

Área de Fisiología
Departamento de Ciencias de la Salud
Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud
Universidad de Jaén

EFFECTO DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES α_1 -ADRENÉRGICOS CON DOXAZOSINA SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS AMINOPEPTIDASAS REGULADORAS DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EN EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIOS.

Susana de la Chica Rodríguez
Trabajo de Investigación Tutelado
Jaén, 2006

Esta Memoria de Investigación Tutelada ha sido realizada en el Área de Fisiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén, dentro del Grupo de Investigación de la Junta de Andalucía denominado “Fisiología y Patología Experimental y Clínica” (código CVI-296), y bajo la dirección de los Dres. María Jesús Ramírez Expósito y José Manuel Martínez Martos. Los resultados obtenidos han sido enviados para su publicación a la revista *Fertility and Sterility*.

Para la realización de este trabajo se ha contado con la financiación del Proyecto concedido por Pfizer Global Pharmaceuticals Inc. (Nueva York, Estados Unidos) y las Ayudas de Investigación de la Junta de Andalucía.

1.- INTRODUCCIÓN.

1.1.- EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO.

Uno de los medios por los cuales el sistema nervioso controla la actividad corporal es el aumento o la disminución de la secreción de muchas hormonas en el organismo. Estas hormonas, a su vez, controlan muchas de las funciones metabólicas corporales y la reproducción. El área del sistema nervioso a cargo de este sistema global es el hipotálamo, que controla la secreción por la hipófisis de al menos ocho hormonas importantes. Éstas, por su parte, hacen lo propio respecto a la secreción de otras hormonas en la glándula tiroidea, las glándulas suprarrenales, los ovarios o los testículos. Tal es la relevancia de dicho control, que la extirpación de la hipófisis da lugar a la atrofia de la corteza adrenal, del tiroides y de las gónadas. Esta conexión entre el eje hipotálamo-hipofisario y tales tejidos a través de diferentes hormonas se conoce como hipótesis neurovascular, propuesta por Harris hace más de medio siglo (Harris, 1955). Este investigador sugirió que los factores humorales liberados por el hipotálamo eran transportados por los vasos sanguíneos portales hasta la hipófisis para regular la secreción hormonal, bien estimulándola, bien inhibiéndola.

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 (del latín *parvus* o pequeño) y se distinguen del sistema magnocelular (del latín *magnus* o grande) 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 la existencia de factores hipofisotrópicos (hipofisotropinas) en el interior de estas neuronas (Lipovits, 1993). Los métodos 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. La eminencia media puede, por tanto, ser considerada el punto final de convergencia del sistema nervioso central sobre el sistema endocrino periférico. 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 realmente libera hormonas en el sistema porta hipofisario para regular la función hipofisaria ha sido la demostración de que tales hormonas se hallan en los vasos portales en concentraciones superiores a las de la circulación sistémica (Paradisi et al, 1993; Porter et al, 1970; Porter et al, 1980).

En cuanto a la hipófisis, está conectada con el hipotálamo por el tallo pituitario o hipofisario. Desde el punto de vista fisiológico puede dividirse en dos porciones: la hipófisis anterior, también conocida como adenohipófisis, y la hipófisis posterior, o neurohipófisis. Entre ellas existe una zona pequeña, relativamente avascular, denominada parte intermedia (Dorton, 2000). En la presente memoria nos centraremos en la adenohipófisis, pues es elemento conector entre el hipotálamo y las gónadas.

Las hormonas de la hipófisis anterior regulan órganos diana tales como las gónadas, las glándulas adrenales y la glándula tiroides, como ya dijimos. También son controlados por hormonas hipofisarias las glándulas mamarias, el útero, los riñones y otros tejidos. Todas las hormonas hipofisarias son liberadas al torrente circulatorio, por donde circulan para interaccionar con sus órganos diana.

Por lo que respecta a los ovarios, éstos llevan a cabo una función tanto gametogénica como endocrina, ambas distintas aunque interrelacionadas (Irianni y Hodgen, 1992). El folículo ovárico es fuente de tres tipos de hormonas esteroides: progestágenos, andrógenos y estrógenos. La cantidad relativa de cada tipo varía a lo largo del ciclo ovárico y, muy 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.

1.2.- SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA.

Desde el descubrimiento de la renina hace más de cien años por Tigerstedt y Bergman (1898) y el aislamiento de la angiotensina II por dos grupos independientes (Braun-Menendez et al, 1940; Page and Helmer, 1940) se han dado numerosos avances en el estudio del sistema renina-angiotensina (SRA). Actualmente se sabe que existen SRAs completos perfectamente separados del SRA sistémico en un considerable número de tejidos, tales como cerebro, hipófisis, páncreas, testículo, epidídimo, glándula adrenal, próstata y ovario, entre otros (Kon et al, 1996; Leung et al, 1999; Mulrow, 1993; Nemeth et al, 1994)

Los SRAs cerebral, hipofisario y ovárico incluyen el precursor a partir del cual se generan todos los péptidos angiotensinérgicos de que constan dichos sistemas, los enzimas requeridos para la producción y degradación de esas angiotensinas y los receptores específicos de las mismas (Allen et al, 1992; Saavedra, 1992; Lenkei et al, 1997; Phillips and Sumners, 1998; Okubo et al, 1986). Una de las formas biológicamente activas de angiotensina es la angiotensina II (AngII), un neuropéptido con múltiples acciones en el cerebro. La AngII actúa sobre el balance hídrico, la homeostasis electrolítica y la regulación neuroendocrina. Tradicionalmente ha sido considerada el principal péptido efector del SRA. Sin embargo, durante los últimos años han sido numerosas las investigaciones sobre la Ang III. Wright et al (2003) determinaron, tras una serie de trabajos con inhibidores específicos de la aminopeptidasa A (APA) y de la aminopeptidasa N (APN), que la conversión de Ang II en Ang III era un requisito previo para la respuesta presora inducida por angiotensina y para la liberación de vasopresina. En cualquier caso, ambos péptidos comparten los mismos receptores y tienen en común la mayoría de sus propiedades.

1.2.1.- ANGIOTENSINÓGENO.

El angiotensinógeno (ANG) es sintetizado en la mayoría de las regiones del encéfalo, aunque algunas de ellas (por ejemplo, la médula o el hipotálamo) predominan sobre el resto en este sentido (Lynch et al, 1987; Guyenet y Lynch, 1990). Es un constituyente del fluido extracelular cerebral y una de las proteínas más abundantes halladas en el fluido cerebroespinal (Hilenfeld, 1984). Con mucho, la mayor proporción

de síntesis de ANG dentro del sistema nervioso central (SNC) ocurre dentro de las células gliales (Stornetta et al, 1988; Intebi et al, 1990). Concretamente, los astrocitos secretan constitutivamente ANG al fluido extracelular cerebral (Intebi et al, 1990; Stornetta et al, 1988; Schinke et al, 1999). La proporción de producción de ANG podría ser incrementada por factores tales como los niveles de glucocorticoides (Deschenner y Flaxman, 1990). Aunque también existen evidencias proporcionadas por estudios inmunohistoquímicos en ratas (Thomas y Sernia, 1988) y trabajos con ratones transgénicos que muestran la expresión de ANG en neuronas (Yang et al, 1999), tal expresión ocurre probablemente en mucha menor magnitud que la manifestada por astrocitos.

El ANG ha sido detectado en la hipófisis como AngI producida por renina (Ganong et al, 1989) y por inmunohistoquímica (Deschepper et al, 1985; Thomas y Sernia, 1990), si bien su mRNA no es fácilmente detectable y requiere de técnicas altamente sensibles. El ANG es secretado por las células gonadotropas y las pequeñas células perisinusuales, pero en mayor proporción por estas últimas.

También el mRNA de ANG se expresa de forma local en el ovario (Okubo et al, 1986). En la rata, el ANG sintetizado en el ovario es estructuralmente idéntico al producido en el hígado. Estudios inmunohistoquímicos revelan la presencia de ANG en el ovario de rata en las células de la granulosa de los folículos en maduración y, en menor medida, en los folículos próximos a la atresia, así como la ausencia de ANG en células de la granulosa de folículos primordiales o primarios (Thomas y Sernia, 1990).

1.2.2.- ENZIMAS PROCESADORAS.

(I) RENINA.

La renina es el enzima responsable de metabolizar el ANG en Ang I. Esta proteasa se sintetiza como un precursor, la preprorenina. Éste es convertido en prorenina en el retículo endoplasmático rugoso por escisión de la secuencia aminoacídica “pre”. La existencia de la prerenina se descubrió al principio de la década de los setenta, cuando se vio que una forma inactiva de renina era activada por proteasas (Morris y lumbres, 1972) y pH ácido (Morris et al, 1980). La prerenina experimenta en el aparato de Golgi un proceso de glicosilación y es depositada en gránulos en los cuales es

separada la secuencia “pro”, un pequeño péptido cuyo tamaño varía en función de la especie. De esta manera resulta la renina activa, que será liberada por exocitosis en respuesta a mediadores específicos.

Se ha sugerido que el proceso de glicosilación anteriormente citado podría aumentar el tiempo de tránsito intracelular (Paul et al, 1988), aunque esta posibilidad no está del todo clara. Lo que sí es cierto es que la renina glicosilada sufre una disminución en su vida media en los medios de cultivo (Holm et al, 1984) y en la circulación (Kim et al, 1987), habiéndose sugerido que los oligosacáridos ayudan en la unión de la renina a los receptores de los tejidos.

Si bien hace más de treinta años que se constató la participación de la renina en la producción de Ang en el SNC, la presencia de su mRNA se ha detectado a una baja concentración dentro del mismo (Dzau et al, 1986) y su relación espacial con el ANG sintetizado centralmente no está clara. Ignorar esto último es un obstáculo en el esclarecimiento del bRAS. Aún más complicado resulta el que la renina no sea un enzima imprescindible para generar Ang II (Baltatu et al, 1997; Klickstein et al, 1982).

(II) ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA.

La enzima convertidora de angiotensina (ECA), también denominada dipeptidil carboxipeptidasa I o kininasa II, es una ectopeptidasa transmembrana de las células vasculares que también es secretada al plasma en una forma soluble.

La ECA está ampliamente distribuida dentro del SNC. Se localiza principalmente en células endoteliales, aunque también está presente en neuronas (Kohzuki et al, 1991). En el cerebro se encuentran altas concentraciones de ECA en los órganos circunventriculares (OCVs), tales como el area postrema, el órgano subfornical, el órgano vasculoso de la lamina terminalis (OVLT) y la eminencia media. En tales OCVs, la AngI que los alcanza desde la circulación periférica podría ser localmente convertida en AngII y tener acciones sobre los receptores de Ang localizados en esas regiones. Como se ha demostrado en diferentes estudios en ratas la AngII generada

localmente estimula a las neuronas dentro de esos OCVs sensoriales (McKinley et al, 1997).

La ECA juega un destacado papel en la homeostasis cardiovascular, en tanto que metaboliza la Ang I a Ang II. Este papel ha sido revelado en numerosos estudios llevados a cabo con inhibidores competitivos de la ECA, en los que se pone de manifiesto su participación en el control del tono vascular y en el mantenimiento de la vasoconstricción (especialmente en situaciones en las que la secreción de renina y la producción de Ang I están estimuladas). Es por ello que tales inhibidores de la ECA han sido empleados como agentes terapéuticos para reducir la presión sanguínea en hipertensión o para disminuir la resistencia vascular en insuficiencia cardíaca e isquemia.

