

Kirschke H, Langner J, Wiederanders B, Ansorge S, Bohley P, Hanson H. Cathesin H: an endoaminopeptidase from rat liver lysosomes. *Acta Biol Med Ger*. 1977;36:185-199.

Kiss A. Morphological aspects of the median eminence-place of accumulation and secretion of regulatory neurohormones and neuropeptides. *Gen Physiol Biophys*. 1997;16:301-309.

Kitay JJ. Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. *Endocrinology*. 1961;68:818-824.

Kletzky OA, Marrs RP, Howard WF, McCormock W, Mishell DR Jr. Prolactin synthesis and release during pregnancy and puerperium. *Am J Obstet Gynecol*. 1980;136:545-550.

Knepper MA. Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin. *Am J Physiol*. 1997;272:3-12.

Knobil E. The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res*. 1980;36:53-88.

Kochakian CD. History, chemistry and pharmacodynamics of anabolic-androgenic steroids. *Wien Med Wochenschr*. 1993;143:359-363.

Kon Y. Local renin-angiotensin system: specially in coagulating glands of mice. *Arch Histol Cytol*. 1996;59:399-420.

Kordon C, Drouva SV, Martínez de la Escalera G, Weiner RI. Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: Knobil E, Neill JD (eds). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press. 1994;1621.

Kraus S, Naor Z, Seger R. Intracellular signaling pathways mediated by the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. *Arch Med Res*. 2001;32:499-509.

Kretser DM, Phillips DJ. Mechanism of protein feedback on gonadotropin secretion. *J Reprod Immunol*. 1998;39:1-12.

Kristiansson P, Wang JX. Reproductive hormones and blood pressure during pregnancy. *Hum Reprod*. 2001;16:13-17.

Kumai T. Gonadectomy-induced reduction of antihypertensive action of angiotensin converting enzyme inhibitor and its role of central renin activity in spontaneously hypertensive rats. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi*. 1991;20:1231-1239.

Kumai T, Tanaka M, Watanabe M. Possible involvement of androgen in increased norepinephrine synthesis in blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol*. 1994;66:439-444.

Kumai T, Tanaka M, Watanabe M, Nakura H, Kobayashi S. Influence of androgens on tyrosine hydroxylase mRNA in adrenal medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1995;26:208-212.

Kumar S, Berl T. Sodium. *Lancet*. 1998;352:220-228.

Kumaresan P, Kagan A, Glick SM. Oxytocin antibody and lactation and parturition in rats. *Nature*. 1971;230:468-469.

Lapresle C, Webb T. 1962. Citado en Barrett A J. Proteinases in mammalian cells and tissues. Amsterdam: North-Holland Publishing Company. 1977;9.

Lauffart B, McDermott JR, Biggins JA, Gibson AM, Mantle D. Purification and characterization of pyroglutamyl aminopeptidase from human cerebral cortex. *Biochem Soc Trans*. 1989;17:207-208.

Lawson DM. Evidence for a rapid in vivo effect on estradiol-17 on prolactin secretion in ovariectomized rats. *Endocr Res Commun*. 1979;6:135-148.

Laycock JF, Hanoune J. From vasopressin receptor to water channel: intracellular traffic, constraint and by-pass. *J Endocrinol*. 1998;159:361-372.

Lechan RM. Neuroendocrinology of pituitary hormone regulation. *Endocrinol Metab Clin N Amer*. 1987;16:475-501.

Lechan RM, Toni R. Thyrotropin-releasing hormone neural systems in the central nervous system. En: Nemeroff CB (ed). *Neuroendocrinology*. FL: CRC Press, Boca Raton. 1992;279-330.

Lechan RM, Wu P, Jackson IM, Wolf H, Cooperman S, Mandel G, Goodman RH. Thyrotropin-releasing hormone precursor: Characterization in rat brain. *Science*. 1986;231:159-161.

Lefebvre DL, Giaid A, Bennett H, Lariviere R, Zingg HH. Oxytocin gene expression in rat uterus. *Science*. 1992;256:1553-1555.

Lefebvre DL, Lariviere R, Zingg HH. Rat amnion: a novel site of oxytocin production. *Biol Reprod*. 1993;48:632-639.

Legros JJ, Geenen V. Neurophysins in central diabetes insipidus. *Horm Res*. 1996;45:182-186.

Lehman MN, Karsch FJ. Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase-, and beta-endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in the Suffolk ewe. *Endocrinology*. 1993;133:887-895.

Lemos JR, Wang G. Excitatory versus inhibitory modulation by ATP of neurohypophysial terminal activity physiology. *Exp Physiol*. 2000;85:67S-74S.

Leranth C, Segura LM, Palkovits M, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F. The LH-RH-containing neuronal network in the preoptic area of the rat: demonstration of LH-RH-containing nerve terminals in synaptic contact with LH-RH neurons. *Brain Res.* 1985;345:332.

Leranth C, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F. Immunohistochemical evidence for synaptic connections between pro-opiomelanocortin-immunoreactive axons and LH-RH neurons in the preoptic area of the rat. *Brain Res.* 1988;449:167.

Lesniewska B, Nowak M, Malendowicz LK. Sex differences in adrenocortical structure and function. XXVIII. ACTH and corticosterone in intact gonadectomised and gonadal hormone replaced rats. *Horm Metab Res.* 1990;22:378-381.

Leung PCK, Steele GL. Intracellular signalling in the gonads. *Endocr Rev.* 1992;13:467-498.

Leung K, Kim KE, Maurer RA, Landerfeld TD. Divergent changes in the concentrations of gonadotropin β -subunit messenger ribonucleic acid during the estrous cycle of sheep. *Mol Endocrinol.* 1988;2:272-276.

Levine JE, Ramírez VD. Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy, as estimated with push-pull cannulae. *Endocrinology.* 1982;111:1439-1448.

Li W, Ayata M, Terada N, Taniguchi H, Matsumoto K. Effect of androgen pretreatment at adulthood on androgen-induced proliferative response of seminal vesicles in neonatally castrated mice. *J Steroid Biochem.* 1989;33:59-63.

Lincoln DW, Wakerley JB. Electrophysiological evidence for the activation of supraoptic neurones during the release of oxytocin. *J Physiol.* 1974;242:533-554.

Lind RW. Sites of action of angiotensin in the brain. En: Harding JW, Wright JW, Speth RC, Barnes CD (eds.). *Angiotensin and Blood Pressure Regulation.* San Diego: Academic Press. 1988;135-163.

Lind T, Cameron EC, Hunter WH, Leon C, Moran PF, Oxley A, Gerrard J, Lind UC. A prospective, controlled trial of six forms of hormone replacement therapy given to postmenopausal women. *Br J Obstet Gynaecol.* 1979;86:1-29.

Linderstrom-Lang K. Über darmerepsin. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie, 1929;182, 151-174. Citado en: McDonald JK, Barret A J (eds). *Mammalian Proteases. A glossary and Bibliography.* Volume 2. Exopeptidases. Orlando: Academic Press. 1986;7.

Linzell JL. Recent advances in the physiology of the vdder. *Vet Ann.* 1961;2:44-53.

Lip GYH, Beevers M, Churchill D, Beevers DG. Hormone replacement therapy and blood pressure in hypertensive women. *J Hum Hypertens.* 1994;8:491-494.

Liposits Z. Ultrastructure of hypothalamic paraventricular neurons. *Crit Rev Neurobiol.* 1993;7:89-162.

Liu JH, Yen SS. Induction of midcycle gonadotropin surge by ovarian steroids in women: a critical evaluation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983;57:797-802.

Liu SR, Tsai SC, Lu CC, Lee KY, Liu TC, Pu HF, Wang PS. Interaction between triiodothyronine and ovarian steroid hormones on the regulation of the release of thyrotropin and thyrotropin-releasing hormone in vitro. *Chin J Physiol.* 1997;40:221-226.

Loosen PT. Hormones of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis: a psychoneuroendocrine perspective. *Pharmacopsychiatry* 1986;19:401-415.

Ludwig TE, Whiteaker SS, Carnahan KG, Tysseling KA, Mirando MA. Control of endometrial phosphoinositide hydrolysis and prostaglandin F₂α secretion in pigs. *Reprod Fertil Dev.* 1998;10:249-254.

Luft FC. Workshop: Mechanisms and Cardiovascular Damage in Hypertension. *Hypertension.* 2001;37:594.

Lumbers ER. Angiotensin and aldosterone. *Regul Pept.* 1999;80:91-100.

Lydon JP, DeMayo FJ, Conneely OM, O'Malley BW. Reproductive phenotypes of the progesterone receptor null mutant mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1996;56:67-77.

MacDonald PC, Edman CD, Hemsell DL, Porter JC, Siiteri PK. Effect of obesity on conversion of plasma androstenedione to estrone in postmenopausal women with and without endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 1978;130:448-455.

