

R. 3.985

T.D.  
B/22



EFFECTOS DE LOS FOTOPERIODOS , ADMINISTRACION  
DE ESTROGENOS Y CASTRACION SOBRE LA ACTIVIDAD PEP  
TIDASICA Y METABOLISMO OXIDATIVO EN HIPOTALAMO Y  
CORTEZA CEREBRAL

María del Carmen Bellido Gámez

Tesis presentada para optar al grado de Doctor por  
la Facultad de Medicina de Sevilla.

1978.



A Rafael



D. PEDRO MONTILLA LOPEZ, Doctor en Medicina, Profesor Agregado de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba, y D. JUAN ANTONIO BELLIDO GAMEZ, Doctor en Medicina, Profesor Agregado de Fisiología y Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla

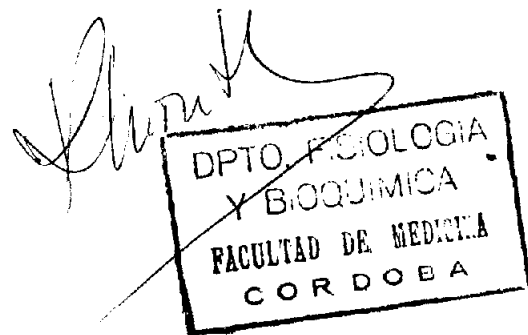
C E R T I F I C A N:

Que Dña. MARIA DEL CARMEN BELLIDO GAMEZ, ha realizado bajo nuestra tutela y dirección, en los Departamentos de Fisiología y Bioquímica de las Facultades de Medicina de Córdoba y Sevilla, el trabajo titulado "Efectos de los fotoperiodos, administración de estrógenos y castración sobre la actividad peptidásica y metabolismo oxidativo en hipotálamo y corteza cerebral", que consideramos satisfactorio para ser presentado como Tesis Doctoral en la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Y para que conste donde convenga, con el visto bueno de los directores de Departamento, Prof. Fernández de Molina de la Facultad de Medicina de Córdoba y Prof. Mir Jordano de la Facultad de Medicina de Sevilla, firmamos el presente documento en Sevilla a dieciocho de mayo de 1978.



*Mir*



*A. Torres del Olmo*



### ABREVIATURAS

- ACTH = Hormona adrenocorticotropa.
- AHT = Area hipofisotrópica de Halász.
- AMPc = Adenosin monofostato cíclico.
- APO = Area preóptica.
- ATP = Adenosin trifosfato.
- C = Animales controles.
- CAPA = Actividad L-cisteina-aminopeptidasa.
- FSH = Hormona foliculo-estimulante.
- FSH-RF=Factor liberador de FSH.
- Gx = Animales gonadectomizados.
- HIOMT= Actividad hidroxindol-O-metiltransferasa.
- ICDH = Actividad isocitrato-deshidrogenasa.
- IN = Iluminación normal.
- LAP = Actividad leucinaminopeptidasa (Arilamidasa).
- LH = Hormona luteinizante.
- LH-RF= Factor liberador de LH.
- LP = Luz permanente.
- MDH = Actividad malato-deshidrogenasa.
- N-AT = Actividad N-acetiltransferasa.
- OP = Oscuridad permanente.
- VE = Valerianato de estradiol.

## I N D I C E

INTRODUCCION .....	1
LUZ Y RITMOS BIOLOGICOS	
1. Ritmos biológicos .....	3
1.1. Ritmos anuales: ciclos reproductivos ...	4
1.2. Ritmos de 24 horas .....	6
1.2.1. Ritmos pineales .....	7
1.2.2. Ritmos hipotálamo-hipofisarios .....	11
1.2.3. Ritmos adrenales .....	12
1.3. Ritmos con periodo crítico .....	12
1.3.1. Regulación por mecanismos endógenos..	14
1.3.1.1. Mecanismo tónico: AHT.....	14
1.3.1.2. Mecanismo fásico .....	17
1.3.1.2.1. Areas hipotalámicas.....	17
1.3.1.2.1.1. Area preóptica .....	18
1.3.1.2.1.2. Area hipotalámica an- terior.....	18
1.3.1.2.1.3. Neuronas dopaminérgica	18
1.3.1.2.2. Sistema límbico .....	19
1.3.1.2.2.1. Amígdala .....	19
1.3.1.2.2.2. Hipocampo .....	20
1.3.1.2.3. Pineal .....	20

1.3.2. Regulación por cambios en el medio interno:	
Mecanismos de retroalimentación.....	22
1.3.2.1. Largos .....	23
1.3.2.1.1. Por estrógenos .....	23
1.3.2.1.2. Por progesterona .....	23
1.3.2.2. Cortos .....	24
1.3.2.3. Ultracortos .....	24
2. Interacción luz ritmos biológicos .....	25

## ENZIMAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Introducción.....	31
Peptidasas en el sistema nervioso central .....	32
1. Endopeptidasas .....	35
1.1. Ácidas .....	35
1.2. Neutras .....	38
2. Exopeptidasas .....	39
2.1. Amino peptidasas .....	39
2.2. Carboxipeptidasas .....	41
2.3. Dipeptidasas .....	42
2.4. Arilamidases .....	43
Oxidoreductasas en el sistema nervioso central .....	46
Peptidasas en el sistema nervioso central y su relación con el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas .....	49
Oxidoreductasas en el sistema nervioso central y su relación con el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas .....	58

## MATERIAL Y METODOS

1. Animales .....	63
2. Procedimientos experimentales .....	64

## RESULTADOS

1. Animales controles .....	84
2. Efecto de la administración de valerianato de estradiol. ....	85
3. Efecto de la castración .....	90
4. Efecto de la castración mas la administración de valerianato de estradiol .....	90
5. Efecto de los cambios en los fotoperíodos OP y LP..	98
5.1. Animales controles .....	98
5.2. Animales tratados con valerianato de estradiol .....	101
5.3. Animales castrados .....	105
5.4. Animales castrados y tratados con valerianato de estradiol .....	109
6. Modulación por los cambios en los fotoperíodos ...	112
6.1. Administración de valerianato de estradiol ...	112
6.2. Castración .....	117
6.3. Administración de valerianato de estradiol en animales castrados .....	122
6.4. Castración en animales tratados con valerianato de estradiol .....	128

DISCUSION

1. Animales controles .....	134
2. Efecto de la administración de valerianato de estradiol. ....	135
3. Efecto de la castración .....	139
4. Efecto de la castración y administración de valerianato de estradiol .....	141
5. Efecto de los cambios en los fotoperíodos OP y LP.	142
6. Modulación por los cambios en los fotoperíodos ...	151
CONCLUSIONES .....	154
BIBLIOGRAFIA .....	157



## INTRODUCCION

El ciclo reproductivo de los vertebrados está fundamentalmente regulado por el sistema adenohipofisario, este a su vez es controlado por zonas del sistema nervioso central que actúan como transductores neuroendocrinos, especialmente hipotálamo (KORDON y GOGAN, 1968; MOTTA y cols., 1970) y glándula pineal (WURTMAN y cols., 1968). Otras regiones del cerebro como corteza y sistema límbico (ELEFTHERIOU, 1975) participan en la modulación del ciclo reproductivo a través de su acción sobre el área hipotalámica, encargada de la síntesis y liberación de hormonas gonadotropas. Además el eje hipotálamo-hipofisis-gónadas está profundamente influenciado por informaciones que le llegan por medio de receptores íntero y exteroceptivos, siendo los más significativos en este sentido, los visuales (WURTMAN, 1967) y olfativos, seguidos de los auditivos y táctiles (GREPP, 1961).

Esta compleja modulación de la actividad hipotalámica permite comprender mejor como el sistema neuroendocrino puede responder de modo apropiado a condiciones extremadamente variadas.

LUZ Y RITMOS BIOLÓGICOS

## LUZ Y RITMOS BIOLOGICOS

Dado que la luz es un factor determinante de todos los ritmos biológicos en general, y del reproductivo en particular, como ha sido ampliamente demostrado en muchos vertebrados (GANONG, 1959; THIBAUT, y cols., 1966) y cambios artificiales han sido realizados en la parte experimental de la presente Tesis, consideramos importante comentar detenidamente las relaciones luz-ritmos biológicos y el mecanismo de esta interacción.

### 1. RITMOS BIOLOGICOS

Vivimos en un medio en el cual las condiciones ambientales cambian constantemente, y a menudo, según modalidades que se repiten de forma periódica y regular.

Como consecuencia de la rotación de la tierra alrededor del sol, se suceden las diferentes estaciones del año, aumentando progresivamente la duración diaria de la luz desde el solsticio de invierno al solsticio del verano, después del cual, disminuye de forma regular y progresiva hasta el siguiente solsticio de invierno.

Como consecuencia de la rotación de la tierra sobre su propio eje, alternativamente se suceden el día y la noche.

Dado que todos los seres vivos se encuentran influenciados por las modificaciones estacionales de la duración del fotoperíodo y por los cambios de luz-oscuridad diarios, es posible clasificar todos los ritmos biológicos, siguiendo a HALBERG (1969), en tres grandes grupos:

1.1. Ritmos anuales.- Aquellos ciclos biológicos que coinciden con los cambios cíclicos anuales en la duración de los fotoperíodos.

1.2. Ritmos circadianos.- Aquellos ciclos biológicos que están sincronizados con los períodos diarios luz-oscuridad.

1.3. Ritmos de período crítico.- En los que se incluyen todos los ciclos biológicos, que sin ajustarse a ningún ritmo de luz pueden ser influenciados de alguna forma por la duración de los fotoperíodos.

A continuación comentamos de entre los ritmos biológicos anuales, circadianos y de período crítico, aquellos más directamente relacionados con el tema de la presente Tesis.

1.1. Ritmos anuales.- Los ciclos anuales se manifiestan en los animales en la migración, hibernación, reproducción, etc.

El ritmo anual mejor estudiado ha sido el ciclo reproductivo.

Desde tiempo es conocida la relación entre perioricidad estacional y ciclo reproductivo en muchas especies, así las aves de las regiones distantes del ecuador anidan en primavera, cuando empieza a elevarse la temperatura y a aumentar la duración de la luz diurna. Siempre se consideró la temperatura como factor determinante de este ciclo, hasta que en 1925, ROWAN observó la relación entre los cambios de iluminación ambiental y modificaciones en la actividad gonadal en algunas especies animales; concretamente puso de manifiesto que el junco apizarrado (*Junco Hyemalis*) cuando es sometido, de forma artificial y prolongada -a ritmo creciente de luz- presenta el aumento testicular a finales de otoño o principio de invierno, fenómeno que en condiciones de iluminación natural ocurre en primavera.

Otra aportación de interés es la de BISSONETTE y CHAPNICK (1930) que demostraron que el peso de los testículos del estornino europeo (*Sturnus vulgaris vulgaris*) aumenta 6 veces en condiciones de iluminación natural entre el 15 de marzo y el 1 de abril. BISSONETTE (1932) encuentra que una prolongación artificial del período de iluminación, puede inducir un estado de estro prematuro en un animal monoestral como es el hurón. Este animal que se encuentra en estado de regresión gonadal durante el período otoño-invierno, sometido a iluminación creciente a partir de los primeros días de otoño, la hem-

bra comienza su ciclo estral en invierno.

También son clásicas las experiencias y observaciones de MARSHALL (1937) que agrupó a los animales en reproductores de días cortos y de días largos, basándose en la relación entre duración lumínica de los días y período reproductivo. La oveja, un ejemplo típico de reproductores de días cortos, tiene su período de mayor actividad gonadal en los meses de septiembre y noviembre en el hemisferio boreal, pero si estos animales son trasladados al hemisferio austral, tienen su época de mayor fertilidad entre los meses de marzo y abril, o sea, en el período anual en que la iluminación es semejante a los meses de otoño en el hemisferio boreal.

1.2. Ritmos de 24 horas.— La alternancia de los días y las noches se acompaña, en la mayoría de los seres vivos, de cambios cíclicos en diversas funciones biológicas: actividad motora, sueño, ingesta de alimento y agua, temperatura corporal, etc. Muchas glándulas endocrinas segregan sus hormonas con un ritmo de 24 horas.

Se ha comprobado que los ritmos circadianos están sincronizados y son claramente dependientes de la presencia o ausencia de luz, día-noche (HALBERG, 1969).

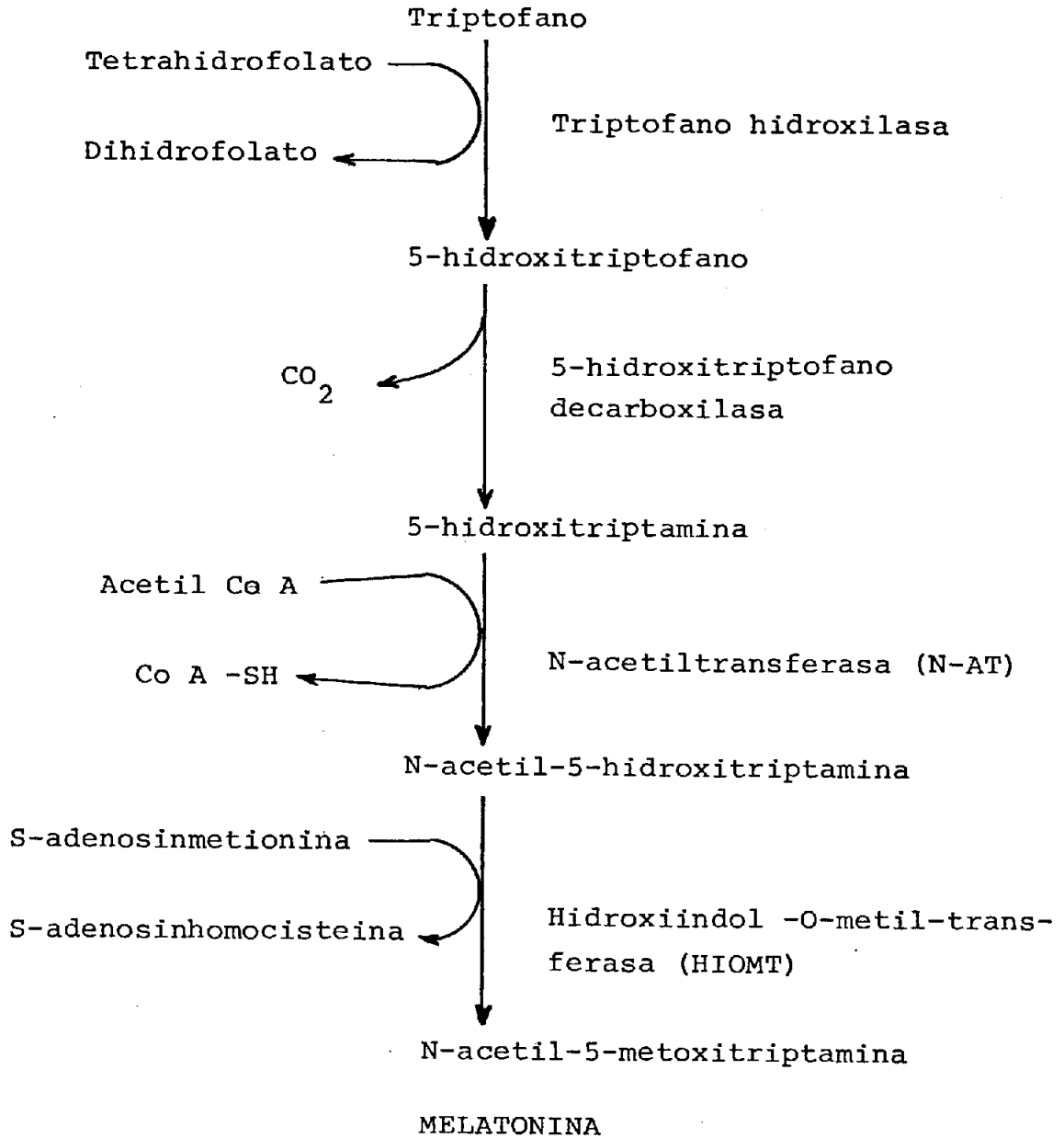
Describiremos a continuación algunos de los ritmos biológicos circadianos mejor conocidos y relacionados con el tema

de la presente Tesis.

1.2.1. Ritmo circadiano pineal.- Los cambios cíclicos en la concentración de indolaminas y de actividad enzimática, de las enzimas que intervienen en la síntesis de melatonina (véase esquemas 1 y 2), descritos en la glándula pineal, coinciden exactamente con el ritmo circadiano natural (véase figura 1).