(III) AMINOPEPTIDASAS A, B Y N: ANGIOTENSINASAS.

La aminopeptidasa A (APA) o angiotensinasa es una zinc-metalopeptidasa que escinde el aspartato o el glutamato N-terminal del heptapéptido AngII, conduciendo a la formación de AngIII. En realidad no se trata de una única enzima, sino que se trata de dos enzimas diferentes (glutamil-aminopeptidasa y aspartil-aminopeptidasa) conocidas con el nombre común de aminopeptidasa A. A su vez, la AngIII puede servir de sustrato a la aminopeptidasa B (APB, o arginil-aminopeptidasa) o a la aminopeptidasa N (APN, o alanil-aminopeptidasa), las cuales la degradarían hasta el hexapéptido AngIV. La administración de un inhibidor selectivo de la APA (EC33) bloquea la respuesta presora a la AngII administrada centralmente, indicando que es necesaria la conversión de la AngII en AngIII para que se dé dicha respuesta presora (Reaux et al, 1999b). Asimismo, la administración de un inhibidor selectivo de la aminopeptidasa N (PC18), tiene un efecto presor que es bloqueado por la inyección intracerebroventricular (icv) del antagonista del receptor AT1 en ratas WKY, sugiriendo que la AngIII se une a receptores AT1 (Meaux et al, 1999a). En ratas SHR, la administración central de PC18 provoca una mayor respuesta presora, indicando que la AngIII endógena estaba influenciando la presión arterial en ambos linajes, pero que los niveles más altos de AngIII en el cerebro son responsables de la mayor respuesta encontrada en SHR (Reaux et al, 1999a).

1.2.3.- PÉPTIDOS DE ANGIOTENSINA.

Las angiotensinas AngI, AngII, AngIII y Ang 1-7 han sido identificadas en el tejido cerebral, aunque las dos últimas se encuentran en muy bajas concentraciones (Chappel et al, 1987; Chappel et al, 1989; Lawrence et al, 1992). La identificación inmunohistoquímica de la AngII o de la AngIII en el cerebro de rata revela que existe un extenso sistema de terminaciones y fibras nerviosas que contienen Ang en regiones cerebrales específicas (Lind et al, 1985; Olfeld et al, 1989). Sin embargo, sólo se han observado cuerpos neuronales con inmunoreactividad de tipo Ang en pocas regiones cerebrales, tales como el núcleo del tracto solitario, el núcleo paraventricular hipotalámico y el órgano subfornical. En la hipófisis anterior la producción local de AngII ha sido demostrada, ya que su péptido ha sido confirmado por HPLC y su producción se ha verificado en células hipofisarias tras 14 días en cultivo (Ganong, 1989; Deschepper, 1991). Es más, se considera que el sitio de producción local de AngII en la hipófisis anterior son las células gonadotropas (Lenkei et al, 1999).

La Ang I es un decapeptido que resulta de la acción de la renina sobre el ANG y que aparentemente carece de actividad biológica. Sin embargo, el octapeptido en el que es convertida por la ECA, la AngII, sí que es biológicamente activo. También lo serán las otras dos angiotensinas, AngIII y Ang IV, que se forman gracias a las actividades aminopeptidasas APA, APB y APN, tal como habíamos visto anteriormente.

La descripción de los subtipos de receptor AT1 y AT2 para la Ang II y el desarrollo de antagonistas no peptídicos específicos de tales receptores han abierto toda un área de investigación en el campo de la neurociencia. El sitio AT1, que se une preferencialmente a la AngII y a la AngIII, parece mediar funciones clásicas relacionadas con el mantenimiento de la presión sanguínea y el control del balance hídrico corporal. La acción central de la Ang II a través del receptor AT2 ha sido totalmente descrita. El hecho de que las mayores densidades de este subtipo de receptor se den durante el desarrollo embrionario y edades tempranas revelan un papel en la diferenciación y en el crecimiento.

Pese a que tradicionalmente se ha considerado a la AngII como el principal péptido efector del SRA, durante los últimos años han sido muchos los investigadores

que defienden que este papel corresponde a la AngIII. Wright et al (2003) determinaron, tras una serie de trabajos con inhibidores específicos de la APA y de la APN, que la conversión de Ang II en AngIII era un requisito previo para la respuesta presora inducida por angiotensina y para la liberación de vasopresina.

Partiendo de estos datos, algunos autores han sugerido el papel de la APA como una potencial diana terapéutica, ya que el desarrollo de inhibidores de dicho enzima capaces de atravesar la barrera hematoencefálica podría evitar el aumento de presión ejercido por la Ang III (Jackson et al, 1991).

En lo que respecta al flujo sanguíneo cerebral, las angiotensinas II y IV parecen inducir efectos opuestos. Se ha demostrado que la Ang II induce, mediante los receptores AT1, una disminución del flujo sanguíneo, mientras que la Ang IV, vía receptores AT4, lo incrementa (Kramar et al, 1997).

El receptor AT4 también ha sido implicado en los procesos de adquisición y recuperación de la memoria. Esta idea surgió de la distribución de los sitios de unión de la Ang IV dentro del cerebro, pero viene demostrada por numerosos estudios conductuales.

1.2.4.- RECEPTORES DE ANGIOTENSINA.

Los receptores de Ang se localizan en muchas regiones específicas del cerebro y de la hipófisis (Lenkei et al, 1997; 1999). Estos receptores son de los subtipos AT1, AT2 y AT4. Los receptores AT1 se subdividen en receptores AT1A y AT1B en el cerebro de roedores. En relación a los receptores AT1, los resultados de estudios de autorradiografía, de hibridación *in situ* e inmunohistoquímicos revelan una enorme concordancia en cuanto a su localización en ciertas áreas clave de gran relevancia en la homeostasis cardiovascular y en el balance hídrico corporal (Allen et al, 2000; Lenkei et al, 1997).

(I) RECEPTORES AT1.

Las densidades más elevadas de unión al receptor AT1 se localizan normalmente en neuronas de la lamina terminalis, del núcleo paraventricular hipotalámico (PVN) y del núcleo del tracto solitario (NTS) (Allen et al, 2000). Si bien la existencia de los receptores AT1 también ha sido probada en las células de la glía del cerebro (Bottari et al, 1992). Dentro de la lamina terminalis, el órgano subfornical y el OVLT, expuestos a angiotensinas circulantes, contienen receptores AT1. Las regiones del cerebro posterior que desempeñan papeles cruciales en la regulación cardiovascular (núcleo del tracto solitario (NTS), médula ventrolateral caudal y rostral) también presentan receptores AT1 (Allen et al, 2000; Lenkei et al, 1997).

En el hipotálamo, la mayoría de las especies cuentan con altas concentraciones de receptores AT1 en los núcleos supraóptico y paraventricular; aunque en la rata esos receptores sólo se observan en la división parvocelular del núcleo paraventricular (PVN) (Lenkei et al, 1997).

Los receptores AT1 podrían ser activados o inhibidos en regiones específicas del cerebro dependiendo del estado fisiológico del animal. La deshidratación, la hipertensión y el estrés podrían influir en el número de receptores AT1 expresados en regiones cerebrales particulares (Saavedra et al, 1986; Ray et al, 1990; Sandberg et al, 1994; Barth y Gerstberger, 1999; Charron et al, 2002).

Jöhren et al (2003), realizando estudios sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, analizaron mediante RT-PCR semicuantitativa la expresión de los subtipos de receptores AT1 y comprobaron que en ratas normotensas los niveles de mRNA de AT1A son muy bajos o indetectables en la hipófisis, mientras que los del mRNA de AT1B son muy altos. Los niveles de mRNA de AT1A y AT1B son significativamente más altos y más bajos, respectivamente, en ratas SHR en comparación con las normotensas WKY, lo que sugiere cambios funcionales específicos asociados a la angiotensina de la hipófisis. También Lenkei et al (1999) demostraron que las células de la pituitaria anterior expresan predominantemente el subtipo AT1B.

Existen grandes diferencias entre especies en cuanto a la distribución y concentración de los receptores de Ang II/III en el ovario (Nielsen et al, 1995a; 1995b). En los folículos ováricos de rata, el receptor AT1 se localiza principalmente en el estroma (Daud et al, 1988); en el ovario de conejo, la expresión del receptor AT1 está más concentrada en el estroma y en las células de la teca (Yoshimura, 1997); en el mono y la vaca, la expresión se detecta mayormente en las células de la teca (Brunswick-Spickenheier y Mukhopadhyay, 1992; Aguilera et al, 1989).

(II) RECEPTORES AT2.

Las funciones del receptor AT2 en el cerebro no son del todo claras, aunque los receptores son numerosos durante el desarrollo en el cerebro de la rata (Millan et al, 1991) y podría tener algunas acciones opuestas a las del receptor AT1 en el cerebro de rata adulta (Hohle et al, 1991; Kim e Iwao, 2001). Vervoort et al (2002) postulan que mutaciones en el receptor podrían conducir al retraso intelectual.

Diversos estudios funcionales han indicado que el receptor AT2 podría participar en la regulación de la liberación de vasopresina por la AngII/III. Este hecho se ve apoyado por estudios inmunológicos que demuestran su localización en los núcleos hipotalámicos paraventricular y supraóptico, y más concretamente, en neuronas vasopresinérgicas (Shelar et al, 1998).

En cambio, no se ha detectado expresión alguna del mRNA del receptor AT2 en la hipófisis (Jöhren et al, 2003), por lo que los papeles fisiológicos que desempeña la angiotensina de dicho tejido no parecen estar mediados por este receptor.

Por lo que respecta al ovario, también existen importantes diferencias entre especies. En el ovario de rata el receptor AT2 se expresa mayoritariamente en las células de la granulosa de folículos atrésicos (Daul et al, 1988). Por el contrario, las células de la granulosa de conejo expresan elevados niveles de receptores AT2 en el folículo preovulatorio (Yoshimura et al, 1996).

(III) RECEPTORES AT4.

El receptor AT4 se define como el sitio de unión de alta afinidad que une selectivamente la AngIV. La AngIV se genera por acciones consecutivas de las aminopeptidasas A y B/N sobre la AngII. Su presencia en el cerebro se extiende por muchas regiones en mamíferos y además, sigue un patrón de distribución muy conservado a través de las especies estudiadas. De este modelo de distribución destaca el hecho de que las densidades más elevadas de AT4 se localizan en la mayoría de las regiones implicadas en el control motor y en la memoria (Bohlen y Halbach, 2003).

Albiston et al (2001) aislaron el receptor AT4 y demostraron que es una aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP, insulin-regulated aminopeptidase). IRAP es una proteína abundante ubicada en vesículas específicas que también contienen al transportador de la glucosa, el GLUT4 (Séller et al, 1995). En respuesta a la insulina, estas vesículas GLUT4 se dirigen a la superficie celular para posibilitar la entrada de glucosa a la célula. Aunque la IRAP, como el GLUT4, se desplaza fácil y notablemente hacia la superficie celular tras la estimulación por la insulina, el papel fisiológico de la enzima no se conoce. IRAP también se ha aislado de la placenta humana como la enzima que hidroliza la oxitocina (Rogi et al, 1996); de ahí que también sea conocida como oxitocinasa. En cualquier caso, IRAP es una proteína integral de membrana perteneciente a la familia M1 de metalopeptidasas cinc-dependientes y se ha demostrado que actúa sobre un gran número de péptidos in vitro, incluyendo vasopresina, lys-bradikinina, met-enkefalina, dinorfina A(1-8), somatostatina y colecistoquinina (CCK8) (Herbst et al, 1997; Matsumoto et al, 2001).