MacDonald PC, Rombaut RP, Siiteri PK. Plasma precursors of estrogen. I. Extent of conversion of plasma 4-androstenedione to estrone in normal males and non-pregnant normal, castrate, and adrenalectomized females. *J Clin Endocrinol Metab.* 1967;27:1103-1111.

Macklon NS, Fauser BCJM. Follicle-Stimulating Hormone and Advanced Follicle Development in the Human. *Arch Med Res.* 2001;32:595-600.

MacLusky NJ, Yuan M, Elliott J, Brown TJ. Sex differences in corticosteroid binding in the rat brain: an in vitro autoradiographic study. *Brain Res.* 1996;708:71-81.

Madigou T, Tiffoche C, Lazannec G, Pelletier J, Thieulant ML. The sheep estrogen receptor: cloning and regulation of expression in the hypothalamo-pituitary axis. *Mol Cell Endocrinol.* 1996;121:153-163.

Maggi M, Del Carlo P, Fantoni G, Giannini S, Torrisi C, Casparis D, Massi G, Serio M. Human myometrium during pregnancy contains and responds to V1 vasopressin receptors as well as oxytocin receptors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;70:1142-1154.

Maggi M, Magini A, Fiscella A, Giannini S, Fantoni G, Toffoletti F, Massi G, Serio M. Sex steroid modulation of neurohypophysial hormone receptors in human non pregnant myometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;74:385-392.

Maggi R, Pimpinelli F, Martini L, Piva F. Inhibition of luteinizing hormone releasing hormone secretion by delta-opioid agonists in Gt1-1 neural cells. *Endocrinology.* 1995;136:5177-5181.

Magiakou MA, Mastorakos G, Webster E, Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;17;816:42-56.

Mahesh VB, Brann DW. Regulation of the preovulatory gonadotropin surge by endogenous steroids. *Steroids*. 1998;63:616-629.

Malendowicz LK, Mlynarczyk W. Sex differences in adrenocortical structure and function. X. Lipid and corticosterone in the rat adrenal as affected by gonadectomy and testosterone replacement. *Endokrinologie* 1982;79:292-300.

Malpaux B, Thiery JC, Chemineau P. Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reprod Nutr Dev*. 1999;39:355-366.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995;83:835-839.

Manhem K, Ahlm H, Milsom I, Svensson A. Transdermal oestrogen reduces daytime blood pressure in hypertensive women. *J Hum Hypertens*. 1998;12:323-327.

Mann DR, Free C, Nelson C, Scott C, Collins DC. Mutually independent effects of adrenocorticotropin on luteinizing hormone and testosterone secretion. *Endocrinology*. 1987;120:1542-1550.

Manson JJ. The 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene family of enzyme. *TEM*. 1993;4:199-203.

Manwaring P, Morfis L, Diamond T, Howes LG. Effects of hormone replacement therapy on ambulatory blood pressure responses in normotensive women. *Blood Press*. 2000;9:22-27.

Marangell LB, George MS, Callahan AM, Ketter TA, Pazzaglia PJ, L'Herrou TA, Leverich GS, Post RM. Effects of intrathecal thyrotropin-releasing hormone (protirelin) in refractory depressed patients. *Arch Gen Psychiatry*. 1997;54:214-22.

Marc S, Leiber D, Harbon S. Corbachol and oxytocin stimulate the generation of inositol phosphate in the guinea pig miometrium. *FEBS Lett*. 1986;201:9-14.

Marks LS, Partin AW, Dorey FJ, Gomley GJ, Epstein JL, Garriss HB, Macarian ML, Shery ED, Santos PB, Stoner E, deKernion JB. Long term effects of finasterine on prostate tissue composition. *Urology*. 1999;53:574-580.

Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Paul SJ, Ortolano GA, Kelch RP. Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res*. 1991;47:155-187; discussion 188-9.

Martínez JM, Prieto I, Ramírez MJ, Alba F, Ramírez M. Cholesterol and steroids action on aminopeptidases. *Biochem Soc Trans*. 1997;25:113S.

Martínez JM, Ramírez MJ, Prieto I, Alba F, Ramírez M. Sex differences and in vitro effects of steroid on serum aminopeptidase activity. *Peptides*. 1998;19:1637-1640.

Martínez de la Escalera G, Clapp C. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion: insights from GT1 immortal GnRH neurons. *Arch Med Res*. 2001;32:486-498.

Maruyama M, Matsumoto H, Fujiwara K, Noguchi J, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Nishimura O, Fujino M, Higuchi T, Inoue K. Central administration of prolactin-releasing peptide stimulates oxytocin release in rats. *Neurosci Lett*. 1999;276:193-196.

Masubuchi Y, Kumai T, Uematsu A, Komoriyama K, Hirai M. Gonadectomy-induced reduction in blood pressure in adult spontaneously hypertensive rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1982;101:154-160.

Matsumoto AM, Bremner WJ. Modulation of pulsatile gonadotropin secretion by testosterone in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984;58:609-614.

Matsuo H, Baba Y, Nau RMG, Arimura A, Schally AV. Structure of the porcine LH and FSH releasing hormone. I. Proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971;43:1334-1339.

Matzuk MM. Revelation of ovarian follicle biology from gene knockout mice. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;163:61-66.

May A, Puoti A, Gaeggeler HP, Horisberger JD, Rossier BC. Early effect of aldosterone on the rate of synthesis of the epithelial sodium channel α subunit in A6 renal cells. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8:1813-1822.

Mazzocchi G, Malendowicz LK, Markowska A, Albertin G, Nussdorfer GG. Role of adrenal renin-angiotensin system in the control of aldosterone secretion in sodium-restricted rats. 2000;278:E1027-E1030.

McCann SM, Taleisnik S, Friedman HM. LH releasing activity in hypothalamic extract. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1960;82:432-434.

McCann SM, Antunes-Rodrigues J, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Karanth S, Rettori V. Role of the hypothalamic pituitary adrenal axis in the control of the response to stress and infection. *Braz J Med Biol Res*. 2000;3310:1121-1131.

McCormick CM, Furey BF, Child M, Sawyer MJ, Donohue SM. Neonatal sex hormones have 'organizational' effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of male rats. *Brain Res Dev Brain Res*. 1998;105:295-307.

McCormick CM, Linkroum W, Sallinen BJ, Miller NW. Peripheral and central sex steroids have differential effects on the HPA axis of male and female rats. *Stress*. 2002;5:235-247.

McDonald JK, Barret AJ. *Mammalian Proteases. A glossary and Bibliography. Exopeptidases*. Orlando: Academic Press. 1986.

McKinley MJ. Volume regulation of antidiuretic hormone secretion. *Curr Top Neuroendocrinol*. 1985;4:61-100.

Merchenthaler I, Sétáló G, Petrusz P, Negro-Vilar A, Flerkó B. Identification of hypophysiotropic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons by combined retrograde labeling and immunocytochemistry. *Exp Clin Endocrinol*. 1989;94:133-140.

Mercuro G, Zoncu S, Pilia I, Lao A, Melis GB, Cherchi A. Effects of acute administration of transdermal estrogen on postmenopausal women with systemic hypertension. *Am J Cardiol*. 1997;80:652-655.

Mercuro G, Zoncu S, Piano D, Piliab I, Laob A, Melis GB, Cherchia A. Estradiol-17 reduces blood pressure and restores the normal amplitude of the circadian blood pressure rhythm in postmenopausal hypertension. *Am J Hypertens*. 1998;11:909-913.

Miller WL, Strauss JF. Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1999;69:131-141.

Mintz E, Thomas SR, Mikulecky DC. Exploration of apical Na⁺ transport mechanisms in an epithelial model by network thermodynamic stimulation of the effect of mucosal Na⁺ depletion. II. An apical Na⁺ channel and amiloride blocking. *J Theor Biol*. 1986;123:21-34.

Minuth WW, Steckelings U, Gross P. Complex physiological and biochemical action of aldosterone in toad urinary bladder and mammalian renal collecting duct cells. *Ren Physiol*. 1988;10:297-310.

Mircic GM, Beleslin DB, Jankovic SM. Hormones of the posterior region of the hypophyseal gland. *Srp Arh Celok Lek*. 1998;126:111-118.

Mitchell BF, Fang X, Wong S. Oxytocin: a paracrine hormone in the regulation of parturition?. *Rev Reprod*. 1998;3:113-122.

Mitsuma T, Kayama M, Rhue N, Hirooka Y, Mori Y, Adachi K, Ping J, Nogimori T. Effect of anti-TRH-receptor antibody on corticosterone release from rat adrenal gland in vitro. *Endocr Regul*. 1996;30:129-131.

Moffett RB, Bumpus FM, Husain A. Minireview: cellular organization of the brain renin-angiotensin system. *Life Sci*. 1987;41:1867-1879.

Mohr E, Schmitz E. Functional characterization of estrogen and glucocorticoid responsive elements in the rat oxytocin gene. *Mol Brain Res*. 1991;9:293-298.