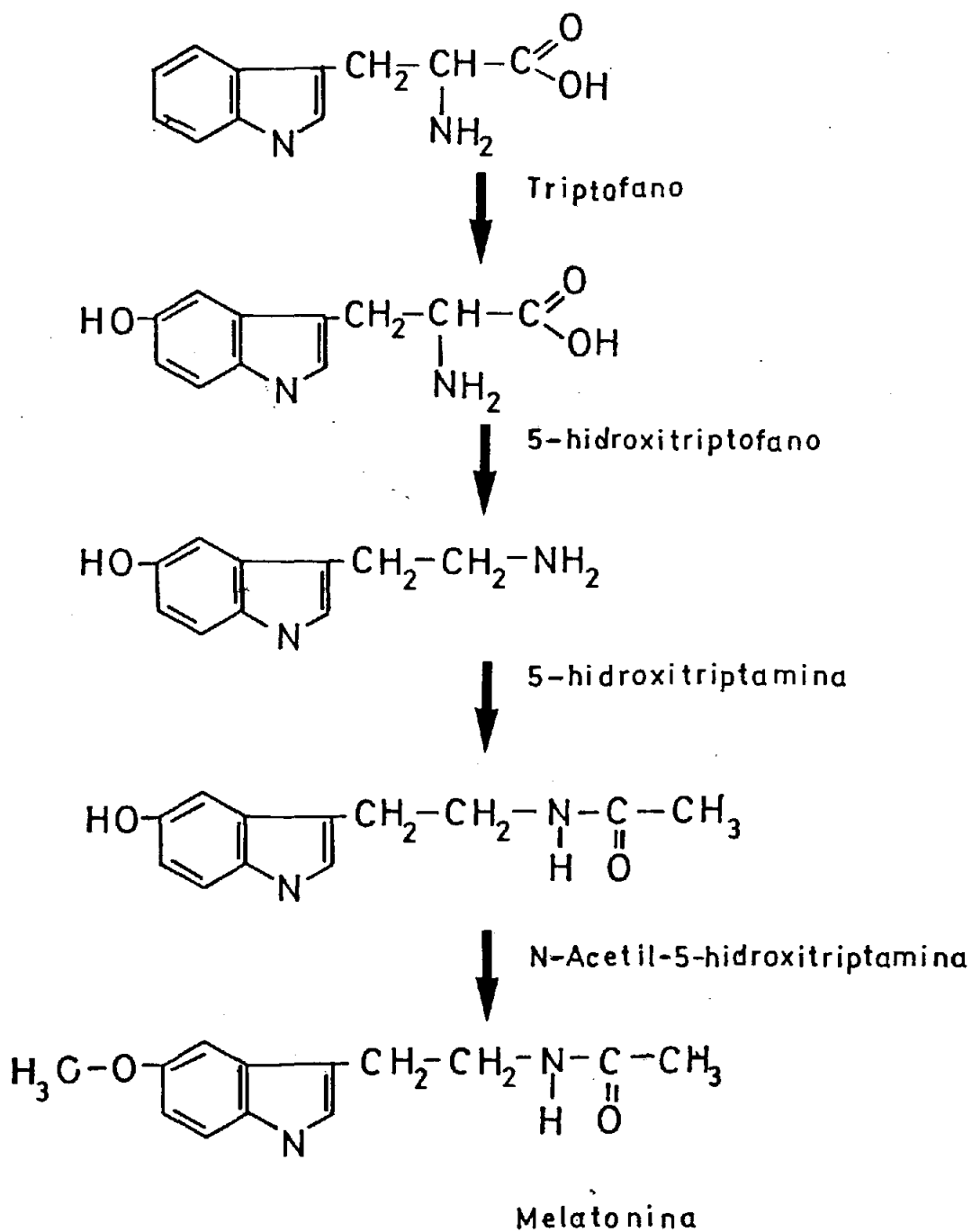
SHIBUYA y cols. (1978) han encontrado diferencias significativas en la actividad de la triptogano hidroxilasa -enzima que inicia la síntesis de melatonina- durante el día y la noche, describiendo los valores mas altos durante la noche.

QUAY (1963) encontró un ritmo circadiano en la concentración de serotonina en la glándula pineal, con el pico mas alto durante el día. Estos valores han sido confirmados posteriormente (SNYDER y cols., 1965) e interpretados en el sentido de que durante la noche la serotonina -aunque es sintetizada en mayor cuantia- es liberada por los pinealocitos (WURTMAN, 1971), a la vez que no puede descartarse un mayor consumo por incremento de la actividad N-acetiltransferasa (N-AT) (ROMERO y AXELROD, 1975). Esta última enzima cataliza el primer paso específico de la síntesis de melatonina, y su actividad aumenta en un 70% durante la noche (KLEIN y WELLER, 1970). Este aumento de actividad explica la mayor concentración de N-acetil-5-hi-



Esquema 1 .- Biosíntesis de melatonina.





Esquema 2.- Biosíntesis de melatonina.

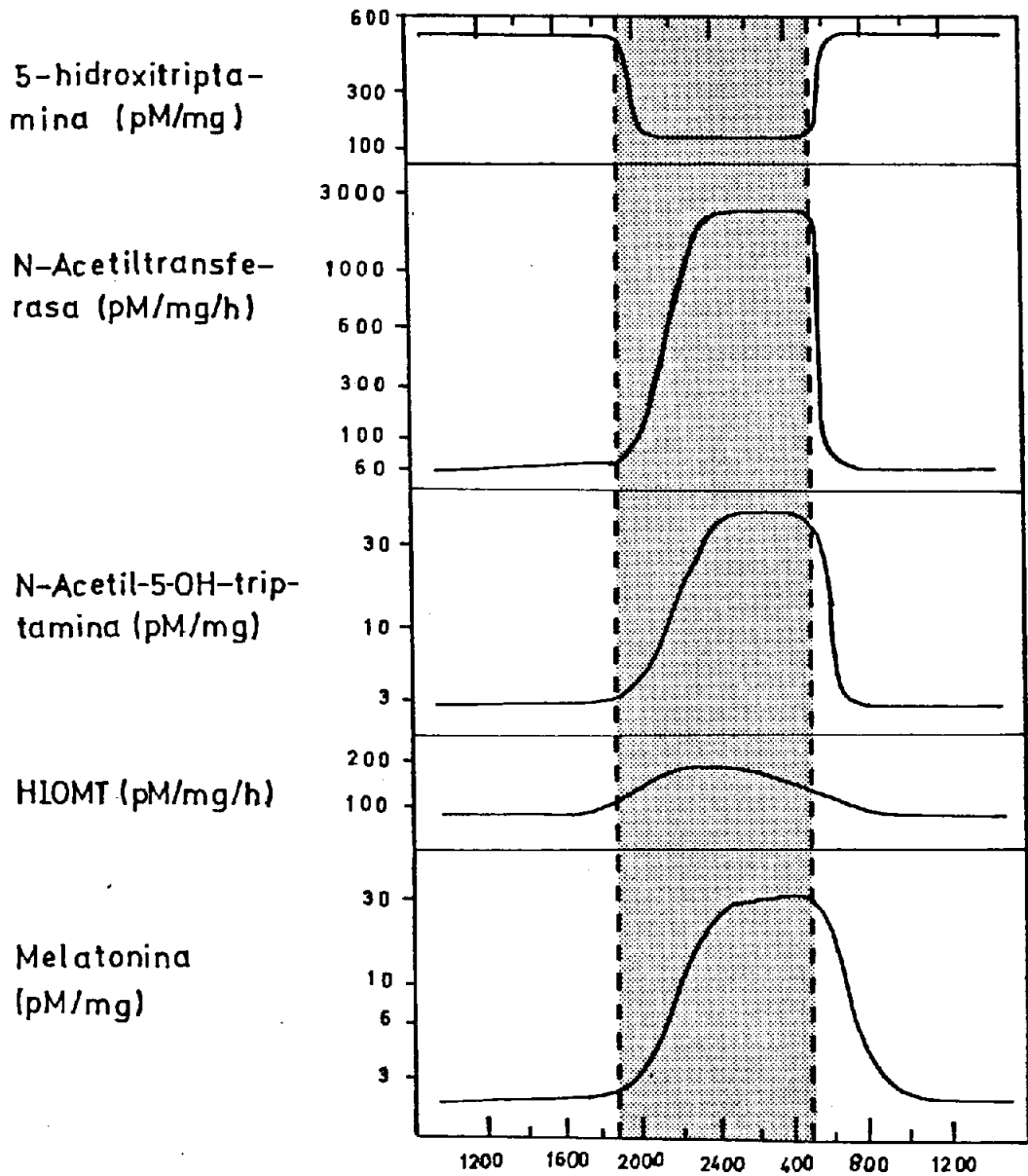


Fig. 1.- Ritmos circadianos en el metabolismo de indoles en pineal (Tomado de KLEIN y YUWILER, 1973).

droxitriptamina durante la noche encontrada en pineal (KLEIN y WELLER, 1972).

La actividad de la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIO-MT) se encuentra elevada durante la noche (AXELROD y cols., 1965), aunque esta elevación no sobrepasa el 10-30% de su valor diurno. La actividad HIOMT, enzima limitante, no sufre cambios amplios ni rápidos, sino cambios tónicos que modulan la biosíntesis de melatonina en la glándula pineal (KLEIN, 1978), sustancia que también aumenta en concentración durante la noche (RALPH y cols., 1971).

Además de este ritmo circadiano en la biosíntesis de melatonina, se han descrito en pineal otros ritmos circadianos que de una forma u otra están relacionados con el metabolismo de la melatonina, como son: aumento del peso de la glándula pineal (AXELROD y cols., 1965); actividad de la tirosina hidroxilasa (McGEER y McGEER, 1966); contenido de noradrenalina (WURTMAN, 1971); sensibilidad de los receptores beta-adrenérgicos pineales a la noradrenalina (ROMERO y AXELROD, 1974).

1.2.2. Ritmos circadianos hipotálamo-hipofisarios.- Se han descrito ritmos de 24 horas en : liberación de ACTH por hipofisis (GRABER y cols., 1964) ; nivel de TSH en hipofisis (BAKKE y LAWRENCE, 1965) ; en la rata hembra se han encontrado ritmos circadianos en la liberación de LH (SCHWARTZ

y BARTOSIK, 1962), de FSH-RF y LH-RF (FLERKÓ, 1974) y según NAIK (1976) el transporte de la LH-RF a la eminencia media también es cíclico.

1.2.3. Ritmo adrenal.- PINCUS (1934) observó una disminución de la excreción urinaria de cetosteroides durante la noche en hombres jóvenes. Posteriormente HALBERG y WISSCHER (1950) encuentran que los niveles de eosinófilos muestran su acmé al mediodía, antes que la tasa de secreción adrenal comience a incrementarse (GUILLEMIN y cols., 1959). También BARTTER y cols., (1962) han descrito un ritmo diurno en la secreción de aldosterona.

En un plano experimental el ritmo adrenal ha podido ser modificado por las variaciones del horario de iluminación. Así en ratas hembras la luz continua provoca una disminución del peso de las glándulas suprarrenales (FISKE y LAMBERT, 1962) atribuida a la pérdida del ritmo de 24 horas de liberación de ACTH (CRITCHLOW, 1963); KRIEGER (1973) encuentra que la periodicidad circadiana de los niveles de corticosterona en la rata no persiste tras la enucleación o en condiciones de oscuridad o luz permanente.

1.3. Ritmos con período crítico.-Los mamíferos poliestrales que ovulan espontáneamente presentan -en circunstancias ambientales normales- ovulaciones periódicas que no coinciden con el ritmo anual ni con el circadiano. Es evidente por otro

lado que las modificaciones artificiales del período de iluminación y los cambios en el fotoperíodo durante el año influyen notablemente en su periodicidad ovulatoria y en su conducta sexual.

La rata, como mamífero poliestral con ovulación espontánea, presenta en lo que se refiere a su actividad gonadal, un típico ritmo con período crítico -período de secreción pre-ovulatoria de LH- que coincide según EVERETT y SAWYER (1950) con las 14 horas del día del proestro, la ovulación ocurre de 10 a 14 horas más tarde, precisamente en la mitad del período de oscuridad (SCHWARTZ y McCORMAC, 1972). Este período crítico puede adelantarse, en un número igual de horas, y tras 2 o 3 ciclos estrales, cuando se adelanta artificialmente el comienzo del período de iluminación diario.

El estro, evento nocturno en la rat, puede ocurrir durante el día invirtiendo artificialmente las horas de exposición a la luz (HEMMINGSSEN y KARUP, 1937).

A partir de estos trabajos, numerosas experiencias y observaciones han demostrado la importancia de la luz en la estimulación o inhibición de la actividad sexual en mamíferos (THIBAUT y cols., 1966). La iluminación ambiental continua en la rata tiene como respuesta la producción de un estado de estro permanente (CRITCHLOW, 1963), hipertrofia hipofisaria (FISKE, 1941) y bloqueo de la ovulación (FLERKÓ, 1966).

En contraste con el macho, los procesos reproductivos en los mamíferos hembras se caracterizan por modificaciones cíclicas en el tracto genital y en la receptividad sexual.

Los ciclos reproductivos en los mamíferos hembras dependen de las influencias que determinadas áreas del sistema nervioso central -hipotálamo, sistema límbico, glándula pineal, etc.- ejercen sobre la adenohipofisis. Estas influencias son, siguiendo a BARRACLOUGH y GORSKI (1961), unas de tipo tónico, que permiten la descarga continuada de gonadotrofinas suficiente para mantener la secreción de estrógenos y el crecimiento folicular, y otras de tipo fásico que inducen el rápido aumento de LH necesario para la ovulación. Todo este complejo mecanismo de regulación funciona como un verdadero reloj endógeno (MOORE y EICHLER, 1976), modulado por cambios en el medio interno del animal o en su entorno (FLERKÓ, 1974) (véase figura 2 ).

1.3.1. Mecanismos endógenos del sistema nervioso central (véase figura 3 ).

1.3.1.1. Mecanismo tónico de la secreción de gonadotrofinas.- El término de área hipofisotrópica (AHT) fué introducido por HALÁSZ y cols. (1962) para denominar la región del hipotálamo mediobasal, fundamentalmente nucleos arcuato y ventromedial, donde se genera el mecanismo de regu-

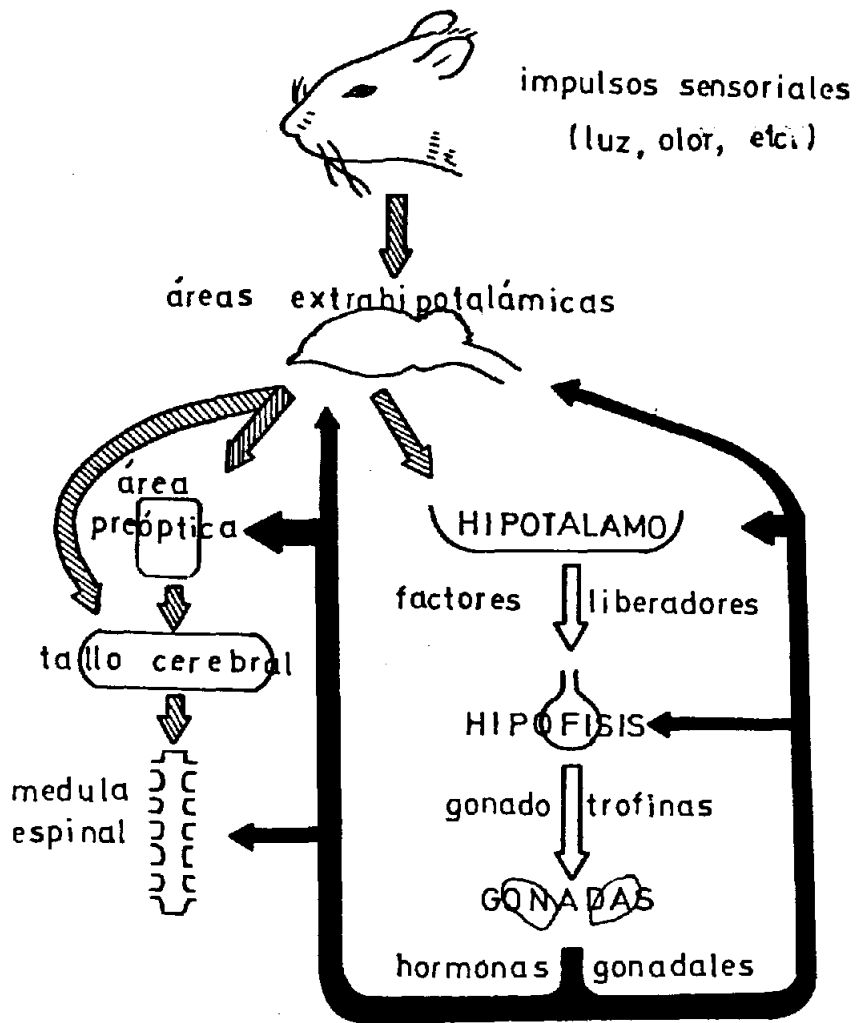


Fig. 2.- Mecanismos reguladores de la secreción de gonadotrofinas (Tomado de McEwen y cols., 1972).