1.2.5.- PAPELES FISIOLÓGICOS DE LOS PÉPTIDOS ANGIOTENSINÉRGICOS.

Todos los precursores y enzimas necesarios para síntesis de las angiotensinas, así como las propias angiotensinas y sus correspondientes receptores han sido reconocidos en el sistema nervioso central. Pese a que este SRA cerebral parece estar regulado independientemente del SRA periférico, las angiotensinas circulantes ejercen una parte de sus acciones a través de los receptores de angiotensina localizados en los órganos circunventriculares. Estos órganos están muy vascularizados y presentan una

reducida barrera hematoencefálica, permitiendo así el acceso de estos péptidos. En este sentido, el SRA cerebral interactúa con otros sistemas neurotransmisores y neuromoduladores y contribuye a la regulación de la presión sanguínea, homeostasis del fluido corporal, ciclo de las hormonas reproductoras y la conducta sexual, y juega un importante papel en otras funciones tales como la adquisición de la memoria, agudeza sensorial (incluida la percepción del dolor), conducta de exploración (Wright y Harding, 1997; Wright, 1995), desarrollo cerebral, migración neuronal, regulación de las respuestas emocionales, del flujo sanguíneo y aprendizaje (Saavedra, 2005).

La expresión de un tipo específico de receptor angiotensinérgico en una región cerebral responsable de una función concreta de las enumeradas anteriormente es realmente significativa. Así, por ejemplo, muchos estudios experimentales han demostrado que además de las propiedades clásicas de la AngII (presora, hidroelectrolítica, dipsogénica, liberadora de vasopresina y aldosterona), este octapéptido participa, a través de los receptores AT1, como un factor trófico y estimulador del estrés oxidativo (Ortiz et al, 2001), inflamación, aterogénesis y remodelación cardiovascular (Dzau, 1988). A las acciones propias de la AngII habría que sumarles las de aquellos fragmentos activos sintetizados a partir de ella (AngIII, AngIV y Ang1-7).

Mientras que la AngIII tiene unos efectos presor, dipsogénico y liberador de vasopresina similares a los de la AngII, contribuyendo así a la conducta dipsogénica de ingesta, la AngIV es un vasodilatador y estimula los procesos nerviosos de aprendizaje y memoria (Wright y Harding, 1997). La administración intracerebroventricular de AngIV facilita los reflejos condicionados de evitación y potencia la memoria asociativa en la rata a través de la activación de la liberación de acetilcolina y la modulación de receptores NMDA (Wright y Harding, 1997). El déficit en la producción de AngIV debido al deterioro de las enzimas formadoras de angiotensina (inducido por causas genéticas, edad, factores de riesgo cardiovascular o metabólico), podría contribuir a la progresiva degradación neuronal en la enfermedad de Alzheimer. A favor de las implicaciones del SRA cerebral en la enfermedad de Alzheimer están el aumento de la actividad ECA con la edad así como su participación en la degradación de la proteína neurotóxica beta-amiloide de las placas seniles (Wright et al, 2002). La reducción de la actividad ECA determina al mismo tiempo un importante déficit en la síntesis de los

precursores de la AngIV, contribuyendo de esta manera a las progresivas alteraciones de los procesos electroquímicos de aprendizaje y memoria (Kehoe, 2003).

El SRA de la hipófisis también ha sido implicado de manera considerable en la regulación del sistema cardiovascular y del balance hídrico corporal a través de la secreción de hormonas (Wright et al, 1995). El mantenimiento de la homeostasis cardiovascular y de fluidos requiere mecanismos que regulan la cantidad total de agua y sodio en el cuerpo así su apropiada distribución regional y compartimentación. La mayoría de estos mecanismos están mediados por la fisiología de la glándula pituitaria. Así, la acción ciertas hormonas hipotalámicas, y de manera más significativa el factor liberador de corticotropina (CRF) y arginina-vasopresina (AVP) desde el PVN, conduce a un marcado aumento en la liberación de adrenocorticotropina (ACTH) desde la hipófisis anterior (Whitnall, 1993). La ACTH, a su vez, provoca la liberación de glucocorticoides (y probablemente de aldosterona (Lumbres, 1999)) desde la corteza adrenal a la circulación, aumentando así la presión sanguínea (Kelly et al, 1998).

1.3.- RECEPTORES ALFA-1 ADRENÉRGICOS. LA DOXAZOSINA COMO BLOQUEANTE ALFA-1 ADRENÉRGICO.

La resistencia periférica regional y total y la capacidad del sistema vascular están reguladas por el sistema nervioso simpático, el cual actúa sobre la vasculatura, principalmente a través de cambios en la liberación de catecolaminas tanto de los terminales nerviosos simpáticos como de la médula adrenal. En las últimas décadas se han llevado a cabo numerosos estudios sobre posibles dianas para la adrenalina y la noradrenalina, principales catecolaminas endógenas que median estas acciones.

Los adrenorreceptores son receptores de la membrana celular a través de los cuales la adrenalina y la noradrenalina actúan como importantes neurotransmisores y hormonas en la periferia y en el sistema nervioso central. Los adrenorreceptores constituyen dianas para importantes drogas terapéuticas, incluyendo algunas empleadas en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, asma, hipertrofia, congestión nasal o incluso obesidad.

La musculatura lisa de los vasos posee receptores adrenérgicos tanto de tipo alfa como de tipo beta, pero en la inmensa mayoría de los tejidos vasculares predominan los efectos mediados por los de tipo alfa. En concreto, en la mayoría de las especies de mamíferos la contracción de la vasculatura lisa de los vasos está principalmente mediada a través de los α_1 -adrenorreceptores, al menos en estudios *in vitro* (Burt et al, 1995; 1998). In vivo, se ha demostrado la participación de estos adrenorreceptores en la regulación de la función de la vasculatura periférica (Minneman, 1988; Bylund et al, 1995) y en el control del tono vascular (Schäfers et al, 1997; 1999). Es por ello por lo que la doxazosina, un bloqueante de los receptores post-sinápticos alfa-1-adrenérgicos, es un medicamento de uso habitual en el control de la presión sanguínea. Al relajar los vasos sanguíneos para que la sangre pueda fluir de forma más eficiente por todo el organismo, la doxazosina disminuye la presión sanguínea. Sola o en combinación con otros medicamentos –normalmente inhibidores de ECA- la doxazosina no sólo se emplea para tratar la hipertensión, sino también la insuficiencia cardíaca congestiva a la que, en ocasiones, conduce la hipertensión.

2.- HIPÓTESIS Y PLANTEAMIENTO.

El eje hipotálamo-hipófisis-ovarios es uno de los sistemas reguladores neuroendocrinos más importantes y, como su nombre indica, consiste en un bucle de retroalimentación que incluye a estas tres estructuras. En cada una de ellas se ha descrito un SRA local que está encargado no sólo de la regulación del flujo sanguíneo local, sino también de otras funciones inherentes a la fisiología propia de cada estructura, e independientes del SRA sistémico.

Un método útil para el análisis del SRA consiste en la determinación de los enzimas proteolíticos reguladores de las diferentes angiotensinas, esto es, las aminopeptidasas APA, APB y APN. Muchas de las funciones conocidas de las angiotensinas están mediadas por los receptores de tipo AT1, los cuales, a su vez, están mediados por mecanismos centrales en los que están implicados los receptores de adrenalina de tipo alfa 1. Por lo tanto, el presente estudio está diseñado para evaluar el efecto del bloqueo de los receptores α_1 -adrenérgicos –mediante doxazosina- sobre los SRAs del hipotálamo, la hipófisis y los ovarios, analizando los enzimas proteolíticos

reguladores AspAP, GluAP (APA), APN y APB, y discriminar de este modo la relación entre estos receptores y las funciones mediadas por estos SRAs locales

3.- MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1.- Animales y tratamiento.

Para la realización de este trabajo se emplearon treinta ratas hembra de la variedad Wistar (peso corporal 210.4 ± 2.7 g). Los animales fueron proporcionados por el Estabulario de los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Jaén y estuvieron bajo un ambiente controlado, con una temperatura constante de 25° C y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, respectivamente. Todos los animales dispusieron de comida y agua *ad libitum*. Los procedimientos experimentales que se llevaron a cabo con los animales estuvieron de acuerdo con la normativa de la Comunidad Europea 86/609/EEC.

Las ratas se dividieron aleatoriamente en dos grupos. Un grupo (15 animales) fue inyectado subcutáneamente con doxazosina, un antagonista de los receptores α_1 -adrenérgicos (10 mg/Kg) disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) durante 15 días. El grupo control recibió otras tantas inyecciones subcutáneas de DMSO.

3.2.- Obtención y preparación de las muestras.

Transcurridas 24 horas desde la última inyección de doxazosina/DMSO, los animales fueron sacrificados bajo anestesia de equitesin (2 mL/Kg de peso). Se obtuvieron muestras de sangre a partir del ventrículo izquierdo y se centrifugaron durante diez minutos a 3000 g para obtener el suero. Estas muestras fueron congeladas y almacenadas a -80° C para su posterior análisis. El hipotálamo, la hipófisis anterior y el ovario derecho de cada animal fueron rápidamente extraídos y congelados también. Para obtener la fracción soluble de estos tres tejidos, las muestras fueron homogeneizadas en 10 volúmenes de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7.4) y ultracentrifugadas a 100,000 g durante 30 minutos (4° C). Los sobrenadantes resultantes fueron usados para determinar la actividad enzimática soluble y el contenido en proteína por triplicado. Para solubilizar las proteínas de membrana, los precipitados fueron homogeneizados en tampón Tris-HCl (pH 7.4) más Tritón X-100 al 1%. Tras centrifugar (100,000 g, 30 min, 4° C), los

sobrenadantes fueron utilizados para medir la actividad enzimática unida a membrana y el contenido en proteínas por triplicado.

3.3.- Ensayo de las hormonas sexuales.

Las muestras de suero fueron empleadas para medir, mediante un kit de inmunofluoroensayo a tiempo resuelto, los niveles de estradiol y progesterona (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Wallac Oy, Turku, Finland), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el estradiol, el límite más bajo para la detección es de 0.05 nmol/L [13.6 pg/mL]; el coeficiente de variación entre ensayos es de entre 1.8-2.1%. Para la progesterona, el límite más bajo para su detección es de 0.8 nmol/L [0.25 ng/mL]; el coeficiente de variación entre ensayos es de entre 1.9-4.5%.

3.4.- Análisis de las actividades aminopeptidasas reguladoras del SRA.

La actividad AspAP fue determinada fluorométricamente por triplicado con aspartil- β -naftilamida (AspNNap) como sustrato, como se ha descrito previamente (Ramírez-Expósito et al, 2000). Brevemente, 10 μ L de cada sobrenadante fueron incubados con 100 μ L de solución de sustrato (AspNNap 100 μ M, BSA (albúmina sérica bovina) 1.5 mM y MnCl₂ 2 mM en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4) durante 90 min a 37° C.