Montagne JJ, Ladram A, Nicolas P, Bulant M. Cloning of thyrotropin-releasing hormone precursor and receptor in rat thymus, adrenal gland and testis. *Endocrinology*. 1999;140:1054-1059.

Morel A, O'Carroll AM, Brownstein MJ, Lolait SJ. Molecular cloning and expression of a rat V1a arginine vasopressin receptor. *Nature*. 1992;356:523-526.

Morel A, Lolait SJ, Brownstein MJ. Molecular cloning and expression of rat V_{1a} and V₂ arginine vasopressin receptors. *Reg Pept*. 1993;45:53-59.

Mrnka L, Nováková O, Novák F, Tvrzická E, Pácha J. Aldosterone alters the phospholipid composition of rat colonocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2000;73:11-17.

Mudge AW, Fellows RE. Bovine pituitary pyroglutamate carboxyl peptidase. *Endocrinology*. 1973; 93:1428-1434.

Mueller GP, Chen HJ, Meites J. In vivo stimulation of prolactin release in the rat by synthetic TRH. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1973;144:613-615.

Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ. Expression cloning of type two angiotensin receptor reveals a unique class of seven trans membrane receptor. *J Biol Chem*. 1993;268:24539-24542.

Muller J. Regulation of aldosterone biosynthesis: the end of the road?. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*. 1998;25:S79-85.

Mulrow PJ. Adrenal renin: regulation and function. *Front Neuroendocrinol*. 1992;13:47-60.

Mulrow PJ. The adrenal cortical renin-angiotensin system. En: Robertson JIS, Nicholls MS (eds). *The renin angiotensin system*. London: Gower Medical Publishing. 1993; Chapter 1.

Mulrow PJ. Angiotensin II and aldosterone regulation. *Regul Pept*. 1999;80:27-32.

Mulrow PJ, Franco-Saenz R. The adrenal renin-angiotensin system: a local hormonal regulator of aldosterone production. *J Hypertens*. 1996;14:173-176.

Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature*. 1991;351:233-236.

Nagatsu T, Hino M, Fuyamada H, Hayakawa T, Sakakibara S, Nakagana Y, Takemoto T. New chromogenic substrates for X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase. *Anal Biochem*. 1976;74:466-476.

Narikiyo T, Kitamura K, Adachi M, Miyoshi T, Iwashita K, Shiraishi N, Nonoguchi H, Chen LM, Chai KX, Chao J, Tomita K. Regulation of prostesin by aldosterone in the kidney. *J Clin Invest*. 2002;109:401-408.

Nathwani PS, Kang SK, Cheng KW, Choi KC, Leung PC. Regulation of gonadotropin-releasing hormone and its receptor gene expression by 17beta-estradiol in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinology*. 2000;141:1754-1763.

Negus SS, Mello NK. Effects of gonadal steroid hormone treatment on opioid antinoception in ovariectomized rhesus monkeys. *Psychopharmacol*. 2002;159:275-283.

Neill JD, Patton JM, Dailey RA, Tsou RC, Tindall GT. Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in pituitary stalk blood of rhesus monkeys: Relationship to level of LH release. *Endocrinology*. 1977;101:430-434.

Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol*. 2001;45:S116-124.

Nickenig G, Baumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stablein A, Beckers F, Smits JFM, Daemen MJAP, Vetter H, Bohm M. Estrogen modulates A.T. 1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation*. 1998;97:2197-2201.

Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK, Knepper MA. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:1013-1017.

Nilsson E, Skinner MK. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *J Soc Gynecol Investig*. 2001;8:S17-S20.

Nishimori K, Young LJ, Guo Q, Wang Z, Insel TR, Matzuk MM. Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behaviour. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:11699-11704.

Notelovitz M. Effect of natural oestrogens on blood pressure and weight in postmenopausal women. *S Afr Med J*. 1975;49:2251.

Nyby JG, Simon NG. Nonaromatizable androgens may stimulate a male mouse reproductive behavior by binding estrogen receptors. *Physiol Behav*. 1987;39:147-151.

Nysel A, Skagerberg G, Alm P, Larsson B, Holmqvist B, Andersson KE. Nitric oxide synthase in the hypothalamus paraventricular nucleus of the female rat; organization of spinal projections and coexistence with oxytocin or vasopressin. *Brain Res*. 2001;908:10-24.

O'Connor B, O'Cuinn G. Localization of a narrow-specificity thyroliberin-hydrilysing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain. *Eur J Biochem*. 1984;144:271-278.

O'Malley BW, Tsai MJ. Molecular pathways of steroid receptor action. *Biol Reprod*. 1992;46:163-167.

O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Heikkila M, Vainio S, McMahon AP. Localization of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase isoform expression in the developing mouse testis-androstenedione is the major androgen secreted by fetal/neonatal leydig cells. *Endocrinology*. 2000;141:2631-2637.

Oliver G, Schafer EA. On the physiological actions of extracts of the pituitary body and certain other glandular organs. *J Physiol*. 1895;18:277-279.

Olofsson JI, Conti CC, Leung PCK. Homologous and heterologous regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in preovulatory rat granulosa cells. *Endocrinology*. 1995;136:974-980.

Olson DR, Blake ChA. Basal luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release rates as a function of time after castration in female and male rats. *Neuroendocrinology*. 1991;53:124-133.

Ordog T, Knobil E. Estradiol and the inhibition of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:5813-5816.

Ortmann O, Diedrich K. Pituitary and extrapituitary actions of gonadotrophin-releasing hormone and its analogues. *Hum Reprod*. 1999;14:194-206.

Otsuki Y, Yamaji K, Fujita M. Serial plasma oxytocin concentrations during pregnant and labor. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1983;62:15-18.

Ouchi Y, Share L, Crofton JT, Iitake K, Brooks DP. Sex differences in the development of deoxycorticosterone-salt hypertension in the rat. *Hypertension*. 1987;9:172-177.

Owens MJ, Nemeroff CB. The neurobiology of corticotropin-releasing factor: implication for affective disorders. En: Schatzberg AF, Nemeroff CB (eds). *The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: physiology, pathophysiology, and psychiatric implications*. New York: Raven Press, Ltd. 1988.

Palkovits M. Organization of the stress response at the anatomical level. *Prog Brain Res*. 1987;72:47-55.

Paradisi R, Frank G, Magrini O, Capelli M, Venturoli S, Porcu E, Flamigni C. Adenopituitary hormones in human hypothalamic hypophyseal blood. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;77:523-527.

Parker KL, Schimmer BP. Transcriptional regulation of the adrenal steroidogenic enzymes. *TEM*. 1993;4:46-50.

Parker MG. Transcriptional activation by oestrogen receptors. *Biochem Soc Symp*. 1998;63:45-50.

Pasetto N, Zicari A, Piccione E, Lenti L, Pontieri G, Ticconi C. Influence of labor and oxytocin on in vitro leukotriene release by human fetal membranes and uterine decidua at term gestation. *Am J Obstet Gynecol*. 1988;166:1500-1506.

Patchev VK, Almeida OFX. Gonadal steroids exert facilitating and buffering effects on glucocorticoid-mediated transcriptional regulation of corticotropin-releasing hormone and corticosteroid receptor genes in rat brain. *J Neurosci*. 1996;16:7077-7084.

Pau KYF, Spies HG. Estrogen-dependent effects of norepinephrine on hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release in the rabbit. *Brain Res*. 1986;399:15-23.

Paulmyer-Lacroix O, Héry M, Pugeat M, Grino M. The modulatory role of estrogens on corticotropin-releasing factor gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of ovariectomized rats: role of adrenal gland. *J Neuroendocrinol*. 1996;8:515-519.

Payne AH, Youngblood GL. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol Reprod*. 1995;52:217-225.

Peart WS. The renin-angiotensin system: a history and review of the renin-angiotensin system. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1969;173:317-325.

Pechnick RN. Effects of opioids on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1993;33:353-382.

Pekary AE, Sattin A. Regulation of TRH and TRH-related peptides in rat brain by thyroid and steroid hormones. *Peptides*. 2001;22:1161-1173.

Pekary AE, Knoble M, García NH, Bhasin S, Hershman JM. Testosterone regulates the secretion of thyrotrophin-releasing hormone (TRH) and TRH precursor in the rat hypothalamic-pituitary axis. *J Endocrinol*. 1990;125:263-270.

Peng C, Fan NC, Ligier M, Vaananen J, Leung PCK. Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH-R messenger ribonucleic acids in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology*. 1994;135:1740-1746.

Pérez-Martínez L, Carreón-Rodríguez A, González-Alzati ME, Morales C, Charli JL, Joseph-Bravo P. Examethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in Hypothalamic Cell Cultures: Interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology*. 1998;68:345-354.

Perlmann T, Evans RM. Nuclear receptors in Sicily: all in the famiglia. *Cell*. 1997;90:391-397.

Perrone MH, Hinkle PM. Regulation of pituitary receptors for thyrotropin-releasing hormone by thyroid hormone. *J Biol Chem*. 1978;253:5168-5173.