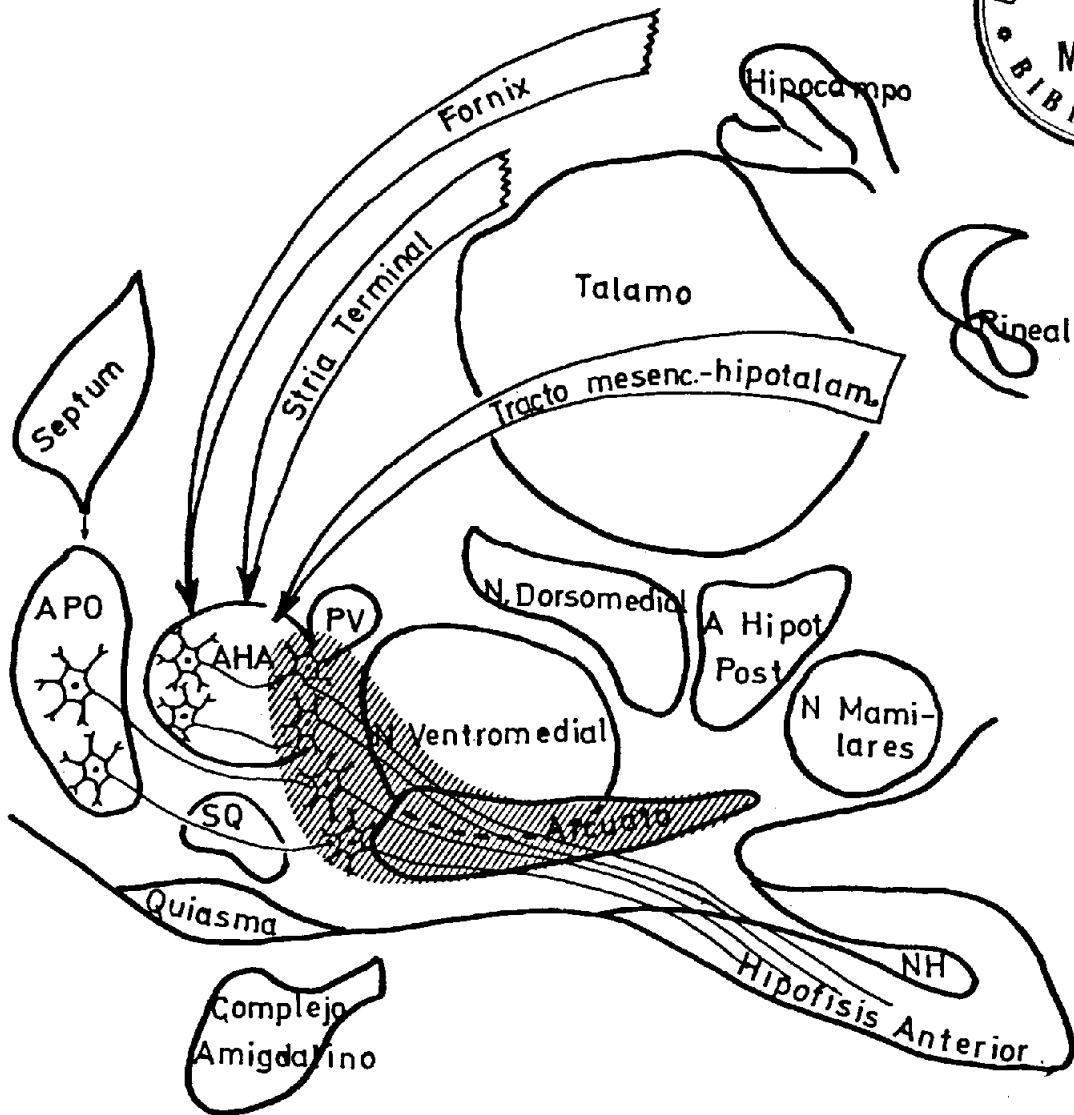


Fig. 3.- Representación esquemática del control hipotálamico y límbico de la secreción de FSH y LH. Area hipofisotrópica (rayada); AHA, área hipotálamica anterior; APO, área preóptica; PV, núcleo paraventricular; SQ, núcleo supraquiasmático. (Tomado de FLERKO, 1971)



lación tónica de secreción de gonadotrofinas.

El área hipofisotrópica está formada, según RETHELYI y HALÁSZ (1970), por las células nerviosas de las cuales parte el tracto de fibras tuberoinfundibulares o sistema neurosecretor *parvicelular* que alcanza la eminencia media.

La interrupción de todas las conexiones neurales del área hipofisotrópica, método útil para valorar la capacidad funcional, bloquea la ovulación y la hipertrofia óvarica compensadora, pero no produce atrofia ovárica (HALÁSZ, 1969). Estas observaciones indican que el área hipofisotrópica es capaz de mantener por si misma la secreción basal tónica de gonadotrofinas (FLERKÓ, 1974), pero no mantiene la liberación fásica.

En orden a localizar las células nerviosas que sintetizan específicamente los dos factores liberadores gonadotróficos, se ha comprobado que FSH-RF se sintetiza en la región anterodorsal (MESS y MARTINI, 1968), debajo del núcleo paraventricular (MOTTA y cols., 1973), y LH-RF en la región anteroventral (MESS y MARTINI, 1968). Estos hallazgos no están de acuerdo con la hipótesis mantenida por SCHALLY y cols. (1971) de un factor de liberación común para FSH y LH.

1.3.1.2. Mecanismo fásico de secreción de gonadotrofinas.

1.3.1.2.1. Áreas hipotalámicas.- Existen va-

rias áreas hipotalámicas implicadas en el mantenimiento de la liberación fásica de gonadotrofinas.

1.3.1.2.1.1. Area preóptica.- Este área anatómica está íntimamente relacionada con el proceso de la ovulación. Lesiones electrolíticas que interrumpen sus conexiones con el área hipofisotrópica -nucleo arcuato, ventromedial y paraventricular (SWANSON, 1976)- provocan en la rata un cuadro de estro permanente (FLERKÓ, 1962); su estimulación, por el contrario, determina un aumento de la liberación cíclica de LH (KAWAKAMI y cols., 1971) y en ratas con estro permanente induce la ovulación (BUNN y EVERETT, 1957).

1.3.1.2.1.2. Area hipotalámica anterior.- Este área está relacionada con la liberación de FSH dependiente del nivel de estrógenos circulantes (FLERKÓ, 1956). Lesiones en el área hipotalámica anterior (FLERKÓ, 1962), o la interrupción de sus conexiones con el área hipofisotrópica (KOVES y HALÁSZ, 1969) provocan una ausencia de respuesta ovárica compensadora.

1.3.1.2.1.3. Sistema tubero-infundibular dopaminérgico (TIDA) del área hipofisotrópica.- Según HOKFELT y FUXE, (1972) los terminales de estas neuronas actúan, por contactos axoaxónicos, inhibiendo la liberación de LH-RF, a nivel de la región lateral de la eminencia media (FUXE y cols., 1976).

1.3.1.2.2. Sistema límbico.- Es generalmente aceptado que determinadas áreas del sistema límbico, amígdala e hipocampo, modulan la liberación cíclica de gonadotrofinas (FLERKÓ, 1974).

1.3.1.2.2.1. Amígdala.- Debido a la complejidad de las interacciones funcionales entre los distintos núcleos de la amígdala, no está claro su papel en la regulación de la secreción de gonadotrofinas, pero es evidente que la zona corticomedial es la más importante (GLOOR, 1975) y que ejerce su acción por sus conexiones, a través de la estria terminal, con el área preóptica-hipotalámica anterior y con el área hipofisotrófica (De OLMOS, 1972).

La estimulación de la amígdala (VELASCO y TALEISNIK, 1969a) o de la amígdala medial (SCHOOT, 1974) provoca la ovulación en ratas con estro permanente; su lesión, por el contrario, disminuye el grado de hipertrofia ovárica compensadora (SMITH y LAWTON, 1972). Estos hallazgos hablan en favor de un efecto estimulador de la amígdala sobre la liberación cíclica de gonadotrofinas, LH y FSH.

De otro lado, hay experiencias que demuestran que la amígdala corticomedial inhibe la secreción de gonadotrofinas. Lesiones electrolíticas de éste área incrementan la síntesis y/o liberación de LH (LAWTON y SAWYER, 1970), y en ratas pre-

púberes, adelantan el comienzo de la pubertad (ELWERS y CRITCHLOW, 1966).

SAWYER (1972) sugiere que la amígdala corticomediales contiene dos tipos de neuronas: unas de tipo inhibidor sobre la función gonadotrófica en general, y otra de tipo facilitador sobre la liberación física de LH.

Dentro del área corticomediales, y siguiendo a DUCKE (1974), la zona anterior está relacionada con la maduración del folículo y la posterior con la ovulación. Recientemente DUCKE y cols., (1976) han observado que la acción de estas dos zonas sobre la secreción de gonadotrofinas es estimulante cuando se aproxima el comienzo de la pubertad.

1.3.1.2.2.2. Hipocampo.- También existe una dualidad de resultados en lo que se refiere al efecto del hipocampo sobre la liberación de gonadotrofinas.

La estimulación del hipocampo facilita la liberación de gonadotrofinas (KAWAKAMI y cols., 1966) y provoca la ovulación en ratas con estro permanente (SCHOOT, 1974); sin embargo VELLASCO y TALEISNIK (1969b) obtienen el efecto contrario, una reducción de la frecuencia ovulatoria.

1.3.1.2.3. Pineal.- La glándula pineal está íntimamente relacionada con la liberación física de gonadotrofinas, sobre la cual ejerce un efecto inhibidor.

La pinealectomia produce hipertrofia óvaria en ratas inmaduras (KITAY, 1954), incrementa la frecuencia del estro vaginal en la rata adulta (ALBERTAZZI y cols., 1966) y evita la atrofia gonadal tras la ceguera (SORRENTINO y BENSON, 1970).

Este efecto antigonadotrópico se debe a los indoles de origen pineal, serotonina, 5-hidroxitriptofol, 5-metoxitriptofol y melatonina (KAPPERS y cols., 1974), y a unos polipéptidos, extremadamente ricos en triptófano, y considerados por PUN y LOMBROZO (1964) como específicos de la glándula pineal; uno de ellos según PAVEL y PETRESCU (1966), puede ser la arginina vasopresina. REITER (1976) ha sugerido que en la glándula pineal las indolaminas controlan la síntesis y/o liberación de estos polipéptidos.

En los núcleos hipotalámicos arcuato y ventromedial, que contienen neuronas productoras de LH-RF (MESS y cols., 1970), se ha demostrado la presencia de otros dos tipos de neuronas, unas que contienen serotonina (SMITH y cols., 1972) -sintetizada parcialmente por ellas (BROWNSTEIN y cols., 1976)- y otras una fracción protéica (SMITH, 1972), similar a la encontrada por PUN y LOMBROZO (1964) en la glándula pineal.

Para explicar como la pineal ejerce su acción antigonadotrópica, KAPPERS y cols. (1974), sugieren que las neuronas serotoninérgicas, presentes en los núcleos arcuato y ventromedial, al ser estimuladas por los distintos compuestos pineales,

inhiben la actividad funcional de las neuronas, presentes en el mismo área, productoras de factor liberador de LH (LH-RF).

### 1.3.2. Medio interno: Señales hormonales

Los mecanismos endógenos del sistema nervioso central, que regulan el ciclo reproductivo de los mamíferos hembras, están modulados por los niveles de hormonas circulantes: esteroides gonadales -estrógenos y progesterona-, gonadotropinas -foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH)- y factores de liberación gonadotrópicos, FSH-RF y LH-RF. Las modificaciones en los niveles de estas hormonas es una señal que en el hipotálamo se traduce en un incremento o disminución de la síntesis y/o liberación de FSH-RF y/o LH-RF.

El desarrollo de técnicas biológicas (STELLMAN y POHLEY, 1953; PARLOW, 1961) y radioinmunológicas (YALOW y BERSON, 1956), han permitido establecer la relación entre niveles hormonales y actividad gonadotrópica hipotálamo-hipofisis.

Estos mecanismos de regulación se conocen con el nombre de mecanismos de retroalimentación o de *feedback* neurohormonales. Según la respuesta del receptor a la señal hormonal se distinguen dos tipos de mecanismos, uno negativo y otro positivo. Se habla de mecanismos de retroalimentación negativo, cuando al incrementarse la concentración de las hormonas, que actúan como señal, disminuye la síntesis y/o liberación de

hormonas en el receptor, y de mecanismos positivos cuando existe una relación directa entre señal y actividad del receptor.

En función de la distancia entre el órgano emisor de la señal y el receptor, pueden clasificarse los mecanismos de retroalimentación en largos, cortos y ultracortos.

1.3.2.1. Mecanismos de retroalimentación largos.- La señal, estrógenos y progesterona, producida en las gónadas llega a los receptores situados en la hipófisis anterior y en el hipotálamo (WILLIAMS-ASHMAN y REDDI, 1971), especialmente en la región mediobasal y eminencia media.

1.3.2.1.1. Estrógenos.- La administración de estradiol (GREEP y JONES, 1950), o su implantación en la eminencia media (MOTTA y cols., 1970) disminuye, en la rata hembra adulta, la síntesis y/o liberación de LH y FSH; la castración, por el contrario, incrementa los niveles de LH y FSH (DO-NOVAN, 1966).

Estos resultados demuestran que los estrógenos en la rata hembra adulta actúan como retroalimentación negativa sobre FSH y LH. Sin embargo en ratas prepúberes la implantación de estradiol en la eminencia media actúa con retroalimentación positiva sobre LH (MOTTA y cols., 1968).

1.3.2.1.2. Progesterona.- En ratas hembras ovariectomizadas, la administración de progesterona inhibe la

hipertrofia ovárica compensadora (LABHSETWAR, 1968) y su implantación en hipotálamo disminuye los niveles de FSH y FSH-RF (MOTTA y cols., 1970).

1.3.2.2. Mecanismos de retroalimentación cortos.- La señal es emitida por las gonadotrofinas, FSH y LH, y los receptores están localizados en la eminencia media (MOTTA y cols., 1969), nucleo arcuato y área preóptica-hipotalámica anterior (TERASAWA y SAWYER, 1968).

1.3.2.2.1. Hormona luteinizante(LH).- La implantación de LH en la eminencia media provoca una disminución de LH en hipofisis (DAVID y cols., 1966) y reduce la actividad LH-RF (McCANN y cols., 1968).

1.3.2.2.2. Hormona foliculoestimulante(FSH).- Se distinguen dos tipos de mecanismos de retroalimentación cortos para FSH: uno de tipo negativo, similar al descrito para LH -en ratas hembras adultas-, en las que la implantación de FSH en eminencia media provoca una disminución de FSH y FSH-RF (CORBIN, 1966); y otro de tipo positivo, en ratas prepúberes, en las que la implantación de FSH en el hipotálamo medio-basal produce pubertad precoz (OJEDA y RAMIREZ, 1969).

1.3.2.3. Mecanismos de retroalimentación ultracortos.- La señal son los factores de liberación gonadotrópicos, LH-RF y FSH-RF, y los receptores están situados en el



mismo hipotálamo (MOTTA y cols., 1969).