La actividad GluAP se midió siguiendo la metodología previamente descrita (Ramírez-Expósito et al, 2000), empleando como sustrato glutamil- β -naftilamida (GluNNap): 10 μ L de cada sobrenadante fueron incubados durante 90 min a 37° C con 100 μ L de solución de sustrato (GluNNap 100 μ M, BSA 1.5 mM, DTT (ditiotreitól) 0.65 mM y CaCl₂ 50 mM en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4).

Las actividades de las aminopeptidasas N y B también se midieron por fluorimetría empleando como sustratos alanil- β -naftilamida (AlaNNap) y arginil- β -naftilamida (ArgNNap), respectivamente (García et al, 2003). 10 μ L de cada sobrenadante fueron incubados durante 90 min a 37° C con 100 μ L de solución de sustrato (AlaNNap 100 μ M o ArgNNap 100 μ M, BSA 1.5 mM y DTT 0.65 mM en tampón fosfato 50 mM pH 7.4).

Todas las reacciones fueron detenidas por adición de 100 μ L de tampón acetato 0.1 M, pH 4.2. La cantidad de β -naftilamina liberada como resultado de la actividad enzimática fue medida fluorométricamente a una longitud de onda de emisión de 412 nm y a una longitud de onda de excitación de 345 nm. La actividad enzimática específica se expresó en picomoles o nanomoles de sustrato hidrolizado por minuto y por miligramo de proteína, utilizando una curva estándar de β -naftilamina determinada en las mismas condiciones.

3.5.- Determinación de proteínas.

El método de determinación de proteínas empleado en nuestros experimentos se fundamenta en el descrito por Bradford en 1976, basado en la afinidad del colorante Coomassie azul brillante G-250 por las proteínas. La unión del colorante a las proteínas genera 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 μ g de proteínas, por lo que se considera ideal para los trabajos realizados.

Para la determinación de proteínas se han utilizado 10 μ L de muestra, a los cuales se les añaden 2 mL de una solución acuosa de Coomassie G azul brillante. El blanco de la prueba consiste en 2 mL de esta solución en ausencia de muestra. Los valores de absorbancia leídos con un espectrofotómetro a 595 nm se transforman en mg de proteínas por mL con una recta de calibrado obtenida tras medir, mediante el mismo procedimiento, concentraciones crecientes de una solución de albúmina sérica bovina. Cada muestra se midió por triplicado.

3.6.- Análisis estadístico.

Para analizar las diferencias entre el grupo de animales control y el grupo de animales tratados con el bloqueante α_1 -adrenérgico (doxazosina) nos servimos del test de la *t*- de Student. Para ello usamos el software Statgraphic 5.0. Con tal 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 $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4.- RESULTADOS.

El análisis de los efectos de la administración del bloqueante de receptores α_1 -adrenérgicos doxazosina, mostró los siguientes resultados. No se encuentran diferencias significativas en las actividades específicas soluble y unidas a membrana de APB, APN, AspAP y GluAP (APA) ni en hipotálamo ni en hipófisis anterior (figuras 1 y 2). Por el contrario, en el ovario aparecen diferencias significativas en las actividades específicas de GluAP, APN y APB de membrana entre las ratas control y las tratadas con doxazosina (figura 3). Si bien la actividad específica AspAP soluble y unida a membrana y las actividades específicas APN y APB solubles no se modifican de forma significativa. De este modo, el tratamiento con doxazosina incrementa de manera significativa la actividad específica GluAP (APA) tanto soluble como unida a membrana. Por el contrario, la actividad específica APN de membrana disminuye significativamente ($p < 0.05$) en el ovario de ratas tratadas con doxazosina. De forma similar, encontramos una reducción significativa ($p < 0.05$) en la actividad específica APB unida a membrana

La figura 4 muestra los niveles de estradiol y progesterona en suero de ratas control y tratadas con doxazosina. Mientras que no se detectan diferencias significativas en cuanto a los niveles de estradiol, sí aparece un aumento significativo ($p < 0.05$) en los niveles séricos de progesterona de ratas tras la administración de doxazosina.

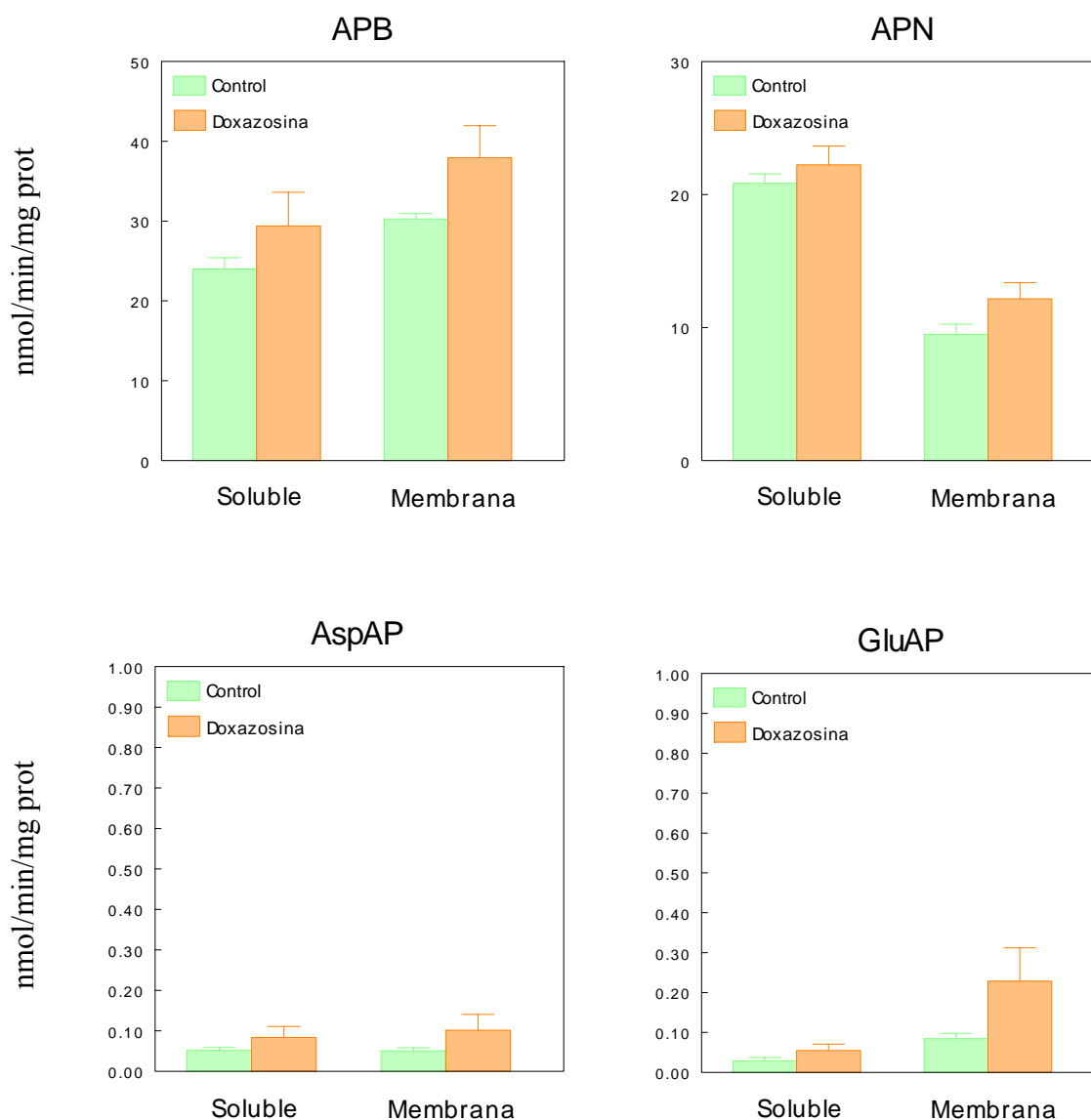


Figura 1. Representación de los valores de actividad específica APB, APN, AspAP y GluAP (APA) del hipotálamo de ratas control y tratadas con doxazosina. Los resultados se expresan, respectivamente, en nanomoles de arginina- β -naftilamida, alanina- β -naftilamida, aspartil- β -naftilamida y glutamil- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media \pm EEM; n=15).

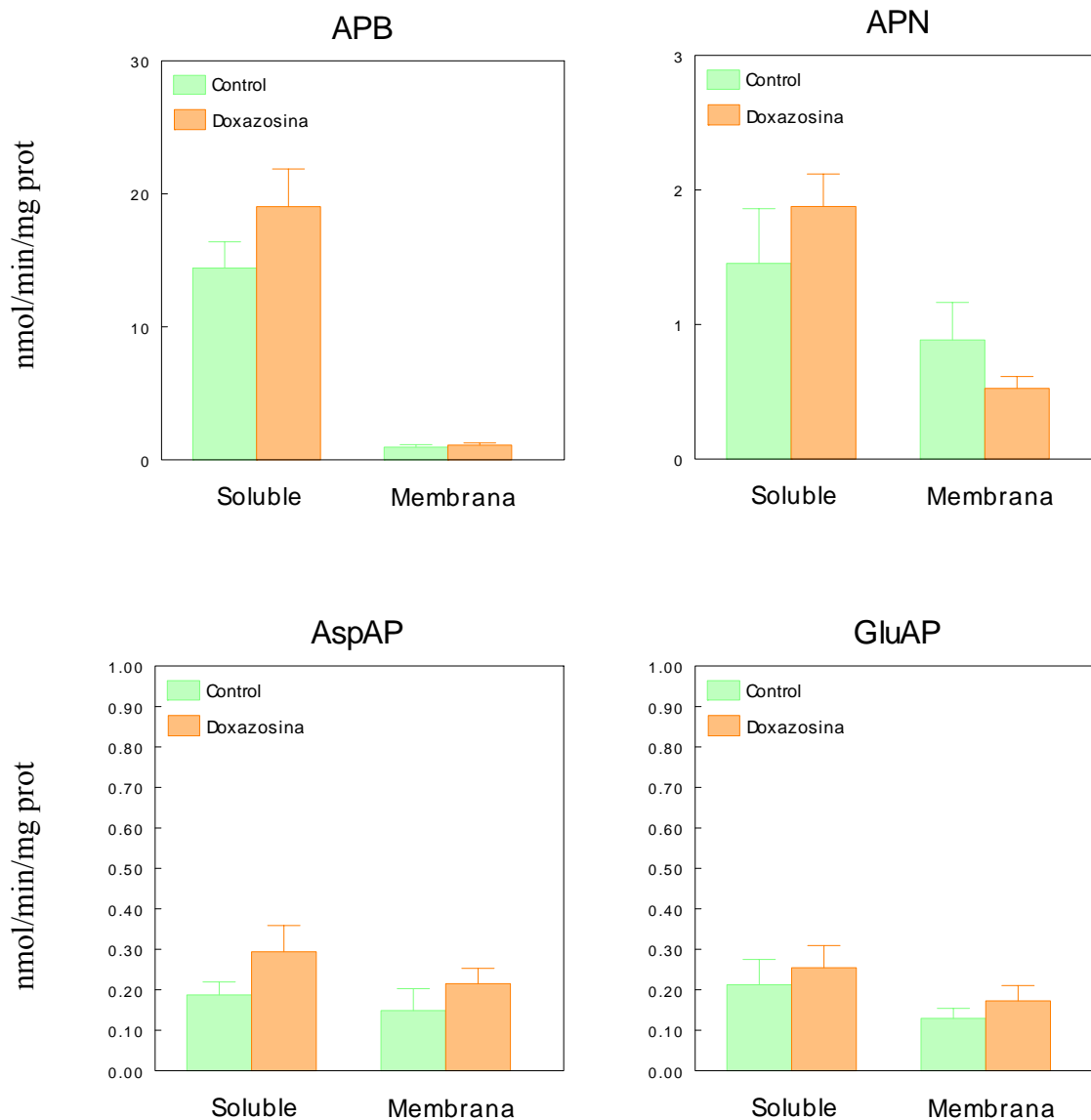


Figura 2. Representación de los valores de actividad específica APB, APN, AspAP y GluAP (APA) de la hipófisis anterior de ratas control y tratadas con doxazosina. Los resultados se expresan, respectivamente, en nanomoles de arginina- β -naftilamida, alanina- β -naftilamida, aspartil- β -naftilamida y glutamil- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media \pm EEM; n=15)