Peteranderl C, Antonijevic IA, Steiger A, Murck H, Held K, Frieboes RM, Uhr M, Schaaf L. Nocturnal secretion of TSH and ACTH in male patient with depression and healthy controls. *J Psychiatri Res*. 2002;36:189-196.

Petraglia F, Sutton S, Vale W, Plotsky P. Corticotropin-releasing factor decreases plasma luteinizing hormone release into hypophysial-portal circulation. *Endocrinology*. 1987;120:1083-1088.

Pfeffer RI. Estrogen use, hypertension and stroke in postmenopausal women. *J Chron Dis*. 1977;31:389-398.

Pfleiderer G, Celliers PG. Isolierung einer aminopeptidase aus nierenpartikeln. *Biochem Z*. 1963; 339:186-189.

Phaneuf S, Europe-Finner N, Varney M, Mackenzie IZ, Watson FP, Lopez-Bernal A. Oxytocin-stimulated phosphoinositide hydrolysis in human myometrial cells: involvement of pertussin-sensitive and -insensitive G proteins. *J Endocrinol*. 1993;136:497-509.

Phillips MI, Weyhenmeyer JA, Felix D, Ganten D. Evidence for an endogenous brain renin angiotensin system. *Fed Proc*. 1979;38:2260-2266.

Phillips MI. Functions of angiotensin in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*. 1987;49:413-435.

Phillips MI, Speakman EA, Kumura B. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin system. *Reg Pept*. 1993;43:1-20.

Phillips GB, Pinkernell BH, Jing TY. The association of hypotestosteronemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1994;14:1701-1706.

Phillips MI, Wang H, Kimura B, Speth RC, Ghazi N. Brain angiotensin and the female reproductive cycle. *Adv Exp Med Biol*. 1995;377:357-370.

Phillips MI, Heiniger F, Toffolo S. The role of brain angiotensin in thirst and AVP release induced by hemorrhage. *Regul Pept*. 1996;66:3-11.

Picton HM. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology*. 2001;55:1193-1210.

Pirke KM, Spyra B. Influence of starvation on testosterone-luteinizing hormone feedback in the rat. *Acta Endocrinol*. 1981;96:413-421.

Plant TM, Gay VL, Marshal GR, Arslman. Puberty in monkeys is triggered by chemical stimulation of the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:2506-2510.

Pliska V. Pharmacological approaches to the identification and classification of myometrial oxytocin receptors. *J Recept Res.* 1988; 8:245-259.

Pliska V. Pharmacological versus binding analysis of receptor system. How do they interplay? Myometrial cell receptors for oxytocin as a paradigm. *Experientia.* 1991; 476: 216-221.

Ponzo OJ, Cresta MA, Rondina D, Szwarcfarb B, Basabe JC, Scacchi P. Effect of a proteic diet and fasting on insulin, pancreatic noradrenaline and luteinizing hormone. Changes after 24-hour refeeding. *Neuroendocrinol Lett.* 2000;21:441-446.

Porter JC, Mical RS, Kamberi IA, Grazia YR. A procedure for the cannulation of the pars distalis in the rat. *Endocrinology.* 1970;87:197-201.

Porter JC, Nansel DD, Gudelsky GA, Foreman MM, Pilote NS, Parker CR Jr., Burrows GM, Bates GW, Madden JD. Neural control of gonadotropin secretion. *Fed Proc.* 1980;39:2896-2901.

Poulain DA, Wakerley JB, Dyball REJ. Electrophysiological differentiation of oxytocin- and vasopressin-secreting neurones. *Proc Roy Soc London B.* 1977;196:367-384.

Power RF, Lydon JP, Conneely OM, O'Malley BW. Dopamine activation of an orphan of the steroid receptor superfamily. *Science.* 1991;252:1546-1548.

Power RF, Conneely OM, O'Malley BW. New insights into activation of the steroid hormone receptor superfamily. *Trends Pharmacol Sci.* 1992;13:318-323.

Press EM, Porter RR, Cebra J. The isolation and properties of a proteolytic enzyme, cathepsin D, from bovine spleen. *Biochem J.* 1960;74:501-514.

Printz MP. Regulation of the brain angiotensin system: a thesis of multicellular involvement. *Clin Exp Hypertens A.* 1988;10:17-35.

Pripp U, Hall G, Csemiczky G, Eksborg S, Landgren BM, Schenck-Gustafsson K. A randomized trial on effects of hormone replacement therapy on ambulatory blood pressure and lipoprotein levels in women with coronary artery disease. *J Hypertens.* 1999;17:1379-1386.

Proudler AJ, Ahmed AI, Crook D, Fogelman I, Rymer JM, Stevenson JC. Hormone replacement therapy and serum angiotensin-converting enzyme activity in postmenopausal women. *Lancet.* 1995;346:89-90.

Prusak E, Siewinski M, Szewczuk A. A new fluorimetric method for the determination of gamma-glutamyltransferase activity in blood serum. *Clin Chim Acta.* 1980;107:21-26.

Przewlocki R, Przewlocka B, Lason W. Adaptation of opioid system to stress. En: Almeida OFX, Shippenberg TS (eds). *The neurobiology of opioid systems to stress.* Berlin: Springer-Verlag. 1991;229-243.

Quinones-Jenab V, Jenab S, Ogawa S, Funabashi T, Weesner GD, Plaff DW. Estrogen regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor messenger RNA in female rat pituitary tissue. *Mol Brain Res.* 1996;38:243-250.

Radhakrishnan R, Sim MK. Actions of D-amino acid-substituted analogues of des-Asp-angiotensin I on the central pressor action of angiotensin III. *Eur J Pharmacol.* 1995;294:337-339.

Raggenbass M. Vasopressin- and oxytocin-induced activity in the central nervous system: electrophysiological studies using in-vitro systems. *Prog Neurobiol.* 2001;64:307-326.

Raizada MK, Lu D, Sumners C. AT1 receptors and angiotensin actions in the brain and neuronal cultures of normotensive and hypertensive rats. En: Mukhopadhyay AK, Raizada MK (eds). *Current Concepts: Tissue Renin-angiotensin System as Local Regulators in Reproductive and Endocrine Organs.* New York: Plenum. 1994;331-348.

Ramírez VD, Dluzen DE. Release of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and neuroactive substances in unanesthetized animals as estimated with push-pull cannulae (PPC). *Biol Reprod.* 1987;36:59-76.

Ramírez VD, Feder HH, Sawyer CH. The role of brain catecholamines in the secretion of LH: a critical inquiry. En: Martini L, Ganong WF (eds). *Frontiers in neuro-endocrinology.* New York: Raven Press. 1984;27-87.

Ramírez-Expósito MJ, Mayas MD, García MJ, Ramírez M, Martínez-Martos JM. Pituitary aminopeptidase activities involved in blood-pressure regulation are modified by dietary cholesterol: sex differences. *Regul Pept.* 2001;102:87-92.

Rankin T, Soyak S, Dean J. The mouse zona pellucida: folliculogenesis, fertility and pre-implantation development. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;163:21-25.

Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J.* 1993;290:205-218.

Reckelhoff JF, Kellum JA Jr., Racusen LC, Hildebrandt DA. Long term dietary supplementation with L-arginine prevents age-related reduction in renal function. *Am J Physiol.* 1997;272:1768-1774.

Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1998;31:435-439.

Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K, Granger JP. Gender differences in hypertension in spontaneously hypertensive rats. Role of androgens and androgen receptor. *Hypertension.* 1999;34:920-923.

Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K. Gender differences in the development of hypertension in SHR: role of the renin-angiotensin system. *Hypertension.* 2000;35:480-483.

Reeck GR, deHaen C, Teller DC, Doolittle RF, Fitch WM, Dickerson RE, Chambon P, McLachlan AD, Margoliash E, Jukes TH, et al. "Homology" in proteins and nucleic acids: a terminology muddle and a way out of it. *Cell.* 1987;50:667.

Regensteiner JG, Hiatt WR, Byyny RL, Pickett CK, Woodard WD, Moore LG. Short-term effects of estrogen and progestin on blood pressure of normotensive postmenopausal women. *J Clin Pharmacol.* 1991;31:543-548.

Reid IA, Schwartz J. Role of vasopressin in the control of blood pressure. En: Martini L, Ganong WF (eds). *Frontiers in Neuroendocrinology.* New York: Raven Press; 1984;177-197.

Reif MC, Troutman SL, Schafer JA. Sustained response to vasopressin in isolated rat cortical collecting tubule. *Kidney Int.* 1984;26:725-732.

Reif MC, Troutman SL, Schafer JA. Sodium transport by rat cortical collecting tubule. *J Clin Invest.* 1986;77:1291.

Reilly RF, Ellison DH. Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology and molecular anatomy. *Physiol Rev.* 2000;80:277-313.

Reis FM, Cobellis L, Luisi S, Driul L, Florio P, Faletti A, Petraglia F. Paracrine/autocrine control of female reproduction. *Gynecol Endocrinol.* 2000;14:464-475.