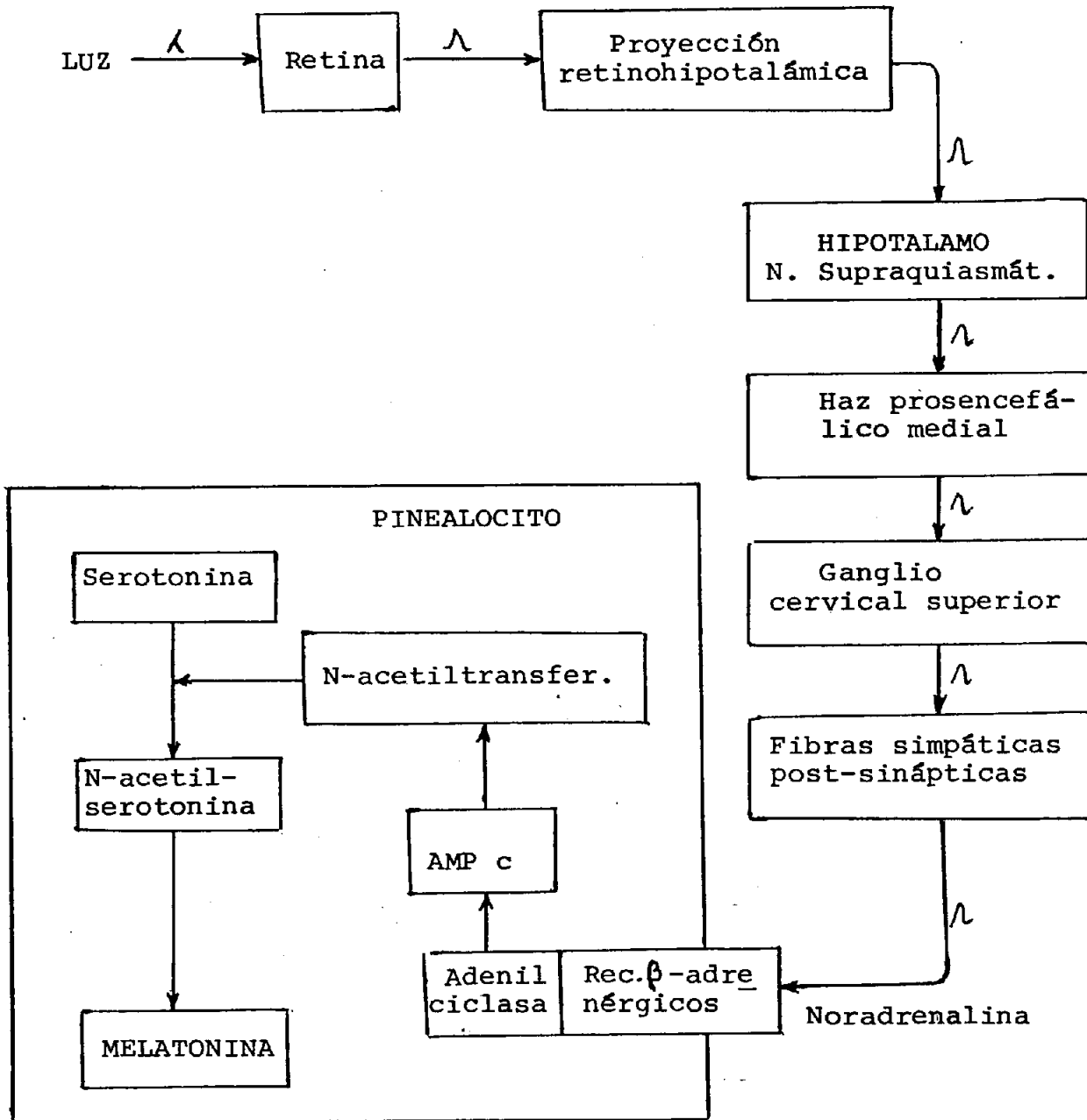
En ratas hembras castradas e hipofisectomizadas, anulados los mecanismos largos y cortos de retroalimentación, la administración parenteral de extracto hipotalámico, disminuye el contenido de FSH-RF en hipotálamo (MOTTA y cols., 1970).

## 2. MECANISMOS DE LA INTERACCION LUZ-RITMOS BIOLÓGICOS

Al describir los distintos ritmos biológicos quedó establecida la importancia de la luz en la periodicidad de dichos ritmos. A continuación vamos a comentar ampliamente, por su relación con el tema de la presente Tesis, las vías y mecanismos mediante los cuales la luz modula los ritmos biológicos en general y el reproductor en particular.

La interacción luz-ritmo reproductor puede realizarse de forma directa, como ocurre en los hidrozooarios (BALLARD, 1942), en los que la luz estimula la maduración de las células germinales directamente, o mas frecuentemente, como ocurre en los animales superiores, de modo indirecto, a través de señales químicas producidas en los órganos neuroendocrinos (WURTMAN, 1967).

El efecto de la luz sobre el hipotálamo y pineal se realiza a través de una serie de estructuras nerviosas (véase esquema 3). El estímulo lumínico genera, en las células ganglio



Esquema 3 .- Relación luz-metabolismo pineal (Tomado de Klein, 1974).

nares de la retina (MASON y cols., 1977), un potencial de acción, que es conducido por fibras directas retinohipotálamicas (MOORE y LENN, 1972) hasta la parte posterior del núcleo supraquiasmático (WENISCH, 1976).

NISHINO y cols., (1976) han demostrado que la actividad eléctrica de las neuronas del núcleo supraquiasmático está modulada por la luz; sin embargo este núcleo actúa independientemente, sis estímulos lumínicos, como un reloj biológico, manteniendo determinados ritmos circadianos, ciclo estral (SETTSON y WATSON-WHITMYRE, 1976), actividad N-acetiltransferasa pineal (MOORE y KLEIN, 1974), etc.

Desde el núcleo supraquiasmático hasta la glándula pineal el potencial de acción es conducido por el haz prosencefálico medial o *forebrain medial bundle* (MOORE y KLEIN, 1974), ganglio cervical superior y fibras post-sinápticas simpáticas que inervan la glándula pineal (KAPPERS, 1960).

El potencial de acción producido por la luz en la retina incrementa la actividad eléctrica de las neuronas del núcleo supraquiasmático (NISHINO y cols., 1976) y a nivel de los terminales post-sinápticos disminuye la liberación de noradrenalina (ROMERO y AXELROD, 1975); la oscuridad por el contrario incrementa la descarga de noradrenalina (REITER, 1976).

La noradrenalina liberada activa los receptores beta-a-

drenérgicos localizados a nivel de la membrana del pinealocito (ROMERO y AXELROD, 1975), activación que facilita la transformación de ATP en AMP cíclico, catalizado por la adenilciclase (KLEIN y cols., 1970).

La sensibilidad de los receptores beta-adrenérgicos a la noradrenalina presenta un ritmo circadiano; durante la noche coincidiendo con niveles altos de noradrenalina (NA) en pineal, subsensibilidad, y durante el día, con niveles bajos de NA, supersensibilidad. Estas modificaciones de la sensibilidad juegan un papel importante en la regulación del ritmo circadiano del metabolismo pineal, tanto endógeno, como tras la modulación por la luz (KLEIN, 1978).

Dentro del pinealocito el AMP cíclico actúa como un segundo mensajero e incrementa la actividad N-acetiltransferasa. Según AXELROD y ZATZ (1977) el AMPc actúa a tres niveles: inducción de su síntesis, aumento de su actividad y disminución de su inactivación.

La luz también modula la actividad hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) en pineal (AXELROD, y cols., 1965) pero aún no se conoce el mecanismo íntimo que produce un incremento de su actividad en oscuridad.

Los ritmos circadianos de actividad N-acetiltransferasa e hidroxindol-O-metiltransferasa en pineal determinan modificaciones circadianas en las concentraciones de indoles pinea-

les, serotonina, melatonina, etc. (ROMERO y AXELROD, 1975), que como comentamos anteriormente modulan la actividad fásica del hipotálamo, en relación con el ciclo reproductivo, síntesis y/o liberación de FSH-RF y LH-RF.

Se conoce poco sobre la síntesis de los polipéptidos de origen pineal que también modulan el ciclo reproductivo, ni se sabe si estos compuestos son sintetizados de manera cíclica (REITER, 1976).

En lo que se refiere a la participación de la pineal en el mantenimiento de los ciclos reproductivos anuales, siguiendo a REITER (1976), en los reproductores de días largos, la pineal es más activa durante los meses de otoño e invierno, coincidiendo con la época de regresión gonadal; en los meses de primavera y verano, época reproductora, la pineal disminuye irregularmente su actividad, aunque lo importante es la refractariedad del hipotálamo a las influencias pineales.

La influencia de la pineal en el mantenimiento de los ritmos circadianos se debe a la respuesta de los pinealocitos a los cambios diarios luz-oscuridad. Durante el día disminuye la actividad de la pineal, esto no solo porque se reduce el número de moléculas de noradrenalina que estimulan los receptores beta-adrenérgicos pineales, sino porque además

estos se hacen refractarios a su estimulación por la oscuridad (BINKLEY y cols., 1974).

La participación de la pineal en el mantenimiento de los ritmos con período crítico está aún en nuestros días en fase de revisión.

ENZIMAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL  
(NEUROPEPTIDASAS Y OXIDORREDUCTASAS) Y  
SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD FUNCIONAL  
DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISIS-GONADAS.

## INTRODUCCION Y OBJETIVOS

En este apartado, utilizando datos bibliográficos, tratamos de demostrar:

- La capacidad que algunas regiones del S.N.C., especialmente hipotálamo, tienen para hidrolizar proteínas y péptidos, por la presencia en estas estructuras de enzimas peptídicas.
- La existencia de oxido-reductasas en el S.N.C. y específicamente en el hipotálamo.
- La correlación existente en el hipotálamo entre la actividad peptidasa y los procesos de degradación de péptidos hormonales relacionados con el eje hipotálamo-hipofisis-gónadas.
- La correlación existente en el hipotálamo entre la actividad oxido-reductasa y los procesos de biosíntesis y/o liberación de péptidos hormonales relacionados con el eje hipotálamo-hipofisis-gónadas.



### PEPTIDASAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Es bien conocida la presencia en el sistema nervioso central de péptidos con actividad hormonal y de enzimas proteolíticas -neuropeptidasas- vinculadas probablemente al metabolismo de estos péptidos.

El significado biológico de estas neuropeptidasas ha sido durante mucho tiempo mal interpretado, debido al arraigo que en el mundo científico ha tenido la hipótesis de su exclusiva participación en los procesos de destrucción celular.

Aunque los avances metodológicos, histoquímicos y bioquímicos, han permitido un mejor conocimiento de las neuropeptidasas, aún no poseemos una idea clara de su papel funcional.

La existencia de enzimas proteolíticas en el cerebro fue demostrada por BLUM y cols. en 1936, al encontrar actividad dipeptidásica en homogenados de cerebros de varias especies animales. ABDELHALDEN y CEASER (1940) demostraron que extractos de cerebro de bovino hidrolizaban algunos dipéptidos y tripéptidos conteniendo leucina; datos confirmados por KIES y SCHWIMMER en 1942 utilizando como sustratos dipéptidos como Leu-Gli, Gli-Leu, Gli-Gli, Gli-Ala y algún tripéptido como Leu-

Gli-Gli. PRICE y cols., (1947) compararon la actividad proteolítica de un gran número de tejidos, encontraron más actividad en el cerebro que en el músculo, pero menos que en el hígado, riñón, pulmón y bazo.

Demostrada la existencia de neuropeptidasas, otros investigadores trataron de conocer la distribución regional de la actividad proteolítica en el cerebro, destacando las aportaciones de ABDERHALDEN y CEASER (1940) que encontraron mayor actividad proteolítica en la sustancia blanca del cerebro y las de ADAMS y SMITH (1951) que demostraron actividad exopeptidásica en extractos de hipofisis.

En general la distribución de la actividad proteolítica depende del tipo de neuropeptidasa, así, las ácidas se encuentran preferentemente en la sustancia gris, mientras que las neutras se localizan especialmente en la sustancia blanca (ANSELL y RICHTER, 1954b). Las exopeptidasas, amino, carboxi y dipeptidasas, se encuentran equitativamente tanto en la sustancia blanca como en la gris (BLUM y cols., 1936).

La localización subcelular de estas enzimas la estudiaron diferentes autores. HANSON y TENDIS en 1954, encontraron baja actividad proteolítica en la fracción microsomal del tejido cerebral, y POPE y ANFISEN (1948), con procedimientos histoquímicos, describieron actividad proteolítica en las mitochondrias. PALLADIN (1961) y PALLADIN y cols. (1963) descri-

bieron con centrifugación en gradiente de sacarosa, actividad proteolítica en la fracción mitocondrial del cerebro, WAELSCH y LAJTHA (1961) identificaron en la fracción mitocondrial neuropeptidasas ácidas y neutras.

Las investigaciones realizadas entre 1963 y 1971 (LAJTHA, 1964; MARKS y LAJTHA, 1965 y 1971) demostraron la existencia de actividad proteolítica en todas las estructuras subcelulares del sistema nervioso central.

Trataremos de describir la distribución regional en el sistema nervioso central y su localización subcelular de todas y cada una de las enzimas que comentaremos a continuación.

Los intentos de clasificar las enzimas proteolíticas cerebrales se iniciaron con los trabajos de ANSELL y RICHTER (1954a; 1954b). Estos autores trataron de agrupar las neuropeptidasas según su pH óptimo y las dividieron en dos grandes grupos: ácidas y neutras.

En 1962 UZMAN y cols., en razón de su especificidad y requerimientos metálicos trataron de ordenar las neuropeptidasas, sin embargo ha sido la clasificación basada en su acción catalítica la más aceptada y la que describiremos a continuación.

Se han identificado en el cerebro dos grandes familias de enzimas proteolíticas; las endopeptidasas y las exopep-

tidasas, según hidrolicen enlaces peptídicos del interior o del exterior de la molécula protéica o peptídica.

## 1. ENDOPEPTIDASAS

### 1.1. ACIDAS

Descritas por KIES y SCHWIMMER en 1942, están caracterizadas por su capacidad para hidrolizar, en medio ácido, sustratos como hemoglobina y caseína. Dentro de este gran grupo se distinguen.

1.1.1. Catepsina D.- Enzima caracterizada por su capacidad para hidrolizar sustratos protéicos previamente desnaturalizados y no actuar sobre dipéptidos y tripéptidos de síntesis (FRUTON, 1960).

Enzima termoestable con un pH óptimo de 3,2, en su centro activo no posee grupos sulfhidrilos ni grupo OH de serina -no se inhibe en presencia de inhibidores de tripsina como el di-isopropilfluorofosfato (DIFP)-, necesita cofactores e iones metálicos para desarrollar su máxima actividad. MARKS y LAJTHA (1965 - 1971), han descrito varias isoenzimas.

La distribución regional de esta enzima varía de unas especies a otras; así, en el carnero, la máxima actividad se localiza en corteza y cerebelo (LAJTHA, 1961), mientras que en el hombre (BRECHER, 1963) la actividad se encuentra en or

den decreciente, en sustancia blanca cerebral, sustancia gris, cerebelo, mesencéfalo, protuberancia, tálamo, médula y cuerpo calloso.

La distribución subcelular de esta enzima es, siguiendo a PALLADIN (1961) como sigue: el 82% de la actividad catepsina D del cerebro de conejo se encuentra en la fracción mitocondrial, el 10% en la microsomal soluble y el 3% en la fracción nuclear.

1.1.2. Catepsina A.- Está caracterizada por su capacidad para hidrolizar los mismos sustratos que pepsina y carboxipeptidasa A (FRUTON, 1960), sustratos sintéticos y no actuar sobre la hemoglobina.

Su actividad enzimática es inhibida por la presencia de DIFP. Se han encontrado indicios de actividad catepsina A en el cerebro (MARKS y LAJTHA, 1965). MATSUNGA y cols. (1968) han encontrado en algunos tejidos, entre ellos el cerebro, una actividad catepsina A que relacionan con el metabolismo de la angiotensina.

1.1.3. Catepsinas B y B' .- Enzimas caracterizadas por su capacidad para hidrolizar sustratos sintéticos (benzoil-arginina-B-naftil-amida y benzoil-arginina-anilida), los mismos sustratos que la tripsina y sustratos parecidos estructuralmente a la cadena B de la insulina. Por hidrolizar los

mismos sustratos que la tripsina también se les conoce con el nombre de *trypsin like cathepsins*, aunque su pH óptimo es ácido (5,6). Se han descrito grupos sulfhidrilos en su centro activo y su actividad catalítica es inhibida por los metales pesados pero no por los inhibidores de tripsina, como el DIFP (KEILOVA y KEIL, 1969).

Su distribución en el cerebro es mal conocida dada la baja actividad encontrada en este órgano. Solamente representa el 5% de la encontrada en el bazo (MARKS y LAJTHA, 1965).

1.1.4. Catepsina C.- Enzima caracterizada por su capacidad para hidrolizar dipeptidil-amidas o ésteres, a pH 5 y hemoglobina desnaturalizada a pH 3,5. Puede polimerizar algunas peptidil-amidas, a pH neutro, por transpeptidación, por lo que también recibe el nombre de dipeptidil-transferasas (METRIONE y cols., 1966). La enzima presente en el tejido nervioso -preparados crudos de cerebro- puede hidrolizar sustratos como seril-beta-naftilamida y Gli-Fen-NH<sub>2</sub> (FRUTON, 1960).

La actividad catepsina C del cerebro solo representa el 5% de la presente en el bazo (MARKS y LAJTHA, 1965), por lo que se conoce mal su distribución regional y subcelular.

Por liberar dipéptidos terminales, esta enzima partici-

pa en la degradación de moléculas protéicas de gran interés biológico como son insulina (cadena B ), ACTH, STH y angiotensina II (GABRIELESCU, 1975).

### 1.2. NEUTRAS

Se incluyen en este grupo todas las enzimas capaces de hidrolizar sustratos protéicos a pH neutro o ligeramente alcalino, localizadas en el sistema nervioso central.

Las enzimas aisladas del cerebro parcialmente purificadas (MARKS y LAJTHA, 1965), son capaces de hidrolizar hemoglobina, caseina y alfa-globulina. Los extractos crudos del cerebro pueden hidrolizar sustratos sintéticos como benzoil-arginina metilester y tosylarginina metilester (OJA y OJA , 1970).

ANSELL y RICHTER en 1954 encontraron, en extractos acuosos de cerebros de distintas especies animales, mas actividad proteolítica en la sustancia blanca que en la gris , a pH neutro.