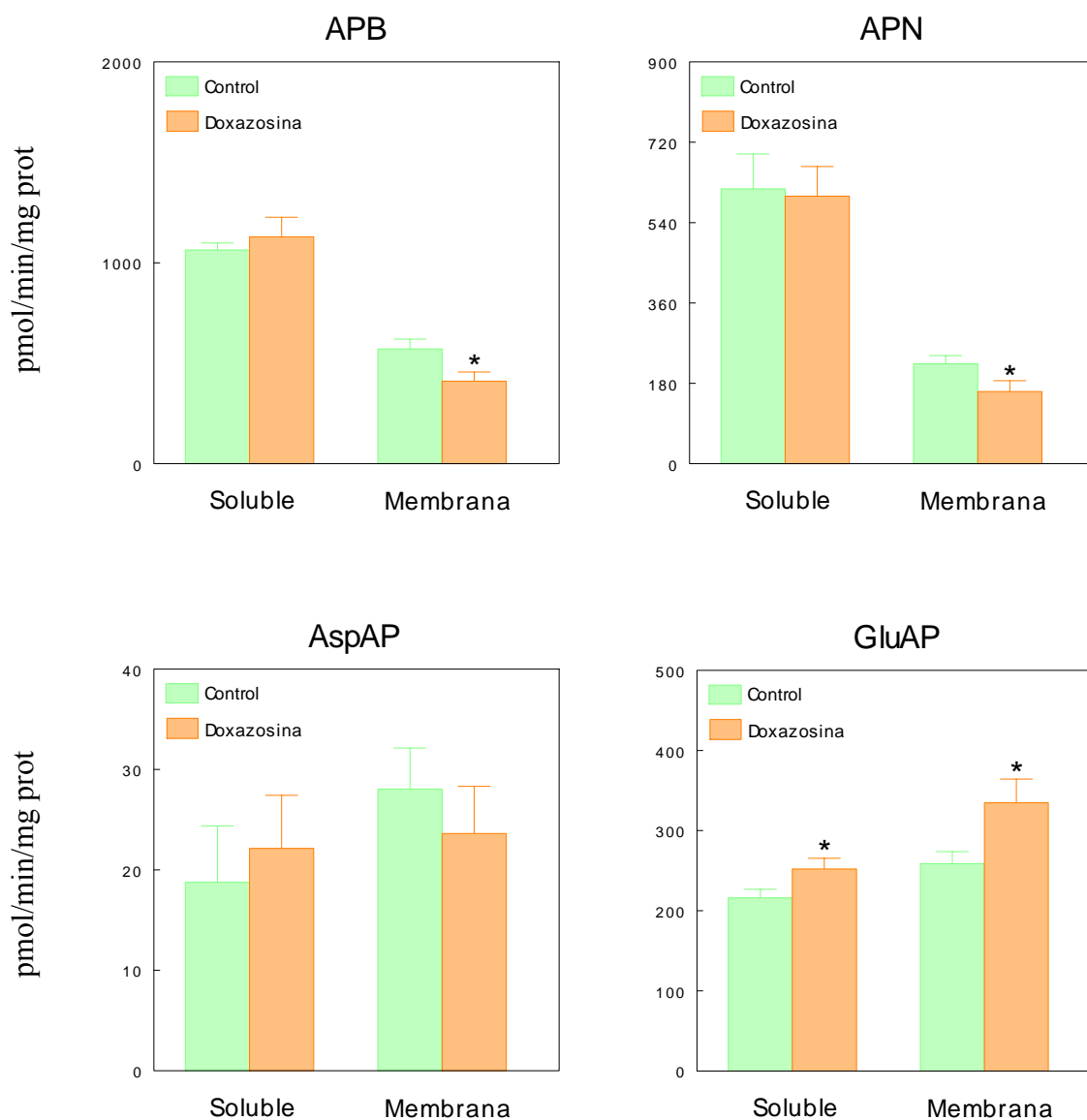


Figura 3. Representación de los valores de actividad específica APB, APN, AspAP y GluAP (APA) del ovario de ratas control y tratadas con doxazosina. Los resultados se expresan, respectivamente, en picomoles de arginina- β -naftilamida, alanina- β -naftilamida, aspartil- β -naftilamida y glutamil- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Media \pm EEM; n=15; * p <0.05).

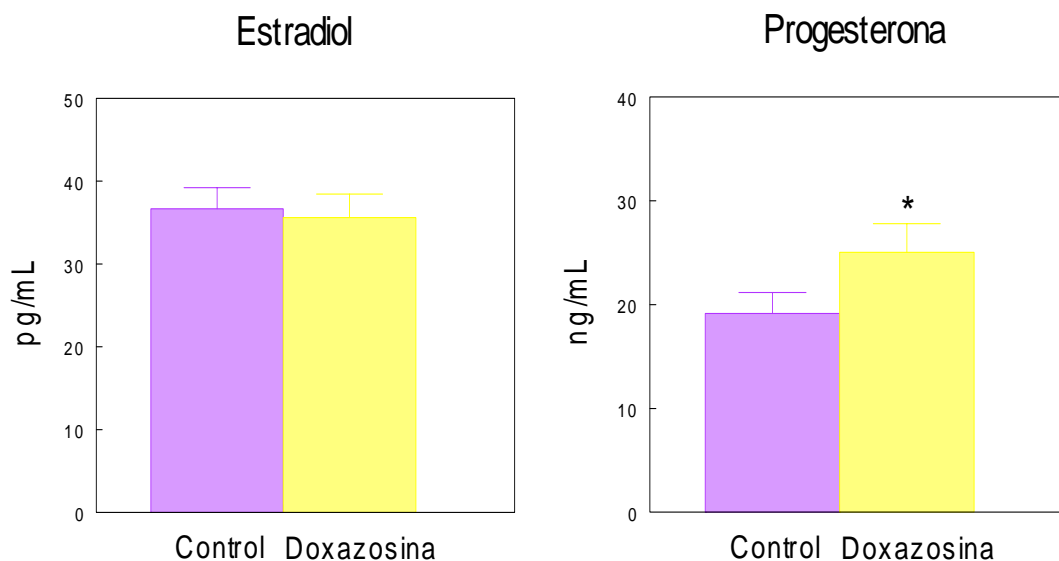


Figura 4. Niveles en suero de estradiol y progesterona de ratas control y ratas tratadas con doxazosina. Los resultados se expresan en picogramos (estradiol) o nanogramos (progesterona) por mililitro (Media \pm EEM; $n=15$; $*p<0.05$).

5.- DISCUSIÓN.

En el presente estudio no hemos encontrado ninguna diferencia significativa, como consecuencia del tratamiento con doxazosina, entre la actividad específica de los distintos enzimas reguladores del SRA ni en el hipotálamo ni en la hipófisis anterior. Sin embargo, sí aparecen diferencias significativas en el ovario. Además, los niveles séricos de progesterona, pero no los de estradiol, se encuentran modificados (incrementados), como consecuencia del tratamiento con doxazosina.

El ovario de mamíferos recibe inervación noradrenérgica (Barh et al, 1974; Lawrence y Burden, 1980). Además, la noradrenalina está presente en el ovario, con concentraciones particularmente altas en el fluido folicular ovárico (Ben-Jonathan et al, 1984; Barh y Ben-Jonathan, 1985; Itoh et al, 2000). Estos hallazgos han impulsado diversos intentos por dilucidar la participación de la noradrenalina en la función ovárica. Se ha visto que la noradrenalina modula la esteroidogénesis ovárica (Adashi y Hsueh, 1981; Aguado et al, 1982; Hernandez et al, 1988; Webley et al, 1988; Bodis et al, 1993; Föhr et al, 1993; Wasilewska-Dziubińska et al, 2002) y estimula la ovulación

(Kannisto et al, 1985; Jorgensen et al, 1991). Es más, se ha sugerido que la noradrenalina promueve el desarrollo del folículo ovárico (Curry et al, 1984; Lara et al, 1990). Estos efectos de la noradrenalina están mediados probablemente por receptores adrenérgicos (ARs) localizados en el ovario de rata (Adashi y Hsueh, 1981; Aguado et al, 1982; Hernandez et al, 1988; Webley et al, 1988; Föhr et al, 1993; Wasilewska-Dziubińska et al, 2002). Estudios farmacológicos empleando agonistas y antagonistas de ARs han sugerido que los α - y β -ARs están presentes en el ovario (Adashi y Hsueh, 1981; Aguado et al, 1982; Hernandez et al, 1988; Webley et al, 1988; Bodis et al, 1993; Föhr et al, 1993; Wasilewska-Dziubińska et al, 2002), y así ha sido confirmado mediante estudios inmunohistoquímicos (Itoh e Ishizuka, 2005). Estos últimos trabajos revelan que los α_1 -AR están localizados en diversas áreas del ovario de rata, incluyendo sitios esteroideogénicos.

La noradrenalina incrementa la incidencia de ovulación en ratas con gonadotropina, mientras que la fentolamina y los antagonistas de los ARs suprimen la ovulación (Kannisto et al, 1985; Jorgensen et al, 1991). Generalmente se ha asumido que la noradrenalina influencia la ovulación a través de la estimulación de la contracción de la musculatura lisa de la pared del folículo ovárico (principalmente la teca externa y el estroma ovárico), y que la contracción inducida por la noradrenalina está mediada por los ARs (Kannisto et al, 1985). De hecho, han sido detectados α_1 -ARs en las paredes de los vasos sanguíneos en la capa tecal del folículo astral (Itoh e Ishizuka, 2005). La teca externa contiene células musculares lisas (Owman et al, 1975; Wales et al, 1975; 1978). Así, la noradrenalina podría estimular la contracción de la musculatura lisa en la teca externa por activación de los α_1 -ARs. La presencia de los mismos en el epitelio germinal en la periferia del folículo antral sugiere que los α_1 -ARs del epitelio germinal podrían estar implicados en la ruptura del folículo en la ovulación (Itoh e Ishizuka, 2005).