Resta TC, Kanagy NL, Walker BR. Estradiol-induced attenuation of pulmonary hypertension is not associated with altered eNOS expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;280:L88-L97.

Rettori V, McCann SM. Role of nitric oxide and alcohol on gonadotropin release in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;840:185-193.

Rettori V, Belova R, Dees WL, Nyberg CL, Gimeno M, McCann SM. Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:10130-10134.

Reynolds RB, Walker BR, Synddall HE, Andrew R, Wood PJ, Whorwood CB, Phillips DIW. Altered control of cortisol secretion in adult men with low birth weight and cardiovascular risk factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:245-250.

Ribeiro RC, Kushner PJ, Baxter JD. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu Rev Med.* 1995;46:443-453.

Richards JS, Hedin L. Some molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Annu Rev Physiol.* 1988;50:441-463.

Richard S, Zingg HH. The human oxytocin gene promoter is regulated by estrogen. *J Biol Chem.* 1990; 265:6098-6103.

Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Rev.* 1994;15:725-751.

Richardson HC. Contractile tissues in the mammary gland with special reference to myoepithelium in the goat. *Proc Roy Soc London B.* 1949;136:30-45.

Rivera J, López Bernal A, Varney M, Watson SP. Inositol 1,4,5,-triphosphate and oxytocin binding in human myometrium. *Endocrinology.* 1990;127:155-162.

Rivest S, Rivier C. The role of corticotropin-releasing factor and interleukin-1 in the regulation of neurons controlling reproductive functions. *Endocrin Rev.* 1995;16:177-199.

Robertson GL, Berl T. Pathophysiology of water metabolism. En: Brenner BM (ed). *The kidney.* Philadelphia: W.B. Saunders. 2000:866-924.

Robertson GL, Shelton RL, Athar S. The osmoregulation of vasopressin. *Kidney Int.* 1976;10:25-37.

Robertson GL, Athar S, Shelton RL. Osmotic control of vasopressin function. En: *Disturbances in body fluid osmolality,* Washington, D.C.: Amer Physiol Soc. 1977;125-148.

Robinson AG, Fitzsimmons MD. Vasopressin homeostasis: coordination of synthesis, storage and release. *Reg Pept.* 1993;45:225-230.

Roby A, Willer JC, Bussel B. Effect of a synthetic enkephalin analogue on spinal nociceptive messages in human. *Neuropharmacol.* 1983;22:1121-1125.

Roelfsma F, van der Berg G, Frolich M, Veldhuis JD, van Eijk A, Buurman MM, Etman BH. Sex dependent alteration in cortisol reponse to endogenous adrenocorticotropin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77:234-240.

Romero R, Scoccia B, Mazor M, Wu YK, Benveniste R. Evidence for a local change in the progesterone/estrogen ratio in human parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;159:657-660.

Rondeel JMM, Klootwijk W, Linkels E, van Haasteren GAC, Greef WJ, Visser TJ. Regulation of thyrotropin releasing hormone in the posterior pituitary. *Neuroendocrinology.* 1995;61:421-429.

Roques BP, Noble F, Daugé V, Fournie-Zaluski MC, Beaumont A. Neutral endopeptidase 24.11., structure, inhibition and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1993;45:87-146.

Rosen M, Jameel ML, Barkan AL. Dexamethasone suppresses gonadotropin-releasing hormone (GNRH) secretion and has direct pituitary effects in male rats: differential regulation of GNRH receptor and gonadotropin responses to GNRH. *Endocrinology.* 1988;122:2873-2880.

Rosenthal T, Oparil S. Hypertension in women. *J Hum Hypertens.* 2000;14:691-704.

Rosmond R, Bjorntorp P. Blood pressure in relation to obesity, insulin and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in Swedish men. *J Hypertens.* 1998;16:1721-1726.

Rossier BC. 1996 Homer Smith Award Lecture. Cum grano salis: the epithelial sodium channel and the control of blood pressure. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8:980-992.

Rossmannith WG. Contemporary insights into the control of the corpus luteum function. *Horm Metab Res.* 1993;25:192-198.

Roth C, Schricker M, Lakomek M, Strege A, Heiden I, Luft H, Munzel U, Wuttke W, Jarry H. Autoregulation of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system during puberty: effects of antagonistic versus agonistic GnRH analogs in a female rat model. *J Endocrinol.* 2001;169:361-371.

Rott AW, Bongiovanni AM, Eberlein WR. Inhibition of thyroidal radioiodine uptake by human growth hormone. *J Pediatr.* 1970;76:422-429.

Rowland NE, Fregly MJ. Role of gonadal hormones in hypertension in the Dahl salt-sensitive rat. *Clin Exp Hypertens A.* 1992;14:367-375.

Roy AK, Tyagi RK, Song CS, Lavrovsky Y, Ahn SC, OH T, Chatterjee B. Androgen Receptor: Structural Domains and functional dynamics after Ligand-receptor interaction. *Ann NY Acad Sci.* 2001;949:44-57.

Rylance PB, Brincat M, Lafferty K, De Trafford JC, Brincat S, Parsons V, Studd JW. Natural progesterone and antihypertensive action. *Br. Med J.* 1985;5:13-14.

Saavedra JM. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev.* 1992;13:329-380.

Sanborn BM, Dodge K, Monga M, Qian A, Wang W, Yue C. Molecular mechanisms regulating the effects of oxytocin on myometrial intracellular calcium. *Adv Exp Med Biol.* 1998;449:277-286.

Sands JM, Nonoguchi H, Knepper MA. Vasopressin effects on urea and H₂O transport in inner medullary collecting duct subsegments. *Am J Physiol.* 1987;253:F823-F832.

Sariban-Sohraby S, Burg M, Wiesmann WP, Chiang PK, Johnson JP. Methylation increases Na⁺ transport into A6 apical membrane vesicles: possible mode of aldosterone action. *Science.* 1984;225:745-746.

Sarkar DK, Chiappa SA, Fink G, Sherwood NM. Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats. *Nature.* 1976;264:461-463.

Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type I-receptor. *Nature.* 1991;351:230-233.

Sasaki T, Ohno Y, Otsuka K, Suzawa T, Suzuki H, Saruta T. Oestrogen attenuates the increases in blood pressure and platelet aggregation in ovariectomized and salt loaded Dahl-salt sensitive rats. *J Hypertens.* 2000;18:911-917.

Sawchenko PE. Neuropeptides, the paraventricular nucleus and the integration of hypothalamic neuroendocrine and autonomic function. En: Taché Y, Cantin M (eds). *Neuropeptides and stress.* New York: Springer-Verlag. 1986;73-91.

Sawchenko PE, Imaki T, Potter E, Kovacs K, Imaki J, Vale W. The functional neuroanatomy of corticotropin-releasing factor. En: Chadwick DJ, Marsh J, Ackrill K (eds). *Corticotropin-releasing factor.* Chichester: Jphn Wiley & Sons Ltd. 1993;5-29.

Sawyer WH, Manning M. Experimental uses of neurohypophysial hormone analogs. *TEM.* 1989;48-50.

Schally AV, Redding TW, Bowers CY, Barrett JF. Isolation and properties of porcine thyrotropin-releasing hormone. *J Biol Chem.* 1969;244:4077-4088.

Schally AV, Arimura A, Baba Y, Nair RMG, Matsuo H, Redding TW, Debeljuk L, White WF. Isolation and properties of the FSH- and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun.* 1971;43:393-399.

Scharrer B. Neurosecretion: beginning a new direction in neuropeptide research. *Annu Rev Neurosci.* 1987;19:1-17.

Schipper I, Fauser BC, van Gaver EB, Zarutskie PW, Dahl KD. Development of a human granulosa cell culture model with follicle stimulating hormone responsiveness. *Hum Reprod.* 1993;8:1380-1386.

Schnebli HP, Phillipps MA, Barclay RK. Isolation and characterization of an enkephalin-degrading aminopeptidase from rat brain. *Biochim Biophys Acta.* 1979;569:89-98.

Schneider WJ. Pathogenesis and pathomechanism of coronary heart disease (atherosclerosis). *Familial hypercholesterolemia: dissection of a receptor disease.* *Z Kardiol.* 1990;79:3-7.

Schomburg L, Bauer K. Regulation of the adenohipophyseal Thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme by estradiol. *Endocrinology*. 1997;138:3587-3593.

Schubert B, Fassnacht M, Beuschlein F, Zenkert S, Allolio B, Reincke M. Angiotensin II type 1 receptor and ACTH receptor expression in human adrenocortical neoplasms. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001;54:627-632.

Schunkert H, Danser AHJ, Hense HW, Derkx FHM, Kurzinger S, Riegger GAJ. Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation*. 1997;95:39-45.

Schwabe C, McDonald JK. Intracellular exopeptidases. En: Barret AJ (ed). *Proteinases in mammalian cells and tissues*. Amsterdam. 1977;331-391.