Las neuropeptidasas neutras son enzimas lábiles (RIEKKINEN y CLAUSEN, 1969), pues incubadas en anaerobiosos desaparece su actividad a los 90 minutos. Su capacidad catalítica no la modifican ni el  $\text{CN}^-$  , ni el  $\text{Fe}^{++}$  , ni el ácido ascórbico, pero se inhibe en presencia de  $\text{Cu}^{++}$  y iodoacetamida. Estas enzimas poseen grupos SH en sus centros activos

como lo demuestra el incremento en la actividad neuropeptidasa en la fracción soluble del cerebro de rata, al añadir  $\text{Ca}^{++}$ , cisteína, mercaptoetanol y glutathion (GUROFF, 1964) y carecen de resto de serina, pues el DIFP no modifica su actividad.

La distribución regional, estudiada por LAJTHA (1961), en cerebros de mono, se caracteriza por encontrarse mayor actividad en la médula, corteza, cerebelo y sustancia blanca y menor en protuberancia, hipotálamo y núcleo lenticular.

En cuanto a su localización subcelular, BELIK y cols. (1968), encontraron un 50% de la actividad neuropeptidasa neutra en la fracción mitocondrial y sinaptosomal, un 24% en la fracción nuclear y un 14% en el sobrenadante microsomal.

El papel biológico asignado a estas enzimas ha sido muy variado, se han considerado desde su participación en el metabolismo de los neuropéptidos y proteínas, hasta su papel en la liberación de las histonas en las nucleoproteínas, pasando por su posible intervención en la transmisión sináptica (MARKS y LAJTHA 1971).

## 2. EXOPEPTIDASAS

### 2.1. AMINOPEPTIDASAS



Enzimas caracterizadas por su capacidad para hidrolizar específicamente el enlace peptídico del aminoácido N-terminal. Dependiendo del aminoácido terminal que liberan se distinguen en este grupo:

2.1.1. Leucina aminopeptidasa.- Hidrolizan el enlace peptídico terminal de péptidos Leu-NH<sub>2</sub>.

ABDERHALDEN y CEASER en 1940 comprobaron actividad aminopeptidasa en extracto de cerebro, resultados confirmados por KIES y SCHWIMMER en 1942 y UZMAN en 1961.

La enzima cerebral es activada por Mn<sup>++</sup> y en menor proporción por Mg<sup>++</sup> y Co<sup>++</sup>. Su alta especificidad para el sustrato Le-NH<sub>2</sub> y su activación por Mn<sup>++</sup> la diferencian de otras aminopeptidasas ( MARKS y cols. 1968a).

Se localizan preferentemente en la fracción microsomal y mitocondrial (BRECHER, 1963).

2.1.2. Aminotripeptidasa.- Enzima caracterizada por su capacidad para hidrolizar los enlaces peptídicos terminales de tripéptidos formados por aminoácidos neutros, como Leu-Gli-Gli y Ala-Gli-Gli ( MARKS y cols. 1968b), aunque no hidrolizan la Gli-Gli-Gli (DATTA y cols., 1967). La enzima cerebral es inhibida por el Ca<sup>++</sup> y los anestésicos (ELLIS y FRUTON, 1951).

DATTA ha encontrado el 10% de la actividad aminotripeptidásica del cerebro en la fracción mitocondrial y el 55% en el sobrenadante, con indicios en la fracción sinaptosomal.

## 2.2. CARBOXIPEPTIDASAS

Enzimas caracterizadas por su capacidad para hidrolizar específicamente el enlace péptido del aminoácido C-terminal. Dependiendo de que este aminoácido C-terminal que liberan sea neutro o básico se distinguen en este grupo dos subgrupos, las carboxipeptidasas A y B.

Las carboxipeptidasas son metaloenzimas que necesitan  $Zn^{++}$  para desarrollar su actividad catalítica.

2.2.1. Carboxipeptidasa A.- Liberan aminoácidos neutros de las proteínas o péptidos que lo poseen en posición C-terminal, especialmente si son fenilalanina, tirosina y triptofano, aunque no lo liberan si se trata de prolina o hidroxiprolina.

En los extractos de cerebro MARKS y cols. (1968a) han demostrado actividad carboxipeptidasa A con sustratos como R-Gli-Fen, y sustratos con el grupo N-terminal sustituido con grupos acilos o ester, por lo que se cree que pueden intervenir en la hidrólisis de los acil-péptidos cerebrales (GRABIE-

LESCU, 1975).

2.2.2. Carboxipeptidasa B.- Liberan aminoácidos básicos de las proteínas o péptidos que lo poseen en posición C-terminal.

Es posiblemente la enzima responsable de la inactivación de la bradiquinina por los extractos de cerebro de conejo, cerdo y paloma (KRIVOVY y KROEGER, 1964), estimándose que participa en la inactivación de todas las quininas que llegan al cerebro.

### 2.3. DIPEPTIDASAS

Enzimas caracterizadas por su capacidad para hidrolizar dipéptidos. BLUM en 1936 y ABDERHALDEN y CEASER en 1940, demostraron actividad dipeptidásica en extractos de cerebro, resultados confirmados posteriormente por KIES y SCHWIMMER en 1942 y por PRICE y cols. en 1947.

Según el tipo de dipéptido que hidrolizan se distinguen en este grupo:

2.3.1. Dipeptidasa Gli-Glicina.- UZMAN y cols. en 1962, encontraron actividad diglicinasa en extractos de cerebro, y esta actividad se incrementaba en presencia de iones de  $\text{Co}^{++}$ .

En 1968 MARKS y cols. (1968a) encontraron una gran acti-

vidad dipeptidasa en los núcleos, sinaptosomas y mitocondrias de las neuronas.

Dado que la glicina puede ser considerada como un posible transmisor sináptico inhibitorio, GRAHAN y cols. en 1967, emitieron la hipótesis de la posible participación de las enzimas dipeptidasas glicil-glicina en la transmisión sináptica interneuronal.

2.3.2. Imidopeptidasas.- Hidrolizan específicamente dipéptidos que contienen prolina como Pro-Gli y Gli-Pro.

HANSON y TENDIS en 1954 y UZMAN y cols. en 1962 describieron actividad imidopeptidasa en el cerebro y BRECHER (1963) encontró la máxima actividad en el sobrenadante del fraccionamiento subcelular por ultracentrifugación.

## 2.4. ARILAMIDASAS

Enzimas caracterizadas por su capacidad para hidrolizar específicamente arilamidas -compuestos que tienen grupos  $\text{CH}_2$  uniendo al aminoácido C-terminal del péptido, núcleos aromáticos-. Siguiendo el mismo criterio que con las carboxipeptidasas se distinguen es este grupo:

2.4.1. Arilamidasa B (básica).- Enzima caracterizada por su capacidad para hidrolizar específicamente ari

lamidas que contengan aminoácidos básicos del tipo de arginina y lisina (HOPSU-HAVU y cols. 1966).

NACHLAR y cols. encontraron, en 1962, actividad arilamidasa B en homogenados de cerebro, usando como sustrato arginina-beta-naftilamida.

La enzima cerebral ha sido purificada (MARKS y cols. 1968b). La presencia de iones metálicos, cisteína y betamer-captoetanol incrementan la velocidad de catalisis, inhibiendola la puromicina (MARKS y cols. 1968b).

Su distribución subcelular es como sigue (MARKS y cols., 1968b): el 40% se encuentra en el sobrenadante del fraccionamiento subcelular, el 10% en la fracción microsomal y un 4% en la nuclear.

2.4.2. Arilamidasa A (ácida).-Enzima caracterizada por su capacidad para hidrolizar sustratos que contienen aminoácidos ácidos, del tipo de alfa-glutamil y alfa-aspartil-beta-naftilamida. MARKS y cols. (1968b) describieron actividad arilamidasa ácida en homogenados de cerebro y específicamente en la fracción mitocondrial, incrementándose la velocidad de catálisis por la presencia de  $Ca^{++}$ .

2.4.2. Arilamidasa N (neutra).- Enzima caracterizada por su capacidad para hidrolizar específicamente sustratos como leucina-beta-naftilamida.

En 1962 ADAMS y GLENNER encontraron actividad arilamidasa N en el cuerpo calloso y en la sustancia gris frontal del cerebro de rata, y en el mismo año ARVY demuestra la misma actividad enzimática en los núcleos hipotalámicos.

La mayor actividad se localiza en el sobrenadante seguido, en orden decreciente, de la fracción microsomal, mitocondrial y nuclear.

GABRIELESCU en 1975 afirmó que estas enzimas participan en la liberación y/o catabolismo de las hormonas hipotalámicas, pues en circunstancias fisiológicas en las que existe un aumento en la liberación de hormonas -durante la lactancia- (ADAMS, 1965) aumenta paralelamente la actividad arilamidasa N en el cerebro (ARAI y KUSAMA, 1965).

## OXIDO-REDUCTASAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Las enzimas mas directamente implicadas en los procesos catabólicos exergónicos son las oxidorreductasas, y de entre estas, las del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Este cumple en la célula una doble función: por un lado, aporta coenzimas reducidos al sistema de transporte electrónico para mediante su oxidación sintetizar ATP, y por otro lado, suministra sustratos para la síntesis de compuestos necesarios para el mantenimiento de la actividad funcional de las células.

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos participa en los procesos anabólicos y catabólicos celulares, y en ambos procesos intervienen las enzimas oxido-reductasas. Dedicaremos este apartado al estudio de algunas oxido-reductasas del ciclo de Krebs en las células del sistema nervioso central.

### 1. SUCCINATO DESHIDROGENASA (SDH)

Oxida el succinato transformandolo en fumarato, utiliza como coenzima el FAD. Estudios cinéticos en el cerebro han demostrado la inhibición competitiva de esta enzima por el malonato.

Está ampliamente distribuida en todo el sistema nervioso central de las ratas adultas, siendo baja su actividad en la sustancia blanca, ausente en el núcleo y su máxima actividad se encuentra en la sustancia gris, especialmente en las células de Purkinje (McILWAIN y BACHELARD, 1971).

## 2. MALATO DESHIDROGENASA (MDH).

Oxida el malato transformándolo en oxaloacetato. La enzima mitocondrial utiliza como coenzima indistintamente el NAD o el NADP.

Su actividad catalítica se activa por cianuro y pirofosfato y se inhibe por tiroxina, paracloromercuribenzoato y parcialmente por Ag (CHABAS, 1969).

## 3. ISOCITRATO DESHIDROGENASA (ICDH).

El isocitrato ocupa una posición central en el metabolismo intermediario, y es el sustrato inicial de una variedad de rutas de síntesis y productoras de energía.

Ha sido demostrada la presencia en el cerebro de dos tipos de isocitrato deshidrogenasa (ICDH), que difieren en el coenzima que requieren y en su localización subcelular (COHEN, 1971). La ICDH-NAD dependiente, exclusivamente mitocondrial, activada específicamente por ADP y aproximadamente 4 veces más activa que la ICDH-NADP dependiente, enzima que se



encuentra en mitocondrias y fracción soluble.

Ambas ICDH requieren  $Mn^{++}$  o  $Mg^{++}$  y 0,8 mM de isocitrato para desarrollar su máxima actividad catalítica. Son inhibidas por fosfato, pirofosfato, paracloromercuribenzoato y por iodoacetato (CHABAS, 1969).

En mitocondrias de corteza cerebral de rata la actividad ICDH-NAD dependiente ha sido estimada en 240 micromoles/g/hora a 25°C. En cerebro total la actividad es alrededor de 340 micromoles/g/hora a 25°C. (McILWAIN y BACHELARD, 1971). En el cerebro, la ICDH-NADP dependiente muestra su máxima actividad en el citoplasma y es extremadamente activa durante el período de crecimiento (LOVERDE y LEHRER, 1973).

PEPTIDASAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y SU  
RELACION CON EL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-GONADA

La vida media de los polipéptidos hormonales hipotalámicos depende en parte de la intensidad de los procesos bioquímicos encargados de su degradación. Hipotálamo y otras regiones del cerebro, poseen enzimas capaces de hidrolizar enlaces peptídicos -muchas de las cuales han sido analizadas con anterioridad-, que pueden participar en el catabolismo de los polipéptidos hipotalámicos con función hormonal, e intervenir en consecuencia en la regulación de la actividad hormonal hipotálamo-hipófisis-glándula periférica.

De todas las neuropeptidasas, las más relacionadas con la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas son las amino y carboxipeptidasas, según demuestran las aportaciones experimentales que a continuación comentamos, por el interés que ofrecen para la comprensión de la hipótesis de trabajo de la presente Tesis.

Los primeros trabajos que demostraron la existencia de peptidasas inactivadoras de péptidos hipotalámicos, fueron realizados por HOOPER (1962) al comprobar que incubando ho -

mogenados de hipotálamo de perros con péptidos biológicamente activos como bradiquinina, occitocina, sustancia P y vasopresina, estos eran degradados, constanding además, que la occitocina y vasopresina eran hidrolizadas por la misma enzima.

Un año después, HOOPER (1963) estudió en perros la distribución de estas enzimas en seis regiones distintas del cerebro y en raíces y ganglios espinales, comprobando que las regiones cerebrales constituidas fundamentalmente por sustancia blanca, son menos ricas en enzimas inactivadoras de bradiquinina y vasopresina que las regiones nucleares o de sustancia gris. A nivel de raíces y ganglios espinales, la actividad peptidasa para occitocina y vasopresina era nula, no así para sustancia P y especialmente para bradiquinina.

A la vista de estos resultados HOOPER y su grupo, durante la década de 1960-1970 estudiaron la relación existente entre la actividad amino y carboxipeptidasa en hipotálamo y la concentración de polipéptidos hipofisotropos de origen hipotalámico. Para ello valoró la actividad peptidasa en hipotálamos de animales sometidos a diversas circunstancias experimentales, en las que existen pronunciados aumentos o disminuciones en la concentración de factores de liberación hipotalámicos.

Del conjunto de experiencias que seguidamente detalla-

mos se infiere, que existe un buen índice de correlación entre cambios en la concentración de factores de liberación hipotalámicos y modificaciones en la actividad de algunas aminopeptidasas en el hipotálamo.

La valoración de la actividad leucinaminopeptidasa en el área hipotalámica puede servirnos como parámetro indicativo de la dinámica de los factores de liberación hipotalámicos, especialmente los de la esfera gonadal.

HOOPER en 1966 (1966a) encontró que en los primeros estadios de la gestación en el conejo, existe en el hipotálamo un aumento de la actividad peptidasa que coincide con la fase de implantación y formación del blastocito. En otra publicación aparecida el el mismo año, HOOPER (1966b), estudia la relación entre actividad peptidasa y lactancia, comprobando que los valores de máxima actividad coinciden con los tres primeros días del postpartum, siendo estos tres veces superiores a los observados durante la gestación, y reduciéndose entre el 4° y 5° día a los niveles previos de gestación. Si los animales son separados rápidamente de sus crías la actividad enzimática no sufre elevación típica del postpartum y al sexto día presentan el mismo grado de actividad que las no gestantes.

FIRTH y HOOPER (1971) estudiaron en la coneja el efecto del coito, que en estos animales provoca la ovulación, sobre

la actividad de las enzimas hipotalámicas inactivadoras de occitocina. Para ello determinaron la capacidad inactivadora de occitocina de hipotálamo obtenida a distintos tiempos después del apareamiento. Entre las 0 y 5 horas después del coito, encontraron una disminución de la actividad enzimática en el sobrenadante y fracción particulada, pero mas manifiesta en esta última. Estos resultados sugieren una relación entre actividad peptidásica hipotalámica y liberación de LH-RF.

También se ha estudiado en la rata hembra, animal que ovula espontaneamente, las modificaciones de la actividad peptidasa hipotalámica durante las distintas fases del ciclo estral, encontrándose una marcada disminución en la tarde del protestro (GRIFFITHS y HOOPER, 1973c).

HOOPER (1966c) estudió el efecto de los esteroides gonadales, sobre la actividad peptidasa del hipotálamo, encontrando un incremento, especialmente en la fracción sobrenadante, tras la administración sistemática de benzoato de estradiol. Mas tarde GRIFFITHS y HOOPER (1974a) observaron que la administración de estradiol en la rata hembra, y testosterona en la rata macho, incrementa la actividad peptidasa fundamentalmente en la fracción sobrenadante de las áreas hipotalámicas anterior y media, áreas intimamente relacionadas con la liberación de LH-RF.

El efecto de la castración sobre la actividad peptidasa hipotalámica ha sido también estudiada por HOOPER (1968), comprobando que la castración disminuye la actividad en la fracción sobrenadante, pero no en la particulada; esta disminución perdura incluso 8 meses después de la castración. GRIFFITHS y HOOPER (1974a) han encontrado una disminución mas acentuada en las áreas hipotalámicas anterior y media.

La fracción sobrenadante de hipotálamos de animales castrados , recupera el nivel de actividad peptidasa, disminuido tras la castración, por el tratamiento con monobenzoato de estradiol (HOOPER, 1966c).