Además, la fenilonefrina, un antagonista de los α_1 -ARs, estimula la secreción de progesterona en células de la granulosa en cultivo obtenidas de ratas maduras (Wasilewska-Dziubińska et al, 2002). Así, es probable que los α_1 -ARs en folículos maduros medien el efecto esteroideogénico de la noradrenalina. El ovario recibe inervación noradrenérgica: las fibras noradrenérgicas inervan principalmente alrededor de los vasos sanguíneos y dentro del tejido intersticial de ovario de rata (Bahr et al,

1974; Lawrence y Burden, 1980). Además, las terminaciones nerviosas corren dentro de la teca externa en la pared de los folículos de Graaf (Bahr et al, 1974; Lawrence y Burden, 1980). En la teca, cuerpo lúteo y área intersticial, la inmunorreactividad de los α_1 -ARs se detecta principalmente en células localizadas alrededor de los vasos sanguíneos. La presencia de α_1 -ARs en las paredes de los vasos sanguíneos y en el área intersticial en el ovario sugiere que los nervios noradrenérgicos regulan la actividad de los vasos sanguíneos y área intersticial ováricos mediante la activación de los α_1 -ARs. Así ocurre en el conejo, especie en que la noradrenalina contrae la arteria ovárica, muy probablemente actuando via α_1 -ARs (Oriowo y Bevan, 1986). Adicionalmente la noradrenalina incrementa el flujo sanguíneo ovárico, seguramente influenciando la presión folicular (Lipner y Smith, 1971) y permitiendo la utilización de lipoproteínas procedentes del suero como fuente de colesterol para la esteroidogénesis (Kotwica, 1992).

Es bien sabido que el sistema renina-angiotensina sistémico desempeña importantes papeles en mamíferos, incluyendo la regulación de la presión sanguínea sistémica y del balance hídrico y electrolítico. Además de estas funciones clásicas, ha sido encontrado un SRA local en el sistema reproductor femenino de algunos mamíferos. Así, han sido identificados sitios de unión para la AngII en folículos ováricos (Speth et al, 1986; Huasain et al, 1987) y cuerpos lúteos de rata (CL) (Pepperell et al, 1993; Pepperell et al, 2006). Se ha demostrado la existencia de actividades de tipo renina y pro-renina en folículos bovinos (Schultze et al, 1989) y la actividad ECA está también presente en folículos ováricos y CL de rata (Speth et al, 1988). Igualmente se ha evidenciado que la AngII regula localmente la ovulación (Kuo et al, 1991; Yoshimura et al, 1992), la maduración oocítica (Kuo et al, 1991; Yoshimura et al, 1992) y la esteroidogénesis (Yoshimura et al, 1996). Estos hallazgos sugieren que el SRA ovárico podría funcionar independientemente o en concierto con el SRA sistémico, y controlar la función ovárica a través de acciones paracrinas/autocrinas de la AngII. De cualquier manera, y pese a que la AngII ha sido considerada tradicionalmente el principal péptido efector del SRA, cada vez hay más evidencias que apuntan a que es la AngIII el péptido que desempeña este papel (Reaux et al, 2001). De hecho, la AngIII posee la mayoría de las propiedades de la AngII y ambas comparten los mismos receptores (Barrett et al, 1998; Szczepanska-Sadowska, 1996).

Se conoce que el SRA ovárico está implicado en la esteoidogénesis, pero el mecanismo de acción de algunas angiotensinas parece depender de las especies (Yoshimura et al, 1992; Yoshimura et al, 1996). En la cascada del SRA, hemos detectado un aumento en la actividad APA ovárica inducido por el bloqueo de los receptores α_1 -adrenérgicos producido por la doxazosina, sugiriendo un metabolismo incrementado de la AngII a AngIII. Asimismo, también encontramos una disminución en las actividades APB y APN en el ovario de ratas tratadas con doxazosina, apuntando a un metabolismo disminuido de la AngIII a AngIV. Conjuntamente, estos hallazgos se traducen en una disminución en los niveles de AngII y un aumento en los niveles de AngIII. Además, se observan un incremento en los niveles séricos de progesterona tras el tratamiento con doxazosina, en tanto que los niveles de estradiol no cambian. Se ha descrito que la secreción de estradiol por ovarios procedentes de ratas inmaduras tratadas con gonadotropina sérica de yegua preñada es estimulada por la AngII, mientras que dicha angiotensina no afecta la producción de progesterona (Bumpus et al, 1988; Pucell et al, 1987). Por otra parte, experimentos in vitro llevados a cabo con ovarios de conejo perfundidos también demostraron un significativo efecto estimulador de la AngII sobre la producción de estradiol, pero no sobre la de progesterona (Yoshimura et al, 1992; Yoshimura et al, 1996). Además, la exposición a un antagonista del receptor de la AngII – saralasin-, bloquea la producción ovárica de estradiol estimulada por la hCG de manera dependiente de la concentración (Yoshimura et al, 1992). Así, el efecto esteroideogénico de la AngII parece ser específico del estradiol, sugiriendo que la producción de esta hormona inducida por la AngII es un proceso del SRA ovárico, probablemente a través de mecanismos autocrinos o paracrinos de la función de la AngII en los folículos ováricos de rata (Bumpus et al, 1988). En este sentido, también ha sido demostrado que la AngII podría interferir en el proceso de esteroideogénesis en células de la granulosa en cultivos primarios, en vista de que la reducción dosis-dependiente en la acumulación de progesterona inducida por gonadotropina producida por la AngII (Li et al, 1995). El presente trabajo sugiere, igualmente, que la producción ovárica de progesterona también es un proceso regulado por el SRA, siendo la AngIII la angiotensina responsable de su producción. Es más, podría ser que ni la AngII ni la AngIII fueran responsables de la regulación de la esteroideogénesis en el ovario de rata, sino la propia conversión de AngII en AngIII, de un modo similar al mecanismo hipotetizado para la regulación central de la presión sanguínea por las angiotensinas (Reaux et al, 2001). Según esta hipótesis, la AngIII que

resulta de la acción de las actividades AspAP y GluAP (APA) sobre la AngII, es el mayor péptido efector en el control de la presión sanguínea. Sin embargo, las similares afinidades de ambas angiotensinas por el receptor AT1 no explican por qué la conversión de la AngII en la AngIII es necesaria para aumentar la presión sanguínea. Hasta ahora han sido propuestas dos razones:

- i. Podría existir otro receptor AT1 aún desconocido específico de la AngIII, con un perfil farmacológico similar al del receptor AT1.
- ii. Es posible que el bloqueo de la conversión de la AngII en AngIII favorezca la activación de otras vías metabólicas por las que la AngII sea inactivada y sean producidos, en cada caso, fragmentos peptídicos incapaces de unirse a los receptores AT1 o AT2.

Podemos concluir que la producción ovárica de progesterona, al menos en rata, está regulada por la noradrenalina a través de un mecanismo de acción en el cual está implicado el SRA, con un destacado papel de la AngIII. La existencia de una relación entre las catecolaminas y el SRA en el control de las funciones ováricas, incluyendo la esteroidogénesis, deberá ser investigada para comprender su importancia en alteraciones de la fisiología ovárica. Este conocimiento será una potente herramienta en el tratamiento de desórdenes como el síndrome poliquístico, el síndrome de hiperestimulación ovárica, tumores ováricos y otras patologías.

6.-BIBLIOGRAFÍA.

Adashi EY e Hsueh AJ. Stimulation of beta 2-adrenergic responsiveness by follicle-stimulating hormona in rat granulosa cells in vitro and in vivo. *Endocrinology* 108: 2170-2178 (1981).

Aguado LI, Petrovic SL y Ojeda SR. Ovarian beta-adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology* 110: 1124-1132 (1982).

Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelshon FAO, Simpson RJ, Connolly LM y Chai SY . Evidence that the angiotensin IV (AT4) receptor is the enzyme insulin regulated aminopeptidase. *Journal of Biological Chemistry* 276: 48623-48626 (2001).

Albiston AL, Ruani F, Siying YE, Grantley RP y Siew YC. Alzheimer's, angiotensin IV and an aminopeptidase. *Biological and Pharmacological Bulletin* 27: 765-767 (2004).

Allen AM, McKinley MJ and Mendelsohn FA. Localization of angiotensin receptor binding sites in the rat brain. *Handbook of Chemical Neuroanatomy: Neuropeptide Receptors in the CNS* 11: 1-37 (1992)

Allen AM, Oldfield BJ, Giles ME, Paxinos G, McKinley MJ y Mendelsohn FAO. Localization of angiotensin receptors in the nervous system. *Handbook of Chemical Neuroanatomy* Vol. 16: 79-124 (2000).

Barrett AJ, Rawlings ND y Woessner JF. *Handbook of proteolytic enzymes*. In. San Diego: Academic Press (1998).

Barth SW y Gerstberger R. Differential regulation of angiotensinogen and AT1A receptor mRNA within the rat subfornical organ during dehydration. *Brain Research: Molecular Brain Research* 64: 151-164 (1999).

Bodis J, Bogнар Z, Hartmann G, Torok A y Csaba IF. Measurement of noradrenaline, dopamine and serotonin in follicular fluid of human graafian follicles after superovulation treatment. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 33: 165-167 (1992).

Bohlen O y Halbach O. Angiotensin IV in the central nervous system. *Cell and Tissue Research* 311: 1 (2003).

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254 (1976).

Bumpus FM, Pucell AG, Daud AI y Husain A. Angiotensin II: an intraovarian regulatory peptide. *American Journal of Medical Sciences* 295: 406-408 (1988).

Burt RP, Chapple CR y Marshall I. Evidence for a functional α_{1A} -(α_{1c})adrenoceptor mediating contraction of the rat epididymal vas deferens and a α_{1B} - adrenoceptor mediating contraction of the rat spleen. *British Journal of Pharmacology* 115: 467-475 (1995).

Burt RP, Chapple CR y Marshall I. α_{1A} -Adrenoceptor mediated contraction of rat prostatic vas deferens involves ryanodine Ca^{2+} stores and Ca^{2+} influx stimulated by diacylglycerol and PKC. *British Journal of Pharmacology* 83: 47-48 (1998).

Bylund DB, Regan JW, Faber JE, Hieble JP, Triggle CR y Ruffolo RR Jr. Vascular α -adrenoceptors: from the gene to the human. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 73: 533-543 (1995).

Chai SY, McKenzie JS, McKinley MJ y Mendelsohn FAO. Angiotensin converting enzyme in the human basal forebrain and midbrain visualized by in vitro autoradiography. *Journal of Comparative Neurology* 291: 179-194 (1990).

Chai SY, McKinley MJ y Mendelsohn FAO. Distribution of angiotensin converting enzyme in sheep hypothalamus and medulla oblongata visualized by in vitro autoradiography. *Clinical and Experimental Hypertension A9*: 449-460 (1987a).

Chai SY, McKinley MJ, Paxinos G y Mendelsohn FAO. Angiotensin converting enzyme in the monkey (*Macaca fascicularis*) brain visualized by in vitro autoradiography. *Neuroscience* 42: 483-495 (1991).

Chai SY, Mendelsohn FAO y Paxinos G. Angiotensin converting enzyme in the rat brain visualized by quantitative in vitro autoradiography. *Neuroscience* 20: 615-627 (1987b).

Chansel D, Czekalski S, Vandermeersch S, Ruffet E, Fournie-Zaluski MC y Ardaillou R. Characterization of angiotensin IV-degrading enzymes and receptors on rat mesangial cells. *American Journal of Physiology* 275: F535-542 (1998).