Schwartz J, Cherny R. Intercellular communication within the anterior pituitary influencing the secretion of hypophysial hormones. *Endocr Rev*. 1992;13:453-475.

Scott LV, Dinan TG. Vasopressin as a target for antidepressant development: an assessment of the available evidence. *J Affect Disord*. 2002;72:113-124.

Seeburg PH, Adelman JP. Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. *Nature*. 1984;311:666-668.

Seeburg PH, Mason AJ, Stewart TA, Nikolics K. The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction. *Rec Prog Horm Res*. 1987;43:69-98.

Seely EW, Walsh BW, Gerhard MD, Williams GH. Estradiol with or without progesterone and ambulatory blood pressure in postmenopausal women. *Hypertension*. 1999;33:1190-1194.

Segerson TP, Kauer J, Wolfe HC, Mobtaker H, Wu P, Jackson IMD, Lechan RM. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science*. 1987;238:78-80.

Sellers MEK, Sidhu PS. Pictorial review: ultrasound appearances of the rete testis. *Eur J Ultrasound*. 2001;14:115-120.

Seron-Ferre M, Taylor NF, Martin MC, Leake RD. Development of a circadian variation of plasma oxytocin concentration in the late gestation rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metabol*. 1991;72:1323-1327.

Shacham S, Harris D, Ben-Shlomo H, Cohen I, Bonfil D, Przeddecki F, Lewy H, Ashkenazi IE, Seger R, Naor Z. Mechanism of GnRH receptor signaling on gonadotropin release and gene expression in pituitary gonadotrophs. *Vitam Horm*. 2001;63:63-90.

Shechter CB, Matsumoto AM, Bremner WJ. Testosterone administration inhibits gonadotropin secretion by an effect on the human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;68:397-401.

Sheffield LG. Hormonal regulation of epidermal growth factor receptor content and signaling in bovine mammary tissue. *Endocrinology*. 1998;139:4568-4575.

Sherwood NM, Fink G. Effect of ovariectomy and adrenalectomy on luteinizing hormone-releasing hormone in pituitary stalk blood from female rats. *Endocrinology*. 1980;106:363-367.

Shimamura K, Kusaka M, Sperelakis N. Oxytocin induces an inward current in pregnant rat myometrial cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 1994;72:759-763.

Shivers BD, Harlan R, Morrel J, Pfaff DW. Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature.* 1984;304:345-347.

Shoji H, Kaneko Y. Characterization and expression of oxytocin and the oxytocin receptor. *Mol Genet Metab.* 2000;71:552-558.

Shupnik MA. Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone. *Biol Reprod.* 1996;54:279-286.

Siamopoulos KC, Papanikolaou S, Elisaf M, Theodorou J, Pappas H, Papanikolaou N. Ambulatory blood pressure monitoring in normotensive pregnant women. *J Hum Hypertens.* 1996;10:S51-S54.

Silva JM, Price CA. Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro. *Biol Reprod.* 2000;62:186-191.

Silverman AJ, Jhamandas J, Renaud LP. Localization of luteinizing hormone releasing-hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence. *J Neurosci.* 1987;7:2312-2319.

Simone DA, Mahesh VB. An autoregulatory process for androgen production in rat thecal-interstitial cells. *Biol Reprod.* 1993;48:46-56.

Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev.* 1997;18:739-773.

Simpson SAS. Physicochemical methods of detection of a previously unidentified adrenal hormone. *Memoirs Soc Endocrinol.* 1953;2:9-24.

Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, It Y, Fisher CR, Dodson MM, Mendelson CR, Bulun SE. Aromatase cytochrome p450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev.* 1994;15:342-355.

Simpson ER, Michael MD, Agarwal VR, Hinshelwood MM, Bulun SE, Zhao Y. Expression of the CYP19 (aromatase) gene: an unusual case of alternative promoter usage. *FASEB J.* 1997;11:29-36.

Singh H, Kalnitsky G. α -N-benzoylarginine- β -naphthylamide hydrolase, an aminoendopeptidase from rabbit lung. *J Biol Chem.* 1980;255:369-374.

Sjöholm I, Yman L. Degradation of oxytocin, lysine vasopressin, angiotensin II and angiotensin II amide by oxytocinase (Cystine aminopeptidase). *Acta Pharm Suecica.* 1967;4:65-76.

Snyder PJ, Utiger RD. Inhibition of thyrotropin response to thyrotropin-releasing hormone by small quantities of thyroid hormones. *J Clin Invest.* 1972;51:2077-2084.

Soloff MS. Oxytocin receptors and mechanism of oxytocin action. En: Amico JA, Robinson AG (eds). Oxytocin: Clinical and laboratory studies. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV. 1985;259-275.

Soloff MS, Rees HD, Sar M, Stumpf WE. Autoradiographic localization of radioactivity from [³H]-oxytocin in the rat mammary gland and oviduct. *Endocrinology*. 1975;96:1475-1477.

Soloff MS, Alexandrova M, Fernstrom MJ. Oxytocin receptors: triggers for parturition and lactation. *Science*. 1979; 204:1313-1315.

Soloff MS, Chakraborty J, Sadhukan P, Senitzer D, Wieder M, Fernstrom MA, Sweet P. Purification and characterization of mammary myoepithelial and secretory cells from the lactation rat. *Endocrinology*. 1980;106:887-899.

Soloff MS, Fernstrom MJ, Periyasamy S, Soloff S, Baldwin S, Wieder M. Regulation of oxytocin receptor concentration in rat uterine explants by oestrogen and progesterone. *Can J Biochem Cell Biol*. 1983;61:625-630.

Sorensen MB, Rasmussen V, Jensen G, Ottesen B. Temporal changes in clinic and ambulatory blood pressure during cyclic post-menopausal hormone replacement therapy. *J Hypertens*. 2000;18:1387-1391.

Spackman DH, Smith E L, Brown DM. Leucine aminopeptidase IV. Isolation and properties of the enzyme from swine kidney. *J Biol Chem*. 1955; 212:255-269.

Staessen J, Bulpitt CJ, Fagard R, Lijnen P, Amery A. The influence of menopause on blood pressure. *J Hum Hypertens*. 1989;3:427-433.

Staessen JA, Ginnochio G, Thijs L, Fagard R. Conventional and ambulatory blood pressure and menopause in a prospective population study. *J Hum Hypertens*. 1997;11:507-514.

Steel RGD, Torrie JH. Principles and Procedures of Statistics. New York: McGraw-Hill. 1960.

Stern JE, Ludwig M. NO inhibits supraoptic oxytocin and vasopressin neurons via activation of GABAergic synaptic inputs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;280:R1815-1822.

Stocco DM. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol*. 2000;164:247-253.

Stocco DM. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annual review of physiology*. 2001;63:193-213.

Stockand JD, Edinger RS, Al-Badawi NF, Sariban-Sohraby S, Al-Khalili OK, Eaton DC, Johnson JP. Isoprenylcysteine-O-carboxyl methyltransferase regulates aldosterone-sensitive Na⁺ reabsorption. *J Biol Chem*. 1999a;274:26912-26916.

Stockand JD, Spier B, Worrell RT, Yue G, Al-Badawi NF, Eaton DC. Regulation of Na⁺ reabsorption by the aldosterone-induced small G protein K-Ras2A. *J Biol Chem*. 1999b;274: 35449-35455.

Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev*. 1994;15:462-499.

Stolk RP, Lamberts SWJ, de Jong FH, Pols HAP, Grobbee DE. Gender differences in the associations between cortisol and insulin sensitivity in healthy subjects. *J Endocrinol.* 1996;149:313-318.

Swaab DF, Hoffman MA, Lucassen PJ, Purba JS, Raadsheer FC, Van De Nes JAP. Functional neuroanatomy and neuropathology of the human hypothalamus. *Anat Embryol.* 1993;187:317-30.

Swanson LW, Sawchenko PE, Lind RW. Regulation of multiple peptides in CRF parvocellular neurosecretory neurons: implications for the stress response. *Prog Brain Res.* 1986;68:169-190.

Swanson LW, Sawchenko PE, Lind RW, Rho JH. The CRH motoneuron: differential peptide regulation in neurons with possible synaptic, paracrine, and endocrine outputs. *Ann N Y Acad Sci.* 1987;512:12-23.

Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JK, Wright JW, Hall KL, Miller-wing AV, Stobb JW, Cook VI, Harding EC, Harding JW. Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin for a receptor. *Regul Pept.* 1992;40:409-419.

Szczepanska-Sadowska E. Interaction of vasopressin and Ang II in the central control of blood pressure and thirst. *Regul Pept.* 1996;66:65-71.

Szekacs B, Vajo Z, Acs N, Hada P, Csuzi L, Bezeredi J, Magyar Z, Brinton EA. Hormone replacement therapy reduces mean 24-hour blood pressure and its variability in postmenopausal women with treated hypertension. *Menopause.* 2000;7:31-35.