El efecto que los inhibidores de la ovulación, administrados por diversas vías y a distintos tiempos, tienen sobre la actividad peptidasa del hipotálamo, ha sido estudiado por FIRTH y HOOPER (1968). Estos autores encontraron que la inyección de etinilestradiol, via intramuscular, a dosis de 0,5 ug, durante 3 días, produce un aumento de la actividad enzimática. Este incremento fué menor a las 7 horas después de la administración de una sola dosis, aumentando a las 18 horas, pero sin alcanzar el nivel de actividad que presentaban los hipotálamos después de 3 días consecutivos de tratamiento.

El distinto comportamiento del hipotálamo según el sexo del animal, ante situaciones experimentales diferentes, tam-

bién ha sido comprobado por estos autores. GRIFFITHS y HOOPER (1973a) encontraron, que tras la administración de testosterona, solo en las ratas machos se recupera la actividad peptidasa, previamente disminuida por la castración. Estos mismos autores GRIFFITHS y HOOPER (1973b) demostraron diferencias en la actividad peptidasa hipotalámica, entre ratas machos y hembras, tras la administración de monobenzoato de estradiol, durante el período crítico de diferenciación hipotalámica ( a los 3 días después del nacimiento ); los hipotálamos de ratas machos presentan un incremento de actividad peptidasa, y disminución los de ratas hembras.

Utilizando como sustrato LH-RF GRIFFITHS y HOOPER(1974 b) han demostrado la presencia en hipotálamo de peptidasas que lo inactivas, y una actividad mas elevada en la fracción de las partículas. También esta actividad peptidasa muestra una diferencia sexual, con una actividad en el sobrenadante considerablemente mayor en la rata macho que en la hembra ( GRIFFITHS y cols., 1975a).

Simultaneamente a estos trabajos, la escuela alemana dirigida por TAUBERT se ha ocupado del mismo problema, utilizando la rata como animal experimental y la L-cistein-beta-naftilamida como sustrato. Sus resultados han sido muy similares a los obtenidos por HOOPER y colaboradores.

TAUBERT y cols. (1970) demostraron que la castración de

ratas hembras y prepúberes, produce una disminución de la actividad peptidasa del hipotálamo y aumento de la sensibilidad de este a los esteroides gonadales.

Las variaciones de la actividad peptidasa de hipotálamo en las distintas fases del ciclo : proestro, estro, metaestro y diestro, han sido estudiadas por TAUBERT y cols. (1970) y HEIL y cols. (1971), describiendo un pico de máxima actividad durante las fases de metaestro y diestro.

En 1972 BICKEL y cols. han valorado la actividad L-cisteína-aminopeptidasa (CAPA) en hipotálamo y paleopallium de rata. Investigando el efecto que la administración de etinil estradiol, testosterona y progesterona tiene sobre la actividad CAPA en hipotálamo y paleopallium comprobaron:

1. El etinilestradiol, en ratas inmaduras incrementa la actividad CAPA en las dos regiones estudiadas, a cualquier dosis de las administradas (de 3 a 20  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ); las dosis más efectivas fueron para hipotálamo 5  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , y para paleopallium 7  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , que incrementaron la actividad CAPA en un 55%. No se observaron diferencias de respuesta entre ratas machos y hembras.

2. La dosis de testosterona más eficaz para incrementar la actividad CAPA en hipotálamo y paleopallium fué de 250  $\mu\text{g}/\text{animal}$  en la rata macho inmadura. En la rata hembra



inmadura la testosterona, a las dosis utilizadas ( de 50 a 1000  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ), no produjo modificaciones.

3. La actividad CAPA en ratas inmaduras no varió tras la administración de progesterona a dosis comprendidas entre 2 y 32  $\text{mg}/\text{animal}$ . Solo en ratas hembras adultas castradas se comprobó aumento de la actividad CAPA en hipotálamo, tras la administración de progesterona a dosis de 5  $\text{mg}/\text{animal}$ .

La diferencia de respuesta hipotálmica a los distintos esteroides gonadales, según el sexo del animal, ha sido comprobado por KUHL y cols. (1974), estudiando la actividad arilamidasa del hipotálamo con varios sustratos, entre ellos L-jeucina-p-nitroanilida (Leu-NA), Ala-NA, Tir-NA, etc. La administración de esteroides gonadales, etinilestradiol (dosis de 7  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ) y progesterona ( 5  $\text{mg}/\text{animal}$ ) en ratas hembras adultas, y etinilestradiol ( 7  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ) y testosterona (250  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ) en ratas machos adultas, incrementan en homogenado de hipotálamo la actividad arilamidasa, medida a las 16 horas, con todos los sustratos utilizados en las ratas machos; y solo en presencia de algunos sustratos en las ratas hembras.

En hipotálamo, corteza e hipofisis MARKS y cols. (1974) han estudiado la actividad peptidasa, utilizando sustratos di- y tripéptidos, Leu-Gli-Gli y Leu-Gli, encontrando una actividad mas alta en hipotálamo.

En 1974 MONTILLA y cols. estudiaron el efecto de la lesión del complejo amigdalino sobre la actividad L-leucina-minopeptidasa (LAP) del hipotálamo, en ratas machos castrados, encontrando que la destrucción del complejo amigdalino restaura a los valores normales la actividad LAP de hipotálamo, disminuidos por la castración.

También se ha estudiado el efecto de la administración de monobenzoato de deestradiol (BE) y propionato de testosterona sobre la actividad LAP, en ratas hembras castradas, en hipotálamo, amígdala cerebral y corteza cerebral (BELLIDO, 1975). La administración de BE y PT recupera la actividad LAP en hipotálamo. En amígdala no se aprecian cambios significativos de la actividad LAP en ninguna de las situaciones experimentales exploradas. En corteza cerebral, la castración disminuye la actividad LAP, descenso que no desaparece tras la administración de los esteroides gonadales.

OXIDORREDUCTASAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y SU  
RELACION CON EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GÓNADAS

Las células neurosecretoras hipotalámicas necesitan acoplplar a la síntesis de factores de liberación hipofisotropos, proceso bioquímico endoenergónico, mecanismos bioquímicos exoenergónicos, como la oxidación de sustratos energéticos.

En este sentido, las variaciones en la intensidad de la síntesis de péptidos hipotalámicos puede acompañarse de modificaciones en la cuantía del metabolismo oxidativo. *Existe un buen índice de correlación entre ambos parámetros, como se infiere del conjunto de experiencias que detallamos a continuación.*

El departamento de neuroendocrinología de Buenos Aires, dirigido por MOGUILVSKY, está estudiando los cambios en el metabolismo oxidativo hipotalámico que ocurren en situaciones, provocadas experimentalmente, en las que existen variaciones cuantitativas en los niveles de los factores de liberación.



Midiendo el consumo de oxígeno con técnicas manométricas y valorando la actividad de ciertas enzimas, estrechamente ligadas al metabolismo oxidativo, con procedimientos espectrofotométricos, han descrito los cambios en el metabolismo oxidativo que ocurren en diversas áreas del hipotálamo -anterior, media y posterior-, y en diferentes regiones cerebrales de animales en distintas fases del ciclo estral, y sometidos a diversas condiciones experimentales, como castración, administración de esteroides gonadales y de hormonas gonadotróficas, etc.

En el hipotálamo de rata en fase de estro se ha demostrado un aumento significativo del consumo de oxígeno en relación con el hipotálamo de ratas en otros estadios del ciclo (MOGUILVSKY, 1965).

A los 60 o 90 días de la castración, el hipotálamo -región anterior y posterior- de ratas machos y hembras, muestra una disminución del consumo de oxígeno (MOGUILVSKY y cols., 1966; SCHIAFFINI y MOGUILVSKY, 1968) comparado con los controles. Estas diferencias desaparecen si al 14º día después de la castración se les administra a los animales testosterona (MOGUILVSKY, 1971).

La administración *in vivo* de esteroides gonadales, modifica el consumo de oxígeno por el hipotálamo (GORDAN y cols. 1951).

Hipotálamos de rata en fase de estro incubados *in vitro*, aumentan el consumo de oxígeno cuando se les añade estrógeno al medio de incubación, pero estos no lo modifican si el hipotálamo procede de ratas en fase de diestro (MOGUILEVSKY y MALINOW, 1964), lo que sugiere que los estrógenos *in vitro* no tienen ningún efecto (GORSKI y CLEMENS, 1971).

La testosterona, añadida al medio de incubación *in vitro* restablece la disminución producida por la castración en el metabolismo oxidativo del hipotálamo.

A nivel hipotalámico, los cambios en el consumo de oxígeno descritos pueden interpretarse como debidos a modificaciones en los niveles de gonadotrofinas. Esto explicaría la falta de efecto de los estrógenos y testosterona *in vitro* sobre el consumo de oxígeno por el hipotálamo, y las modificaciones encontradas en la fase de estro del ciclo y en la castración; circunstancia biológica esta última, en la que existe un aumento en la producción de factores liberadores por el hipotálamo (FSH-RF y LH-RF) y de hormonas gonadotropas hipofisarias (FSH y LH) (MARTINI y cols., 1968a).

Por otro lado el efecto de la administración de testosterona *in vitro* a los 14 días después de la castración, puede interpretarse como debido, no a la acción directa de esta hormona, sino a la acción frenadora que sobre los factores liberadores hipotalámicos tienen las hormonas hipofisarias

FSH y LH, que aumentan su concentración el día 14° del ciclo.

Hipófisis y corteza cerebral de ratas machos y hembras castradas, presentan un aumento significativo del consumo de oxígeno en relación con los controles (MOGUILEVSKY y cols., 1966; SCHIAFFINI y cols., 1968; SCHIAFFINI y MARIN, 1971). La administración *in vivo* de testosterona a los 14 días de la castración, hace desaparecer estas diferencias (MOGUILEVSKY, 1971). La adicción de testosterona *in vitro* hace desaparecer el incremento de consumo de oxígeno que presentan los hipotálamos de ratas gonadectomizadas.

A nivel de hipófisis y corteza cerebral, los cambios en el consumo de oxígeno descritos, pueden interpretarse como debidos a modificaciones en los niveles de esteroides gonadales. Esto explicaría las modificaciones del mencionado consumo producidas por la administración de testosterona tanto *in vivo* como *in vitro*.

La escuela de MOGUILEVSKY y colaboradores, han explorado también las modificaciones producidas por la castración y administración de testosterona en la actividad de lagunas enzimas hipotalámicas, como succinato deshidrogenasa y citocromo oxidasa, utilizando como sustratos, succinato, glutamato, piruvato y citrato.

En el hipotálamo anterior y posterior de la rata castrada han comprobado una disminución significativa de la oxida-

ción del succinato (SCHIAFFINI y cols., 1968), del consumo de oxígeno con citrato como sustrato, y de la actividad de la citocromo oxidasa. El tratamiento con testosterona normaliza tanto la captación de oxígeno en presencia de citrato, como la actividad de la citocromo oxidasa (MOGUILVSKY, 1971).

La gonadectomía no modifica la capacidad del hipotálamo para oxidar glutamato y piruvato.

## MATERIAL Y METODOS



## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. ANIMALES

Hemos realizado nuestros experimentos con ratas Wistar hembras adultas, de 4 meses de edad, peso medio 200-250 g , mantenidas a temperatura de 23°C, alimentación integrada ( Piensos Maven) y agua "ad libitum". Los animales fueron seleccionados, después de estudiar durante 14 días consecutivos el ciclo vaginal, por su normalidad en el ciclo estral.

Un total de 120 animales se dividieron en 4 grupos: A) Controles (C); B) Tratados con valerianato de estradiol (+VE); C) Castrados (Gx) y D) Castrados y tratados con valerianato de estradiol (Gx+VE). Cada grupo se subdividió en 3 subgrupos para someterlos a ritmos distintos de iluminación: 1) Ritmo de iluminación normal, 14 horas luz/10 horas oscuridad (IN); 2) Oscuridad permanente, 0 horas luz/24 horas oscuridad (OP) y 3) Luz permanente, 24 horas luz/0 horas oscuridad (LP), quedando diseñado de la siguiente forma el conjunto de experimentos:

#### I.- Animal control (C)

14 horas luz/10 horas oscuridad

Oscuridad permanente

Luz permanente

## II.- Tratado con valerianato de estradiol (+VE)

14 horas luz/10 horas oscuridad

Oscuridad permanente

Luz permanente

## III.- Castrados (Gx)

14 horas luz/10 horas oscuridad

Oscuridad permanente

Luz permanente

## IV.- Castrados y tratados con valerianato de estradiol

(Gx + VE)

14 horas luz/10 horas oscuridad

Oscuridad permanente

Luz permanente

## 2. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

2.1.OVARIECTOMIA.- Previa anestesia con eter se realizó la gonadectomia siguiendo basicamente la técnica descrita por POUMEAU-DELILLE (1953), aunque con algunas modificaciones introducidas por nosotros. La rata se coloca en decubito lateral, se realiza una incisión de 2cm de longitud a la altura del reborde costal, aproximadamente a 3cm de la cresta ilíaca. Descubierta el plano muscular se practica una pequeña incisión. Se introduce la punta de unas pinzas a través del ori

ficio y se tracciona la grasa periovárica con lo que se exterioriza el ovario. Para evitar posibles lesiones de la arteria uterina se liga, en el primer tercio de la trompa, antes de seccionar el pedículo. A continuación se disecciona el ovario.

2.2.ADMINISTRACION DE VALERIANATO DE ESTRADIOL.- Por via subcutaneal se administraron 3 inyecciones, una por semana , a la dosis de 2 mg por animal de valerianato de estradiol en solución oleosa (Progynon depot. Schering. Ge.Co.).

2.3.CONDICIONAMIENTO A LA LUZ.- Para conseguir los ritmos de iluminación antes señalados, construimos una caja de madera, cuyas características describimos: se trata de un paralelepípedo de 2,20m de altura, .90, de largo y .60m de ancho, recubierto en su interior de un paño negro; cerrada hermeticamente, con sistemas de ventilación, termostatación y reloj controlador de ritmo de iluminación. En su interior se adapta perfectamente un módulo estanteria portajaulas (Panlab , S.L.).

Los animales sometidos a luz recibieron un espectro de longitud de onda comprendido entre 380-750 nm y una intensidad de 114,03 lux.

Todos los grupos experimentales permanecieron dentro de la caja durante 21 días.

2.4.PREPARACION DE LOS HOMOGENADOS.- Separada la cabeza

del tronco por decapitación, se extrae el cerebro. Se disecaron y separaron hipotálamo y corteza cerebral, que fueron pesados inmediatamente en balanza de precisión (Mettler H 10). El hipotálamo se disecó utilizando las fisuras hipotalámicas, los cuerpos mamilares y un punto 2-3mm por delante del quiasma óptico, profundizando unos 2-3mm. El proceso de extracción, disección y pesada se realizó en ambiente frío, entre 0 y 4° C, en un tiempo no superior a 3 minutos. Cada porción se introdujo en un tubo de ensayo que contenía 6 ml de una solución congelada de Krebs-Ringer. De estas muestras se partió para la homogenización, que fué realizada en un homogenizador Potter S (Braun Melsungen), a 3-4°C de temperatura, 1000 revoluciones por minuto y en un tiempo aproximado de 45-60 segundos.

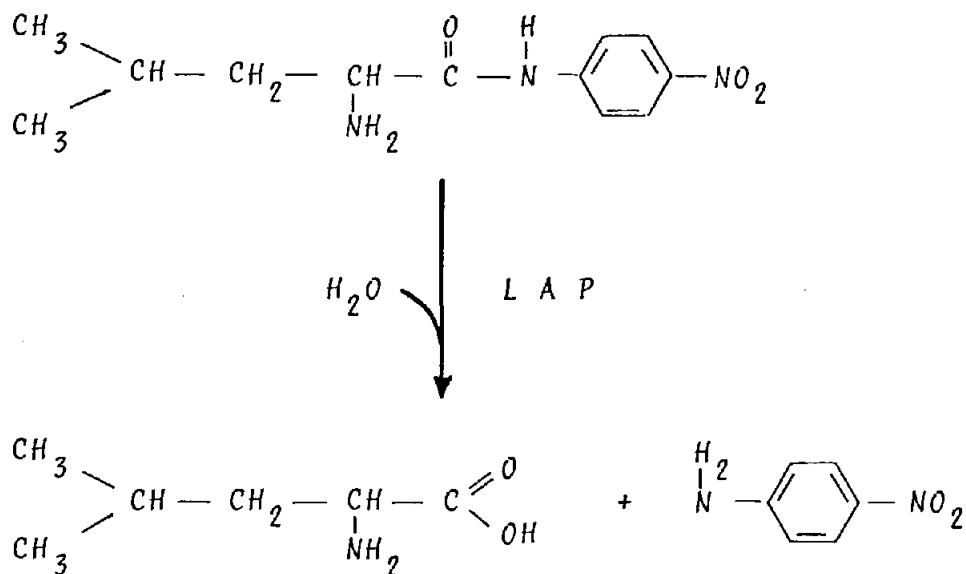
## 2.5. MEDIDA DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

2.5.1. Actividad Leucinaminopeptidasa (LAP). - Leucina Arilamidasa, EC 3.4.11. (aminopéptido hidrolasa).

Hemos seguido el método colorimétrico descrito por NAGEL y cols. (1964), utilizando como sustrato L-leucina-p-nitroanilida (Monotest LAP. Boehringer Mannheim, S.A.).