Chappell MC, Brosnihan KB, Diz DI y Ferrario CM. Identification of angiotensin-(1-7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. *Journal of Biological Chemistry* 264: 16518-16523 (1989).

Chappell MC, Brosnihan KB, Welches WR y Ferrario CM. Characterization by high performance liquid chromatography of angiotensin peptides in the plasma and cerebrospinal fluid of the dog. *Peptides* 8: 939-942 (1987).

Charron G, Laforest S, Gagnon C, Drolet G y Mouginot D. Acute sodium deficit triggers plasticity of the brain angiotensin type 1 receptors. *FASEB Journal* 16: 610-612 (2002).

Childs GV, Westlund KW, Tibolt RE y Lloyd JM. Hypothalamic regulatory peptides and their receptors: cytochemical studies of their role in regulation at the adenohypophyseal level. *Journal of Electron Microscopy Technique* 19: 21-41 (1991).

Daud AI, Bumpus FM y Huasain. Evidence for selective expression of angiotensin II receptor on atretic follicles in the rat ovary: an autoradiographic study. *Endocrinology* 122: 2727-2734 (1988).

Dzau VJ. Cardiac renin-angiotensin system: molecular and functional aspects. *American Journal of Medicine* 84: 22 (1988).

Dzau VJ, Ingelfinger J, Pratt RE y Ellison KE. Identification of renin and angiotensinogen messenger RNA sequences in mouse and rat brains. *Hypertension* 8: 544-548 (1986).

Epstein AN, Fitzsimons JT y Rolls BJ. Drinking induced by injection of angiotensin into the brain of the rat. *Journal of Physiology (London)* 210: 457-474 (1970).

Feracci H y Maroux S. Rabbit intestinal aminopeptidase N. Purification and molecular properties. *Biochimica and Biophysica Acta* 599: 448-463 (1980).

Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB y Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hipertensión* 30: 535-541 (1997).

Fisher-Ferraro C, Nahmod VE, Goldstein DJ y Finkeilman S. Angiotensin and renin in the rat and dog brain. *Journal of Experimental Medicine* 133: 353-361 (1971).

Fohr KJ, Mayerhofer A, Sterzik K, Rudolf M, Rosenbusch B y Gratzl M. Concerted action of human chorionic gonadotropin and norepinephrine on intracellular-free calcium in human granulosa-lutein cells: evidence for the presence of a functional alpha-adrenergic receptor. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 76: 367-373 (1993).

García MJ, Martínez-Martos JM, Mayas MD, Carrera MP y Ramírez-Expósito MJ. Hormonal Status modifies renin-angiotensin system-regulating aminopeptidases and vasopressin-degradating activity in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis of male mice. *Life Sciences* 73: 525-538 (2003).

Hernandez ER, Jimenez JL, Payne DW y Adashi EY. Adrenergic regulation of ovarian androgen biosynthesis is mediated via beta 2-adrenergic theca-intestitial cell recognition sites. *Endocrinology* 122: 1592-1602 (1988).

Hilgenfeld U. Angiotensinogen in rat cerebrospinal fluid. *Clinical and Experimental Hypertension* 6: 1815-1824 (1984).

Hohle S, Spitznagel H, Rascher W, Culman J y Unger T. Angiotensin AT1 receptor-mediated vasopressin release and drinking are potentiated by an AT2 receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology* 275: 277-282 (1995).

Holm IR, Ollo R, Panthier JJ y Rougeon F. Evolution of aspartil proteases by gene duplication: the mouse renin gene is organized in two homologous clusters of four exon. *EMBO Journal* 3: 557-562 (1984).

Husain A, Bumpus FM, De Silva P y Speth RC. Localization of angiotensin II receptors in ovarian follicles and the identification of angiotensin II in rat ovarios. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 2489-2493 (1987).

Intebi AD, Flaxman MS, Ganong WF y Deschepper CF. Angiotensinogen production by rat astroglial cells in vitro and in vivo. *Neuroscience* 34: 545-554 (1990).

Irianni F, Hodgen GD. Mechanism of ovulation. *Reproductive Endocrinology* 21: 19-38 (1992).

Itoh MT y Ishizuka B. Alpha 1-adrenergic receptor in rat ovary: presence and localization. *Molecular and Cellular Endocrinology* 240: 58-63 (2005).

Kehoe PG. The renin-angiotensin-aldosterone system and Alzheimer's disease. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 4: 124 (2003).

Keller SR, Scott HM, Mastick CC, Aebersold R y Lienhard GE. Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles. *Journal of Biological Chemistry* 270: 23612-23618 (1995).

Kim SM e Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological Reviews* 52: 11 (2001).

Kelly JJ, Mangos G, Williamson PM y Whitworth JA. Cortisol and hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 25: 51-56 (1998)

Kim SM, Iwao H, Nakamura N, Ikemoto F y Yamamoto K. Fate of circulating renin in conscious rats. *American Journal of Physiology* 252 (Endocrinology and Metabolism 15): E136-E146 (1987).

Kohzuki M, Johnston CI, Chai SY, Jackson B, Perich R y Paxton D. Measurement of angiotensin-converting enzyme induction and inhibition using quantitative in vitro autoradiography: tissue selective induction after chronic lisinopril treatment. *Journal of Hypertension* 9:579-587 (1991).

Kotwika J. Role of the noradrenergic system in the secretory function of the corpus luteum. *Journal of Physiology and Pharmacology* 43: 131-142 (1992).

Kregel KC, Stauss H y Unger T. Modulation of autonomic nervous system adjustments to heat stress by central Ang II receptor antagonism. *American Journal of Physiology* 266: R1985-R1991 (1994).

Kubo T, Ikezawa A, Kambe T, Hagiwara Y y Fukumori R. Renin antisense injected intraventricularly decreases blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Brain Research Bulletin* 56: 23-28 (2001).

Kuo TC, Endo K, Dharmrajan AM, Miyazaki T, Atlas SJ y Wallach EE. Direct effect of angiotensin II on in vitro perfused rabbit ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 92: 469-474 (1991).

Lawrence AC, Clarke IJ y Campbell DJ. Angiotensin peptides in brain and pituitary of rat and sheep. *Journal of Neuroendocrinology* 4: 237-244 (1992).

Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P y Llorens-Cortes C. Expresión of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: A functional neuroanatomical review. *Frontiers in Neuroendocrinology* 18: 383-439 (1997).

Li XM, Juorio AV y Murphy BD. Angiotensin II interferes with steroidogenesis in porcine granulosa cells. *Biology of Reproduction* 53: 791-799 (1995).

Lin MT. Effects of angiotensin II on metabolic, respiratory and vasomotor activities as well as body temperatures in the rabbit. *Journal of Neural Transmission* 49: 197-204 (1980).

Lind RW, Swanson LW, Bruhn TO y Ganten D. The distribution of angiotensin II-immunoreactive cells and fibers in the paraventriculo-hypophysial system of the rat. *Brain Research* 338: 81-89 (1985).

Liposits Z. Ultrastructure of hypothalamic paraventricular neurons. *Critical Reviews in Neurobiology* 7: 89-162 (1993)

Lumbers ER. Angiotensin and aldosterone. *Regulatory Peptides* 80: 91-100 (1999).

Matsumoto H, Nagasaka T, Hattori A, Rogi T, Tsuruoka N, Mizutani S y Tsujimoto M. Expression of placental leucine aminopeptidase/oxitocinase in neuronal cells and its action on neuronal peptides. *European Journal of Biochemistry* 268: 3259-3266 (2001).

McKinley MJ, Colvill LM, Giles ME y Oldfield BJ. Distribution of fos-immunoreactivity in the rat brain following a dipsogenic dose of captopril and effects of angiotensin receptor blockade. *Brain Research* 747: 43-51 (1997).

Millan MA, Jacobowitz DM, Aguilera G y Catt KJ. Differential distribution of AT1 and AT2 angiotensin II receptor subtypes in the rat brain during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 11440-11444 (1991).

Minneman KP. α_1 -Adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of cell calcium. *Pharmacological Reviews* 40: 87-119 (1988).

Morris BJ y Lumbers ER. The activation of renin in human amniotic fluid by proteolytic enzymes. *Biochemical Biophysiology* 289: 385-391 (1972).

Morris BJ, De Zwart RT y Young JA. Renin in mouse but not in rat submandibular glands. *Experientia* 36:1333-1334 (1980).

Nielsen AH, Hagemann A, Avery B y Poulsen K. Differences in expression of angiotensin II receptors and renin in porcine and bovine ovaries. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 103: 332-338 (1995).

Nielsen AH, Hagemann A, Svenstrup B, Nielsen J y Poulsen K. Regulation of angiotensin II receptor expression in ovarian follicles. A review. *Advances in Experimental and Medical Biology* 377: 407-410 (1995).

Oldfield BJ, Ganten D y McKinley MJ. An ultrastructural analysis of the distribution of angiotensin II immunoreactive cells and fibres in the rat brain. *Journal of Neuroendocrinology* 1: 121-128 (1989).

Ortiz MC, Manriquez MC, Romero JC y Juncos LA. Antioxidants block angiotensin II-induced increases in blood pressure and endothelin. *Hypertension* 38: 655-659 (2001).

Paradisi R, Frank G, Magrini O, Capelli M, Venturoli S, Porcu E y Flamigni C. Adenopituitary hormones in human hypothalamic hypophyseal blood. *Journal Clin Endocrinol Metab* 77: 523-527 (1993).

Paul M, Burt DW, Pratt RE y Dzau VJ. Glycosilation influences intracellular transit time and secretion rate of human prorenin in transfected cells. *Journal of Hypertension* 6 (Suppl. 4): S487-S489 (1988).

Pepperell JR, Nemeth G, Yamada Y y Naftolin F. The type 1 angiotensin-II receptor mediates intracellular calcium mobilization in rat luteal cells. *Endocrinology* 133: 1678-1684 (1993).

Pepperell JR, Nemeth G, Yamada Y, Naftolin F y Merino M. Localized accumulation of angiotensin II and production of angiotensin-(1-7) in rat luteal cells, and effects on

steroidogenesis. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* (2006).

Phillips MI y Summers C. Angiotensin II in the central nervous system physiology. *Regulatory Peptides* 78: 1-11 (1998).

Porter JC, Mical RS, Kamberi IA, Grazia YR. A procedure for the cannularion of the pars distalis in the rat. *Endocrinology* 87: 197-201 (1970).

Porter JC, Nansel DD, Gudelsky GA, Foreman MM, Pilote NS, Parker CR Jr., Burrows GM, Bates GW y Madden JD. Neural control of gonadotropin secretion. *Federation Proceedings* 39: 2896-2901 (1980).

Pucell AG, Bumpus FM y Husain A. Rat ovarian angiotensin II receptors. Characterization and coupling to estrogen secretion. *Journal of Biological Chemistry* 262: 7076-7080 (1987).

Ramírez-Expósito MJ, Martínez JM, Prieto I, Alba F y Ramírez M. Comparative distribution of glutamyl and aspartyl aminopeptidase activities in mouse organs. *Hormone and Metabolism Research* 32: 161-163 (2000).

Ray PE, Castren E, Ruley EJ y Saavedra JM. Different effects of sodium or chloride on angiotensin II receptors in rats. *American Journal of Physiology* 258: R1008-R1015 (1990).