Szekely JJ. Opioid peptides and stress. *Crit Rev Neurobiol.* 1990;6:1-12.

Takada J, Matsusaka T, Katori H, Tamura M, Miyazaki Y, Homma T, Ichikawa I. In situ demonstration of angiotensin-dependent and independent pathways for hyperaldosteronism during chronic extracellular fluid volume depletion. *Mol Endocrinol.* 2001;15:2229-2235.

Takagi M, Atarashi K, Matsuoka H, Sugimoto T. A biphasic effect of noradrenaline on renin release from rat juxtaglomerular cells in vitro is mediated by alpha 1- and beta- adrenoceptors. *J Endocrinol.* 1992;132:133-140.

Tallan HH, Jones ME, Fruton JS. On the proteolytic enzymes of animal tissues. X beef spleen cathepsin C. *J Biol Chem.* 1952;194:793-805.

Tamarkin L, Hutchison JS, Goldman BD. Regulation of serum gonadotropins by photoperiod and testicular hormone in the Syrian hamster. *Endocrinology.* 1976;99:1528-1533.

Tamura T, Kitawaki J, Yamamoto T, Osawa Y, Kominami S, Takemori S, Okada H. Immunohistochemical localization of 17 α -hydroxylase/c 17-20 lyase and aromatase cytochrome P450 in the human ovary during the menstrual cycle. *J Endocrinol.* 1992;135:589-595.

Tang TK, Wang SW, Wang PS. Effects of thyroidectomy and thyroxine replacement on the responsiveness of the anterior pituitaries from male rats to thyrotropin-releasing hormone in vitro. *Experientia.* 1986;42:1031-1034.

Tapanainen J, Kauppila A, Metsä-Ketelä T, Vapatalo H. Prostanoids and catecholamines after oral administration of natural progesterone. *Gynecol Endocrinol.* 1989;3:135-142.

Taraskevich PA, Douglas DW. Action potentials occur in cells of the normal pituitary gland and are stimulated by the hypophysiotropic peptide thyrotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74:4064-4067.

Taylor WL, Disson JE. Characterization of a pyroglutamate aminopeptidase from rat serum that degrades thyrotropin-releasing hormone. *J Biol Chem*. 1978;253:6934-6940.

Teitelbaum I. Hormone signaling systems in inner medullary collecting ducts. *Amer J Physiol*. 1992;263:F985-990.

Tejedor-Real P, Mico JA, Maldonado R, Roques BP, Gibert-Rahola J. Implication of opioid system in the learned helplessness model of depression. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995;52:145-152.

Terris J, Ecelbarger CA, Nielsen S, Knepper MA. Long-term regulation of four renal aquaporins in rat. *Am J Physiol*. 1996;271:F414-F422.

Theobald GU, Robards MF, Suter T. Changes in myometrial sensitivity to oxytocin in man during the last six weeks of pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw*. 1969;76:385-390.

Thibonnier M. Signal transduction of V₁-vascular vasopressin receptors. *Reg Pept*. 1992;38:1-11.

Thibonnier M, Berti-Mattera LN, Dulin N, Conarty DM, Mattera R. Signal transduction pathways of the human V₁-vascular, V₂-renal, V₃-pituitary vasopressin and oxytocin receptors. *Prog Brain Res*. 1998;119:147-161.

Thornton S, Davison J, Baylis PH. Plasma oxytocin during the first and second stages of spontaneous human labour. *Acta Endocrinol*. 1992;126:425-429.

Thrasher TN. Circumventricular organs, thirst and vasopressin secretion. En: Schrier RW (ed). *Vasopressin*. New York: Raven Press. 1985;311-318.

Thurman JD, Creasia DA, Trotter RW. Effects of testosterone on the prevention of T-2 toxin-induced adrenocortical necrosis in mice. *A J Vet Res*. 1989;50:942-944.

Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JAM, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonist. *Pharmacol Res*. 1993;45:205-251.

Tindal JS, Knaggs GS. Determination of the detailed hypothalamic route of the milk-ejection reflex in the guinea pig. *J Endocrinol*. 1971;50:135-152.

Tobe H, Kojima F, Aoyagi T, Umezawa H. Purification by affinity chromatography using amastatin and properties of aminopeptidase A from pig kidney. *Biochim Biophys Acta*. 1980;613:459-468.

Toni R, Jackson IM, Lechan RM. Thyrotropin-releasing-hormone-immunoreactive innervation of thyrotropin-releasing-hormone-tuberoinfundibular neurons in rat hypothalamus: anatomical basis to suggest ultrashort feedback regulation. *Neuroendocrinology*. 1990;52:422-428.

Tsafiriri A, Adashi EY. Local nonsteroidal regulators of ovarian function. En: Knobil E, Neil JD (eds). *The Physiology of Reproduction*. New York: Ravens Press Ltd. 1994;817-860.

Tsafriri A, Reich R. Molecular aspects of mammalian ovulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1999;107:1-11.

Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:451-486.

Tse A, Hille B. GnRH-Induced Ca^{2+} oscillations and rhythmic hyperpolarizations of pituitary gonadotropes. *Science*. 1992;255:462-464.

Tsukahara T, Ishiura S, Sugita H. An ATP-dependent protease and ingensin, the multicatalytic proteinase, in K562 cells. *Eur J Biochem*. 1988;177:261-266.

Turek FW. The interaction of photoperiod and testosterone in regulation of serum gonadotropin levels in castrated male hamsters. *Endocrinology*. 1977;101:1210-1215.

Turner BB, Weaver DA. Sexual dimorphism of glucocorticoid binding in rat brain. *Brain Res*. 1985;343:16-23.

Unger T, Badoer E, Ganten D, Lang RE, Rettig R. Brain angiotensin: pathways and pharmacology. *Circulation*. 1988;77:140-154.

Uribe RM, Joseph-Bravo P, Pasten J, Ponce G, Mendez M, Covarrubias L, Charli JL. Some events of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology*. 1991;54:493-498.

Utian WH. Effect of postmenopausal estrogen therapy on diastolic blood pressure and body weight. *Maturitas*. 1978;1:3.

Vale W, Rivier C, Brazeau P, Guillemin R. Effects of somatostatin on the secretion of thyrotropin and prolactin. *Endocrinology*. 1974;95:968-977.

Vamvakopoulos NC, Chrousos GP. Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin releasing hormone gene expression. Potential implications for the sexual dimorphism of the stress response and immune/inflammatory reaction. *J Clin Invest*. 1993;92:1896-1902.

Van Acker SA, Oitzl MS, Fluttert MF, de Kloet ER. Centrally regulated blood pressure response to vasoactive peptides is modulated by corticosterone. *J Neuroendocrinol*. 2002;14:56-63.

Van Houten M, Mangiapane ML, Reid IA, Ganong WF. [Sar1,Ala8] angiotensin II in cerebrospinal fluid blocks the binding of blood-borne ^{125}I -angiotensin II to the circumventricular organs. *Neuroscience*. 1983;10:1421-1426.

Van Ittersum FJ, van Baal MW, Kenemans P, Mijatovic V, Donker JM, van der Mooren MJ, Stehouweret CDA. Ambulatory. Ambulatory-not office-blood pressures decline during hormone replacement therapy in healthy postmenopausal women blood pressure decline during hormone replacement therapy in healthy postmenopausal women. *Am J Hypertens*. 1998;11:1147-1152.

Vanecek J, Klein DC. Melatonin inhibition of GnRH-induced LH release from neonatal rat gonadotroph. Involvement of Ca^{2+} not cAMP. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1995;32:E85-E90.

Varghese FP, Brown ES. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in major depressive disorder: A brief primer for primary care physicians. *Primare Care Companion J Clin Psychiatry*. 2001;3:151-155.

Verney EB. The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. *Proc Soc Lond B Biol Sci*. 1947;135:25-106.

Verrey F. Early aldosterone action: toward filling the gap beteen transcription and transport. *Am J Physiol*. 1999;277:F319-F327.

Viau V. Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and -adrenal axes. *J Neuroendocrinol*. 2002;14:506-513.

Viau V, Meaney MJ. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology*. 1991;129:2503-2511.

Viau V, Meaney MJ. The inhibitory effect of testosterone on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress is mediated by the medial preoptic area. *J Neurosci*. 1996;16:1866-1876.

Viau V, Chu A, Soriano L, Dallman MF. Independet and overlapping effects of corticosterone and testosterone on corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and stress-induced adrenocorticotropic hormone release. *J Neurosci*. 1999;16:6684-6693.

Vila-Porcile E, Corvol P. Angiotensinogen, prorenin and renin are co-localized in the secretory granules of all glandular cells of the rat anterior pituitary: an immunoultrastructural study. *J Histochem Cytochem*. 1998;46:301-311.

Vinson, GP. The adrenal renin/angiotensin system. *Adv Exp Med Biol*. 1995;377:37-251.