### 2.5.1.1. Fundamento

L-leucina-p-nitroanilida  $\longrightarrow$  L-leucina + p-nitroanilina



Determinamos por espectrofotometría las diferencias de extinción producidas por los cambios de concentración de p-nitroanilina, producto de la reacción enzimática, índice de la cantidad de LAP presente.

#### 2.5.1.2. Métodos

Se mezclan:

3. ml de una solución de L-leucina-p-nitroanilida 0,85mM, en tampón fosfato 0,1M a pH=7,2, mantenida a 25°C en baño maria.
- .2 ml de homogenado

Rapidamente se lee la extinción en espectrofotómetro ( Beckman DB-GT, con sistema de registro), a 405 nm de longitud de onda y blanco frente al aire. Disparar simultaneamente el cronómetro y repetir las lecturas exactamente a 1,2, y 3 minutos después.

#### 2.5.1.3. Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática se calcula por las diferencias de extinción por minuto, según la siguiente tabla de valores.

$\Delta E/\text{min}$	mU/ml	$\Delta E/\text{min}$	mU/ml	$\Delta E/\text{min}$	mU/ml
.001	2	.010	16	.019	31
2	3	11	18	20	32
3	5	12	19	22	36
4	7	13	21	24	39
5	8	14	23	26	42
6	10	15	24	28	45
7	11	16	26	30	49
8	13	17	27		
9	15	18	28		

#### 2.5.1.4. Puesta a punto del método

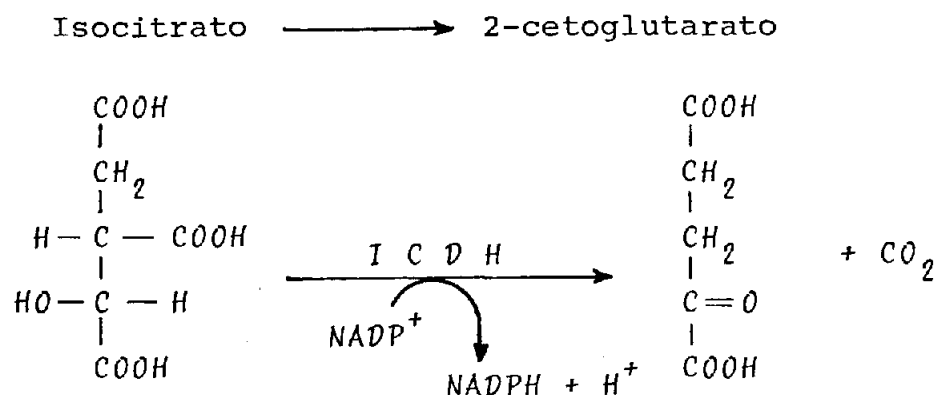
Hemos comprobado el efecto de la concentración de enzima y de la concentración de sustrato sobre la cinética enzimática para elegir las concentraciones mas idóneas de estos

dos variables, y además confirmar si nos encontrábamos trabajando en orden cero (véase gráficas 1, y 2).

2.5.2. Actividad Isocitrato deshidrogenasa (ICDH).- Dependiente de NADP, EC 1.1.1.42.

Hemos seguido el método colorimétrico descrito por WOLFSON y WILLIAMS-ASHMAN (1957), usando como sustrato DL-isocitrato (Test Combination ICDH. Boehringer Mannheim, S.A.).

#### 2.5.2.1. Fundamento

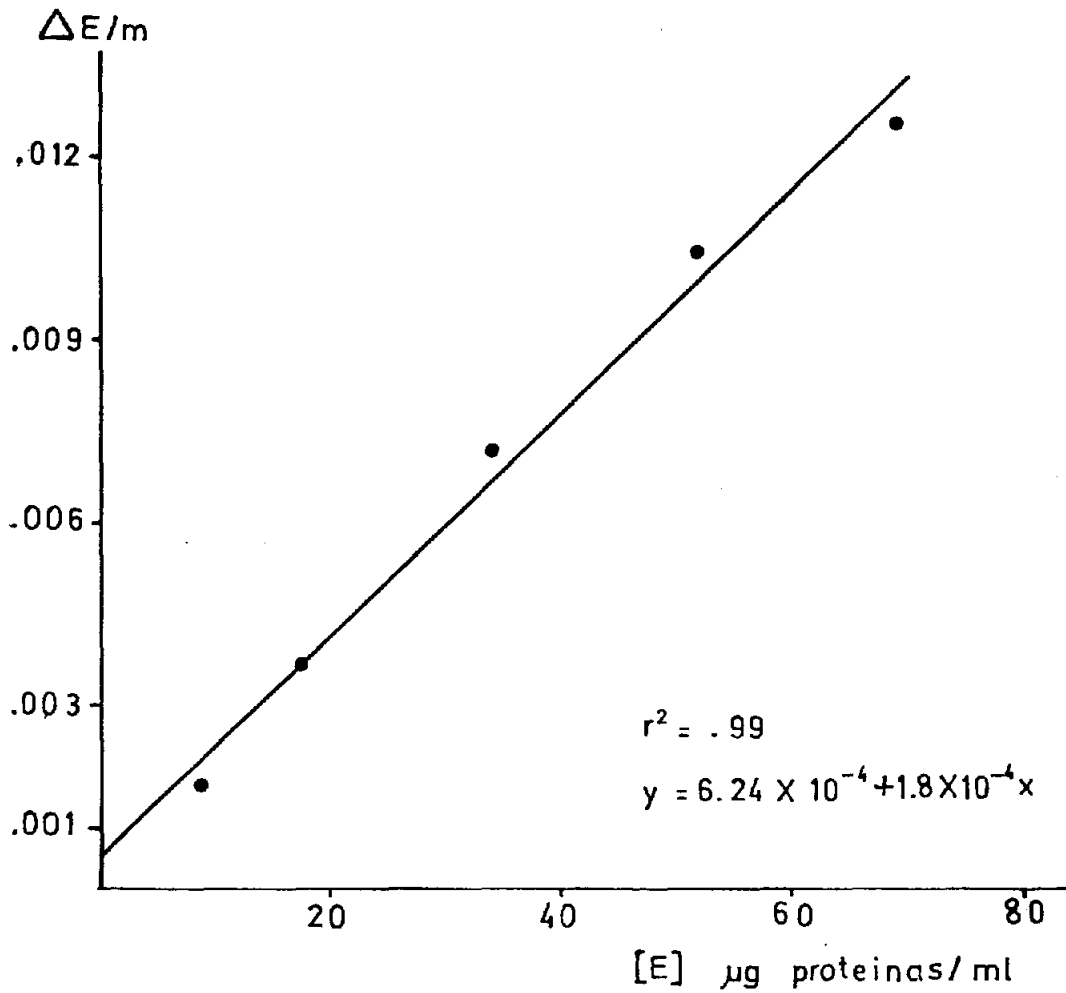


Determinamos por espectrofotometría las diferencias de extinción producidas por los cambios en la concentración de NADPH, índice de la cantidad de ICDH presente en la muestra.

#### 2.5.2.2. Método

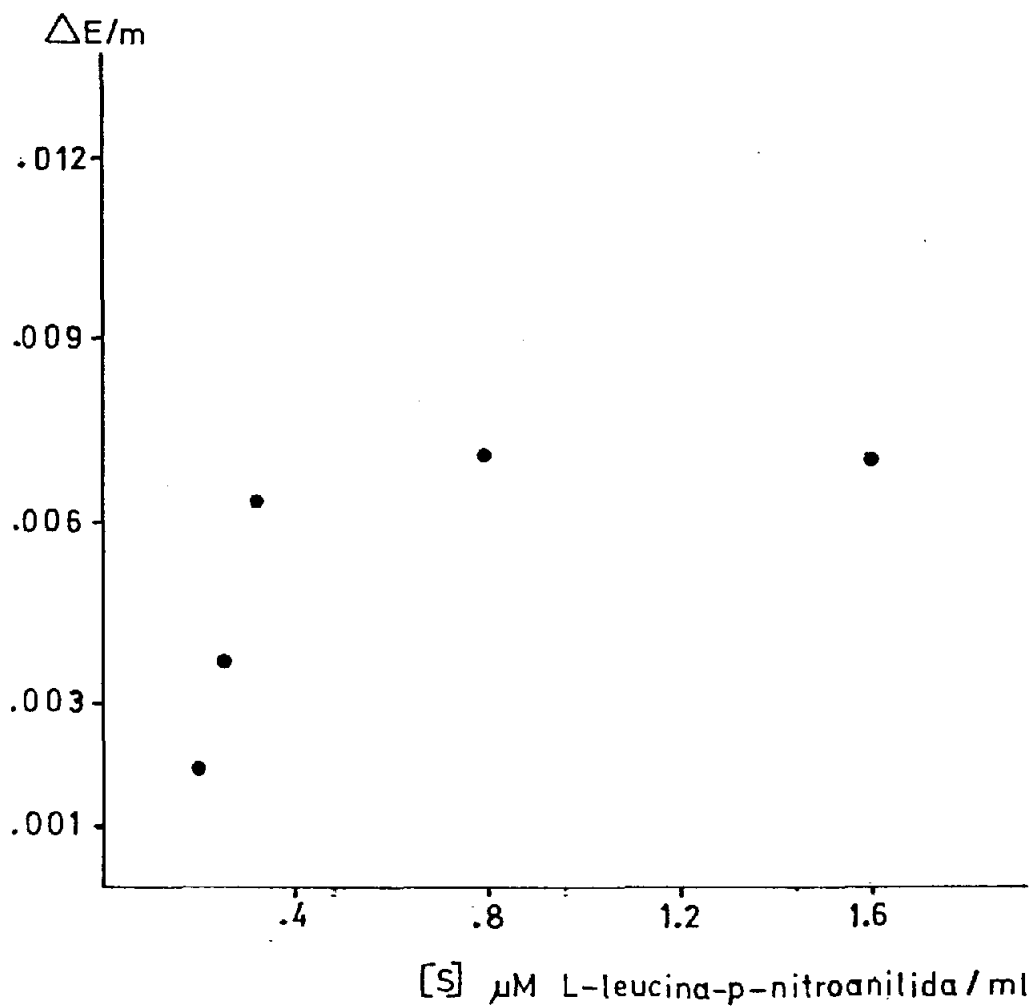
Se mezclan:

2,5 ml de una solución de DL-isocitrato 4,6mM en tam-



Gráfica 1.-Actividad LAP.- Relación entre concentración de enzima [E] y diferencia de extinción por minuto ( $\Delta E/m$ ).





Grafica 2. Actividad LAP. Relación entre concentración de sustrato [S] y diferencia de extinción por minuto ( $\Delta E/m$ ).

pón de trietanolamina 0,1M pH=7,5.

0,5 ml del homogenado

Dejar reposar a baño maria a 25°C durante 5 minutos.

Añadir:

0,1 ml de una solución de NADP<sup>+</sup> 9,1mM.

Rapidamente se lee la extinción en espectrofotómetro a 366 nm de longitud de onda y blanco frente al aire. Disparar simultaneamente el cronómetro y repetir las lecturas exactamente 1,2, y 3 minutos después.

#### 2.5.2.3. Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática se calcula por las diferencias de extinción por minuto, según la siguiente tabla de valores.

$\Delta E/\text{min}$	mU/ml	$\Delta E/\text{min}$	mU/ml	$\Delta E/\text{min}$	mU/ml
.001	2	.008	13	.020	35
2	4	9	15	22	39
3	5	10	18	24	43
4	7	12	21	26	46
5	9	14	25	28	50
6	11	16	28	30	53
7	12	18	32	40	71

## 2.5.2.4. Puesta a punto del método

Hemos comprobado el efecto de la concentración de enzima y de la concentración de sustrato sobre la cinética enzimática para elegir las concentraciones mas idóneas de estas dos variables, y además confirmar si nos encontrabamos trabajando en orden cero (véase gráficas 3, y 4).

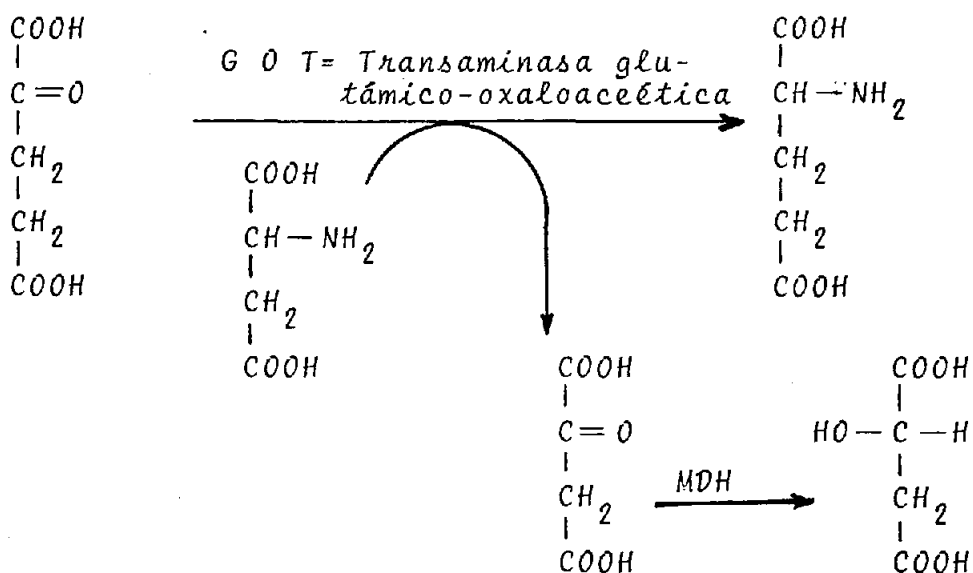
2.5.3. Actividad Malato deshidrogenasa (MDH).- Dependiente de NAD, EC 1.1.1.37.

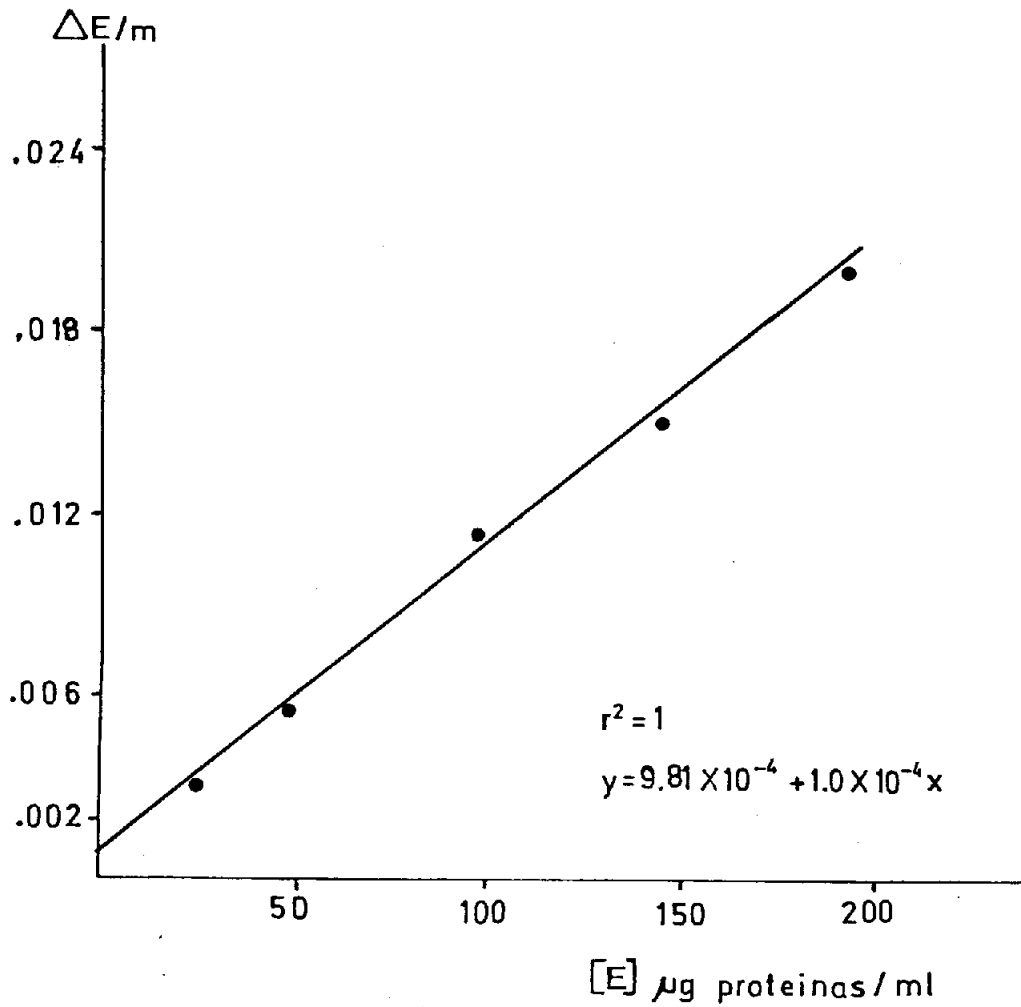
Hemos seguido el método colorimétrico descrito por BERGMAYER (1970), utilizando como sustrato oxaloacetato (Test Combination MDH. Boehringer Mannheim, S.A.)