Reaux A, de Mota N, Zini S, Cadel S, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Corvol P y Llorens-Cortes C. PC18, an specific aminopeptidase N inhibitor, induces vasopressin release by increasing the half-life of brain angiotensin III. *Neuroendocrinology* 69: 370-376 (1999a).

Reaux A, Fournie-Zaluski MC y Llorens-Cortes C. Angiotensin III: a central regulator of vasopressine release and blood pressure. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 12: 157-162 (2001).

Reaux A, Fournie-Zaluski MC, David C, Zini S, Roques BP, Corvol P y Llorens-Cortes C. Aminopeptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 13415-13420 (1999b).

Rogi T, Tsujimoto M, Nakazato H, Mizutani S y Tomoda Y. Human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase. A new member of type II membrana-spanning zinc metallopeptidase family. *Journal of Biological Chemistry* 271: 56-61 (1996).

Roth C, Schrickler M, Lakomek M, Strege A, Heiden I, Luft H, Munzel U, Wuttke W y Jarry H. Autoregulation of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system during puberty: effects of antagonistic versus agonistic GnRH analogs in a female rat model. *Journal of Endocrinology* 169: 361-371 (2001).

Saavedra JM. Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cellular and molecular Neurobiology* 25: 485-512 (2005).

Saavedra JM. Brain and pituitary angiotensin. *Endocrine Reviews* 13: 329-380 (1992).

Saavedra JM y Chevillard C. Angiotensin converting enzyme is present in the subfornical organ and other circumventricular organs in the rat. *Neuroscience Letters* 29: 123-127 (1982).

Saavedra JM, Correa FM, Kurihara M y Shigematsu K. Increased number of angiotensin II receptors in the subfornical organ of spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension: Supplement* 4: S27-S30 (1986).

Sandberg K, Ji H y Catt KJ. Regulation of angiotensin II receptors in rat brain during dietary sodium changes. *Hypertension* 23: I137-I141 (1994).

Schäfers RF, Poller U, Pönicke K, Geissler M, Daul AE, Michel MC y Brodde O-E. Influence of adrenoceptor and muscarinic receptor blockade on the cardiovascular effects of exogenous noradrenaline and of endogenous noradrenalina released by

infused tyramine. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 355: 239-249 (1997).

Schäfers RF, Nürnberger J, Hermann B, Wenzel RR, Phillip T y Michel MC. Adrenoceptors mediating the cardiovascular and metabolic effects of α -methylnoradrenaline in humans. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289: 918-925 (1999).

Schultze D, Brunswig B y Mukhopadhyay AK. Renin and prorenin-like activities in bovine ovarian follicles. *Endocrinology* 124: 1389-1398 (1989).

Sharpe LG y Swanson LW. Drinking induced by injections of angiotensin into forebrain and mid-brain sites of the monkey. *Journal of Physiology (London)* 239: 595-622 (1974).

Shido O y Nagasaka T. Effects of intraventricular angiotensin II on heat balance at various ambient temperatures in rats. *Japanese Journal of Physiology* 35: 163-167 (1985).

Speth RC, Bumpus FM y Husain A. Identification of angiotensin II receptors in the rat ovary. *European Journal of Pharmacology* 130: 351-352 (1986).

Speth RC y Husain A. Distribution of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II-receptor binding sites in the rat ovary. *Biology of Reproduction* 38: 695-702 (1988).

Stornetta RL, Hawelu-Johnson CL, Guyenet PG y Lynch KR. Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science* 242: 1444-1446 (1988).

Sun Z, Cade R y Morales C. Role of central angiotensin II receptors in cold-induced hipertensión. *American Journal of Hipertensión* 15: 85-92 (2002).

Szczepanska-Sadowska E. Interaction of vasopressin and angiotensin II in central blood pressure and thirst. *Regulatory Peptides* 66: 65-71 (1996).

Thomas WG y Sernia C. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in the rat brain. *Neuroscience* 25: 319-341 (1988).

Thunhorst RL, Fitts DA y Simpson JB. Angiotensin converting enzyme in subfornical organ mediates captopril-induced drinking. *Behavioral Neuroscience* 103: 1302-1310 (1989).

Vervoort VS, Beacham MA, Edwards PS, Ladd S, Miller KE, de Mollerat X, Clarkson K, DuPont B, Schwartz CE, Stevenson RE, Boyd E y Srivastava AK. AGRT2 mutations in X-linked mental retardation. *Science* 296: 2401-2403 (2002).

Ward PE, Benter IF, Dick L and Wilk S. Metabolism of vasoactive peptides by plasma and purified renal aminopeptidase M. *Biochemical Pharmacology* 40: 1725-1732 (1992).

Wasilewska-Dziubinska E, Borowiec M, Chmielowska M, Wolinska-Witort E, Baranowska B. Alfa 1 adrenergic potentiation of progesterone accumulation stimulated by vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in cultured rat granulosa cells. *Neuro Endocrinology Letters* 23: 141-148 (2002).

Webley GE, Luck MR y Hearn JP. Stimulation of progesterone secretion by cultured human granulosa cells with melatonin and catecholamines. *Journal of Reproduction and Fertility* 84: 669-677 (1988).

Whitnall MH. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Progress in Neurobiology* 40: 573-629 (1993).

Wilk S, Wilk E y Magnusson RP. Purification, characterization and cloning of a cytosolic aspartyl aminopeptidase. *Journal of Biological Chemistry* 273: 15961-15970 (1998).

Wright JW y Harding JW. Important roles for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Research Reviews* 25: 96-124 (1997).

Wright JW, Krebs LT, Stobb JW y Harding JW. The angiotensin IV system: functional implications. *Frontiers in Neuroendocrinology* 16: 23-52 (1995).

Wright JW, Reichert JR, Davis CJ y Harding JW. Neuronal plasticity and the brain renin-angiotensin system. *Neuroscience and Behavioral Reviews* 26: 529-552 (2002).

Yang G, Gray TS, Sigmund CD y Cassell MD. The angiotensinogen gene is expressed in both astrocytes and neurons in murine central nervous system. *Brain Research* 817: 123-131 (1999).

Yoshimura Y. The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. *Frontiers in Neuroendocrinology* 18: 247-291 (1997).

Yoshimura Y, Karube M, Koyma N, Shiokawa S, Nanno T y Nakamura Y. Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT2 receptor subtype. *Endocrinology* 137: 1204-1211 (1996).

Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P y 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 11968-11973 (1996).

EFFECTOS DEL NO EN PROCESOS DE DEFENSA CELULAR.

El óxido nítrico (NO) es un gas del que se sabe que es sintetizado en las células por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) y que participa en la regulación de un gran número de procesos fisiológicos y patofisiológicos en el sistema circulatorio, sistema nervioso central, sistema nervioso periférico y sistema inmunológico. Reconocido su papel como neurotransmisor y como vasodilatador, en este curso la atención se dirigió hacia su implicación en la defensa normal frente a infecciones bacterianas y parasitarias. Asimismo, también se vieron diferentes técnicas que permiten estudiar la actividad y distribución de la NOS, la determinación de NO y la determinación de productos derivados del NO (nitratos y nitritos).

PROCESOS DEGENERATIVOS DEL SISTEMA NERVIOSO.

El objetivo de este curso fue el estudio detallado de los cambios anatómicos y funcionales producidos por lesiones en el sistema nervioso central y periférico, así como de los mecanismos de reparación. Para ello, tras un detenido análisis de la función neuronal y glial se inició el estudio de los distintos tipos de lesiones tanto a nivel periférico (degeneración walleriana y cromatolisis) como a nivel central (lesiones anisomórficas e isomórficas). También se han analizado las diferentes causas de muerte neuronal secundaria: radicales libres, aminoácidos excitadores, deficiencias enérgicas y las posibles interacciones de estos factores. Por último, se han descrito los diversos sistemas de regeneración, reparación y prevención de muerte neuronal secundaria y el destacado papel de la glía en la regeneración de lesiones.

PARASITOLOGÍA MOLECULAR.

Tras la identificación de parásito, vector y hospedador como elementos implicados en esta interacción ecológica entre organismos de distinta especie que es el parasitismo, se estudiaron los diferentes tipos de hospedadores y ciclos biológicos. Esta base teórica se acompañó de la realización de una práctica de campo en la que fueron tomadas muestras de hospedadores y vectores y varias prácticas de laboratorio, encaminadas a analizar la sangre de dichos animales mediante diversas técnicas moleculares.

HISTOLOGÍA MOLECULAR EN EXPERIMENTACIÓN Y DIAGNÓSTICO.

La Histología Molecular consiste en la identificación y caracterización in situ de los constituyentes celulares o titulares mediante la aplicación de diversas técnicas, entre las cuales se cuentan la hibridación in situ, la inmunocitoquímica y la microdissección láser. El empleo de estas técnicas no sólo es un importante apoyo para los estudios e investigaciones biológicos, sino también una muy útil herramienta en Biomedicina, pues la expresión de ciertos marcadores conduce al diagnóstico de algunas patologías y, en ocasiones, a la predicción del pronóstico de las mismas. Durante el desarrollo de este curso pudimos conocer los fundamentos de las principales técnicas de Histología Molecular y sus aplicaciones en experimentación y diagnóstico mediante el análisis de supuestos prácticos que facilitaron la integración de estos conocimientos al trabajo individual de cada doctorando.

TERAPIA GÉNICA.

Existe una gran esperanza de que enfermedades como la fibrosis quística, la distrofia muscular de Duchene, el cáncer, el SIDA, entre otras, puedan ser tratadas mediante terapia génica, esto es, la sustitución de un gen defectivo por un gen normal. Aún así, los obstáculos que supone la terapia génica son muy importantes. Se necesita mucha información sobre la patología molecular de un desorden genético, antes de que los investigadores puedan decidir si este desorden es factible a la terapia génica, y si es así, también habría que tener en cuenta diferentes asuntos sociales y éticos. El gen en cuestión debe ser clonado y además debe existir una manera segura de introducir el gen en las células, aspectos que se han visto a lo largo del curso. Especial atención se le dedicó a la terapia génica dirigida al HIV, destinada a realizar muchos propósitos. Tales propósitos son proteger células no infectadas residuales y eliminar células infectadas. Pero lo que más se intenta es reducir la infección en personas infectadas y evitar la expansión del virus a través de la población.

BASES MOLECULARES DEL CÁNCER.

El cáncer se refiere de forma amplia a todas las variantes de neoplasias malignas que pueden originarse en diferentes tejidos. En consecuencia, no es una enfermedad única sino una categoría genérica de enfermedad, lo que se refleja en el hecho de que a pesar de sus diferentes sitios de origen, manifestaciones clínicas, evolución y pronóstico tienen en común ciertas características biológicas fundamentales que las diferencian de otros tipos de enfermedad. Durante el transcurso de este curso se estudiaron los genes implicados en el crecimiento y la diferenciación celular (protooncogenes), que al mutar a oncogenes conducen a un crecimiento descontrolado de las células, dotándolas con características erosivas e invasivas, esto es, a la carcinogénesis. Además, se vieron los diferentes tipos de carcinógenos o factores determinantes que favorecen la transformación maligna, diversas técnicas de diagnóstico, prestando especial interés a aquellas basadas en la imagen, y varias formas de tratamiento.