Volpe M, Gigante B, Enea I, Porcellini A, Russo R, Lee MA, Magri P, Condorelli G, Savoia C, Lindpaintner K, Rubattu S, Role of tissue renin in the regulation of aldosterone biosynthesis in the adrenal cortex of nephrectomized rats. *Circ Res*. 1997;85:857-864.

Wade N. Guillemin and Schally. *Science*. 1978;200:279-282;411-415;510-513.

Wagner KU, Young WS 3rd, Liu X, Ginns EI, Li M, Furth PA, Hennighausen L. Oxytocin and milk removal are required for post-partum mammary-gland development. *Genes Funct*. 1997;1:233-244.

Wakerley JB, Dyball RE, Lincoln DW. Milk ejection in the rat: the result of a selective release of oxytocin. *J Endocrinol*. 1973;57:557-558.

Waldschmidt-Leitz E, Purr A. Über proteinase und carboxylpolypeptidase aus pankreas (XVII mitterlung zur specifität tierischer proteasen). *Berichte*. 1929;62B:956-962. Citado en: McDonald JK, Barret AJ (eds). *Mammalian Proteases. A glossary and Bibliography. Exopeptidases*. Orlando: Academic Press. 1986;7.

Walker BR, Phillips DI, Noon JP, Panarelli M, Andrew R, Edwards HV, Holton DW, Seckl JR, Webb DJ, Watt GC. Increased glucocorticoid activity in men with cardiovascular risk factors. *Hypertension*. 1998;31:891-895.

Wang PS, Huang SW, Tung YF, Pu HF, Tsai SC, Lau CP, Chien EJ, Chien CH. Interrelationship between thyroxine and estradiol on the secretion of thyrotropin-releasing hormone and dopamine into hypophyseal portal blood in ovariectomized-thyroidectomized rats. *Neuroendocrinology*. 1994a;59:202-207.

Wang YX, Crofton JT, Liu H, Brooks DP, Share L. Effects of gonadectomy on sexually dimorphic antidiuretic action of vasopressin in conscious rats. *Am J Physiol*. 1994b;267:R536-R541.

Wang YX, Crofton JT, Liu H, Sato K, Brooks DP, Share L. Estradiol attenuates the antidiuretic action of vasopressin in ovariectomized rats. *Am J Physiol*. 1995;268:R951-R957.

Ward PE, Benter IF, Dick L, Wilks L. Metabolism of vasoactive peptides by plasma and purified renal aminopeptidase M. *Biochem Pharmacol*. 1990; 40:1725-1732.

Watson RE, Langub MC, Landis JW. Further evidence that most LHRH neurons are not directly estrogen responsive: Simultaneous localization of LHRH and estrogen-receptor immunoreactivity in the guinea pig brain. *J Neuroendocrinol*. 1992;4:311-317.

Watt GC, Harrap SB, Foy CJ, Holton DW, Edwards HV, Davidson HR, Connor JM, Lever AF, Fraser R. Abnormalities of glucocorticoid metabolism and renin-angiotensin system: a four corners approach to the identification of the genetic determinant of blood pressure. *J Hypertens*. 1992;10:473-482.

Webb EC. Enzyme nomenclature: a personal perspective. *FASEB J*. 1993;7:1192-1194.

Weeke A, Weeke J. The 24-hour pattern of serum TSH in patients with endogenous depression. *Acta Psychiatr Scand*. 1980;62:69-74.

Weiss NS. Relationship of menopause to serum cholesterol and arterial pressure: The United States Health Examination Survey of Adults. *Am J Epidemiol*. 1972;96:237-241.

Weiss J, Jameson JL. Perfused pituitary cells as a marker for studies of gonadotropin biosynthesis and secretion. *TEM*. 1993;4:265-270.

Welsh THJ, Bambino TH, Hsueh AJ. Mechanism of glucocorticoid-induced suppression of testicular androgen biosynthesis in vitro. *Biol Reprod*. 1982;27:1138-1146.

Whitnall MH. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol*. 1993;40:573-629.

Whitworth JA, Kelly JJ, Brown MA, Williamson PM, Lawson JA. Glucocorticoids and hypertension in man. *Clin Exp Hypertens*. 1997;19:871-884.

Whitworth JA, Mangos GJ, Kelly JJ. Cushing, cortisol and cardiovascular disease. *Hypertension*. 2000;36:912-916.

Wiesmann WP, Johnson JP, Miura GA, Chiang PK. Aldosterone-stimulated transmethylation are linked to sodium transport. *Am J Physiol*. 1985;248:F43-F47.

Wiinberg N, Hoegholm A, Christense HR, Bang IE, Mikkelsen KL, Nielsen PE, Svendsen TL, Kampmann JP, Madsen NH, Bentzen NW. 24-h ambulatory blood pressure in 352 normal Danish subjects, related to age and gender. *Am J Hypertens*. 1995;8:978-986.

Wilber JF. Thyrotropin and growth hormone releasing activity in hypophysial portal blood. *Endocrinology*. 1970;87:807-811

Wilber JF, Xu AH. The thyrotropin-releasing hormone gene cloning, characterization and transcriptional regulation in the central nervous system, heart and testis. *Thyroid*. 1998;8:897-901.

Wilk S, Wilk E, Magnusson RP. Purification, characterization and cloning of a cytosolic aspartyl aminopeptidase. *J Biol Chem*. 1998;273:15961-15970.

Wilson T, Liggins GC, Whittaker DJ. Oxytocin stimulates the release of arachidonic acid and prostaglandin F_{2α} from human decidual cells. *Prostaglandins*. 1988;35:771-780.

Wilson L, Parsons MT, Flouret G. Inhibition of spontaneous uterine contractions during the last trimester in pregnant baboons by an oxytocin antagonist. *Am J Obstet Gynecol*. 1990;163:1875-1882.

Wittner MA, Di Stefano A, Mandon B, Roinel N, de Rouffignac C. Stimulation of NaCl reabsorption by antidiuretic hormone in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of the mouse. *Pflügers Arch*. 1991;419:212-214.

Wong PC, Chiu AT, Duncia JD, Herblin WF, Smith RD, Timmermans PBMWM. Angiotensin II receptor antagonists and receptor subtypes. *TEM*. 1992;3:211-217.

Wray S, Hoffman G. A developmental study of the quantitative distribution of LHRH neurons within the central nervous system of postnatal male and female rats. *J Comp Neurol*. 1986;252:522-531.

Wren BG, Routledge DA. Blood pressure changes. Oestrogens in climacteric women. *Med J Aust*. 1981;2:528-531.

Wright JW, Harding JW. Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Res Rev*. 1992;17:227-262.

Wright JW, Krebs LT, Stobb JW, Harding JW. The angiotensin IV system: Functional implications. *Front Neuroendocrinol*. 1995;16:23-52.

Yamada M, Mori M. Thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in human serum is classified as type II of pyroglutamyl aminopeptidase: influence of thyroid status. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1990;194:346-351.

Yamada M, Radovick S, Wondisford FE, Nakayama Y, Weintraub BD, Wilber JF. Cloning and structure of human genomic DNA and hypothalamic cDNA encoding human preprothyrotropin-releasing hormone. *Mol Endocrinol*. 1990;4:551-556.

Yamashita H. Effect of baro- and chemoreceptor activation on supraoptic nuclei neurons in the hypothalamus. *Brain Res*. 1977;126:551-556.

Young EA. The role of gonadal steroids in hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation. *Crit Rev Neurobiol*. 1995;9:371-381.

Yong EL, Hillier SG, Turner M, Baird DT, Ng SC, Bongso A, Ratnam SS. Differential regulation of cholesterol side-chain cleavage (P450_{scc}) and aromatase (P450_{arom}) enzyme mRNA expression by gonadotrophins and cyclic AMP in human granulosa cells. *J Mol Endocrinol*. 1994;12:239-249.

Young W, Shepard E, Amico J, Hennighausen L, Wagner KU, LaMarca ME, McKinney C, Ginns EI. Deficiency in mouse oxytocin prevents milk ejection, but not fertility or parturition. *J Neuroendocrinol.* 1996;8:847-853.

Zahn V. Uterine contractions during pregnancy. *J Perinat Med.* 1984;12:107-113.

Zeeman GG, Khan-Dawood FS, Dawood MY. Oxytocin and its receptors. *Obstet Gynecol.* 1997;89:873-883.

Zelevnik AJ. Modifications in gonadotropin signaling: a key to understanding cyclic ovarian function. *J Soc Gynecol Investig.* 2001;8:S24-S25.

Zelevnik AJ, Kubik CJ. Ovarian responses in macaques to pulsatile infusion of FSH and LH: Increased sensitivity of the maturing follicle to FSH. *Endocrinology.* 1986;119:2025-2031.

Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:11968-11973.

Zini S, Demasse Y, Fournier-Zaluski MC, Bischoff L, Corvol P, Llorens-Cortes C, Sanderson C. Inhibition of vasopressinergic neurons by central injection of a specific aminopeptidase A inhibitor. *Neuroreport.* 1998;9:825-828.