## 2.5.3.1. Fundamento

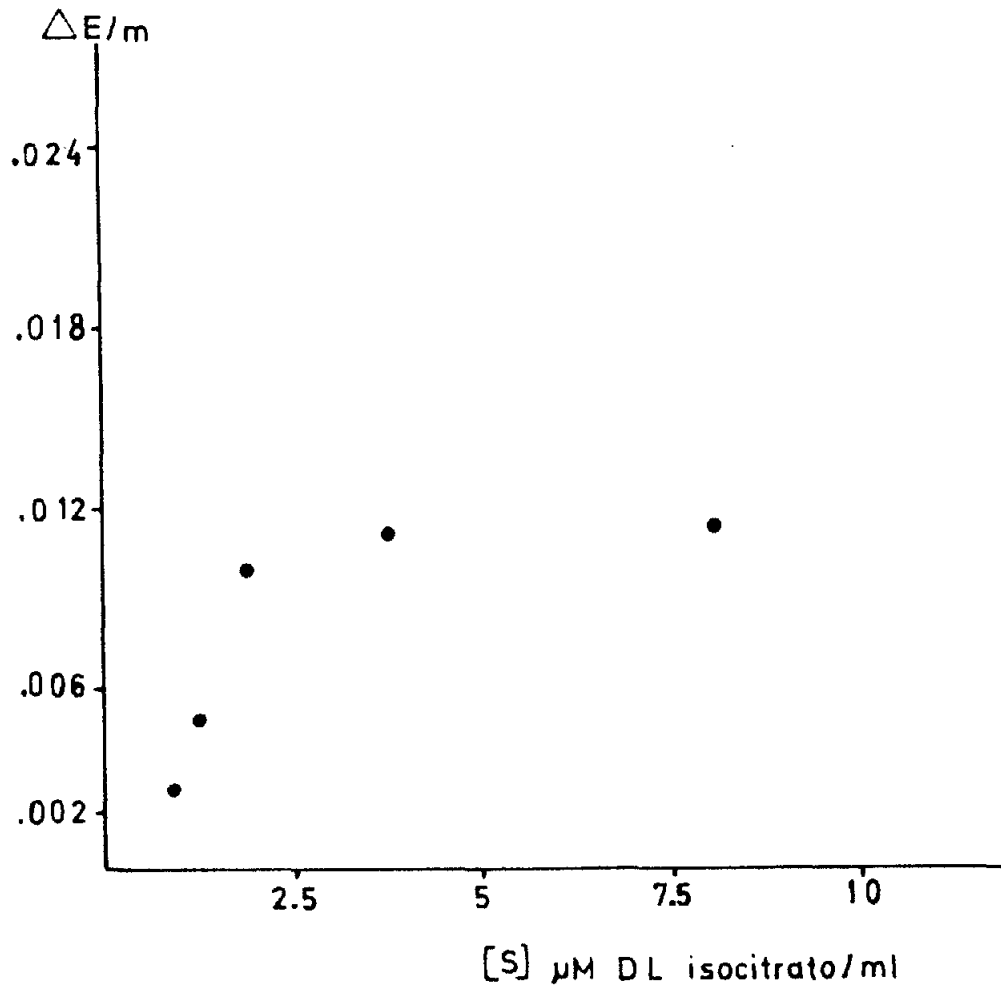
2-cetoglutarato + L-aspartato  $\longrightarrow$  oxaloacetato + L-glutamato

Oxaloacetato + NADH + H<sup>+</sup>  $\longrightarrow$  L-malato + NAD<sup>+</sup>





Gráfica 3. Actividad ICDH. Relación entre concentración de enzima  $[E]$  y diferencia de extinción por minuto ( $\Delta E/m$ ).



Grafica 4.-Actividad ICDH.-Relación entre concentración de sustrato [S] y diferencia de extinción por minuto ( $\Delta E/m$ ).

Determinamos por espectrofotometría las diferencias de extinción producidas por los cambios de concentración de NADH, índice de la cantidad de MDH presente en la muestra.

#### 2.5.3.2. Método

Se mezclan:

3. ml de una solución de L-aspartato 42 mM en tampón fosfato 0,1M.

.005 ml de solución de 2-cetoglutarato en agua bidestilada

.005 ml de sol. NADH 12mM en agua bidestilada.

.005 ml de sol. GOT aproximadamente con 20U/ml.

Dejar reposar en baño maria a 25°C durante 5 minutos.

Añadir:

.1 ml de homogenado

Rapidamente se lee la extinción en espectrofotómetro a 366 nm de longitud de onda y blanco frente al aite. Disparar simultaneamente el cronómetro y repetir las lecturas exactamente 1, 2, y 3 minutos despés.

#### 2.5.3.3. Determinación de la actividad enzimática

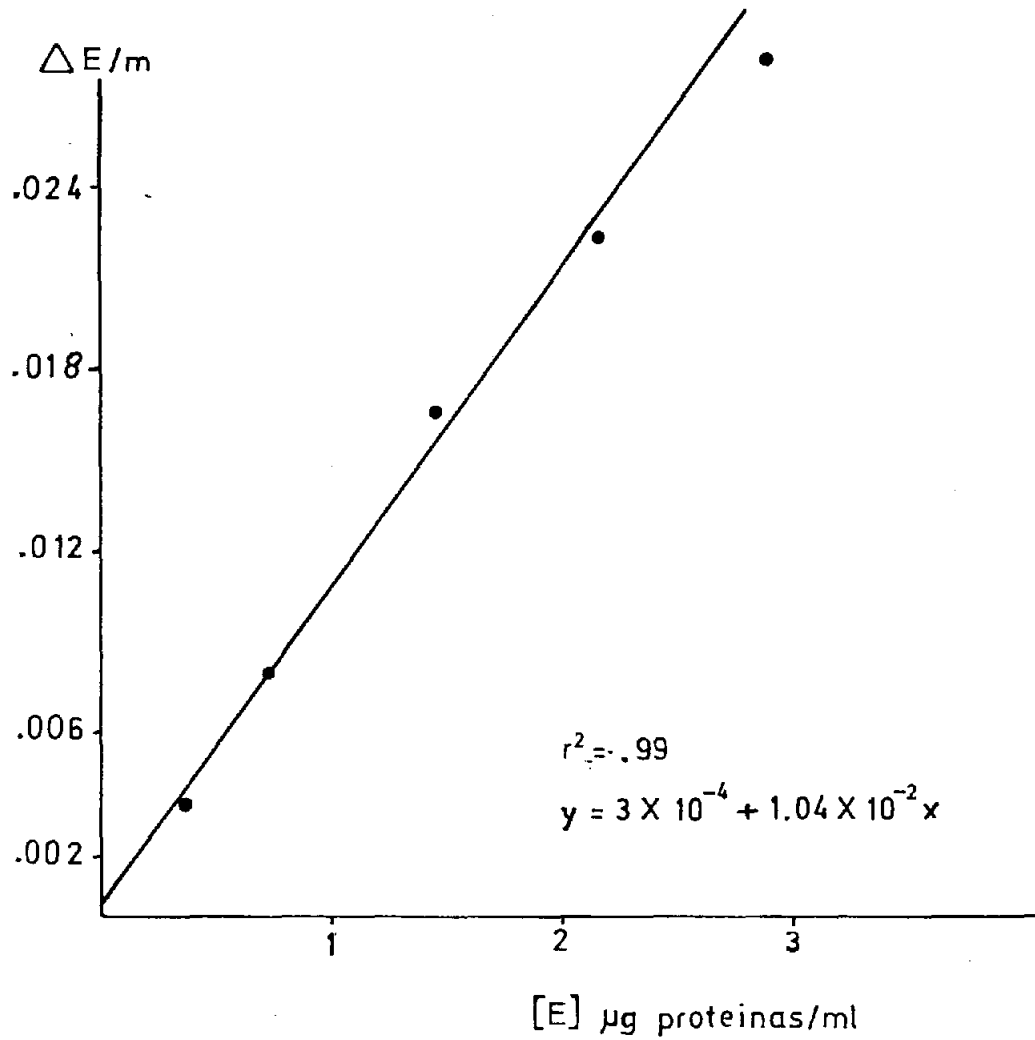
La actividad enzimática se calcula por las diferencias de extinción pro minuto, según la siguiente tabla de valores.

$\Delta E/\text{min}$	mU/ml	$\Delta E/\text{min}$	mU/ml	$\Delta E/\text{min}$	mU/ml
.001	10	.008	76	.020	191
2	19	9	86	22	210
3	29	10	96	24	229
4	38	12	115	26	249
5	48	14	134	28	268
6	57	16	153	30	287
7	67	18	172		

#### 2.5.3.4. Puesta a punto del método

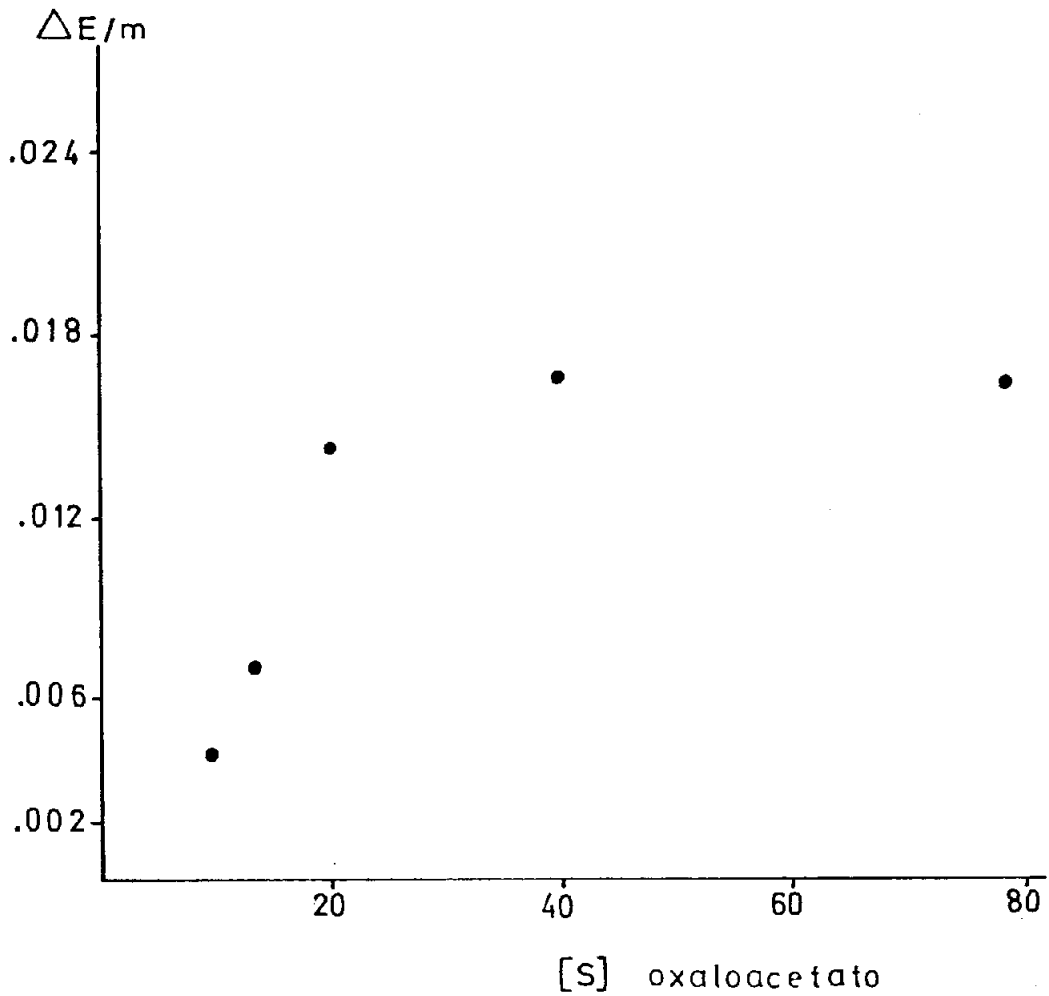
Hemos comprobado el efecto de la concentración de enzima y de la concentración de sustrato sobre la cinética enzimática, para elegir las concentraciones más idóneas de estas dos variables, y además para confirmar si nos encontrábamos trabajando en orden cero (véase gráficas 5, y 6).

2.6. MEDIDA DE LAS PROTEINAS.- La concentración de proteínas presentes en las muestras fueron determinadas por el método de LOWRY (1951). Realizamos una curva patrón con albúmina bovina (gráfica 7) y comprobamos el efecto de la concentración de tejido fresco, hipotálamo y corteza, sobre la densidad óptica (véase gráficas 8, y 9).

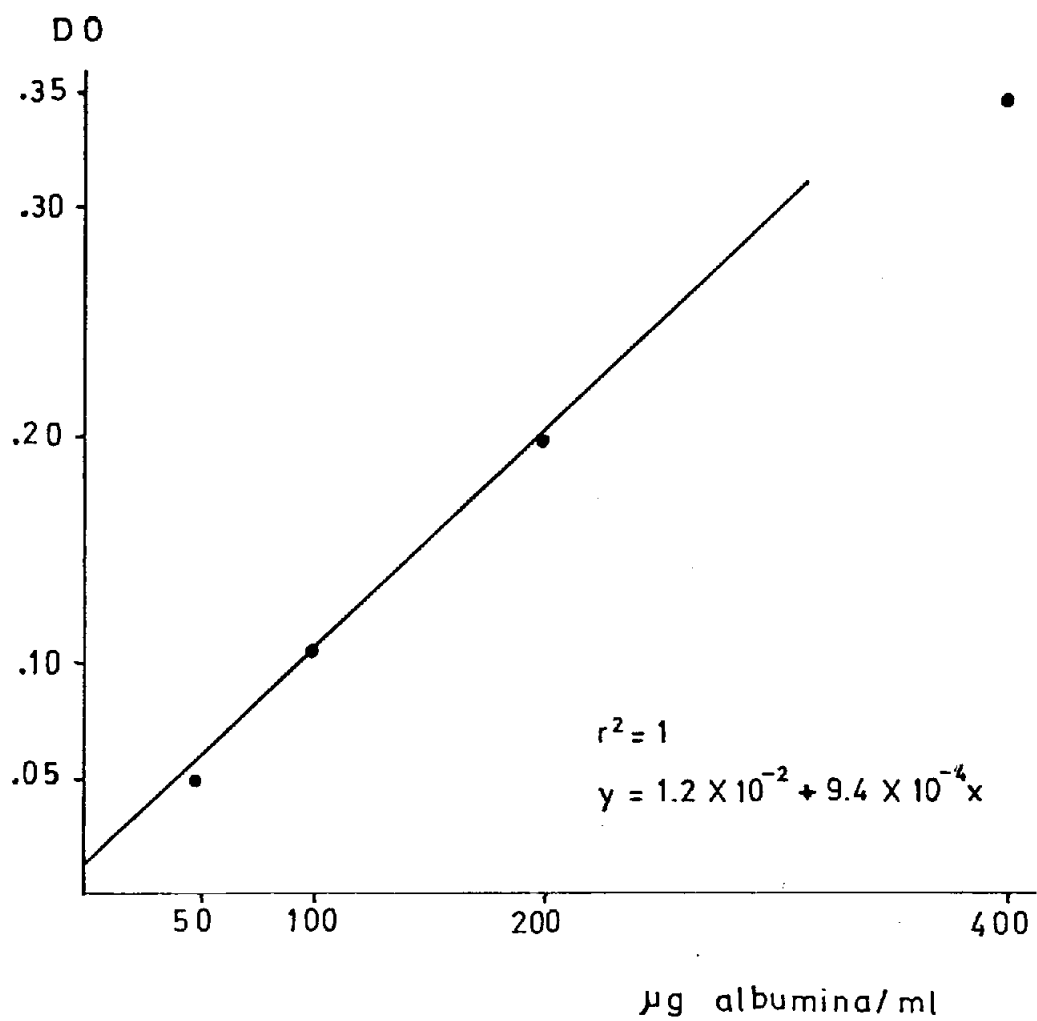


Gráfica 5. Actividad MDH. Relación entre concentración de enzima [E] y diferencia de extinción por minuto ( $\Delta E/m$ ).

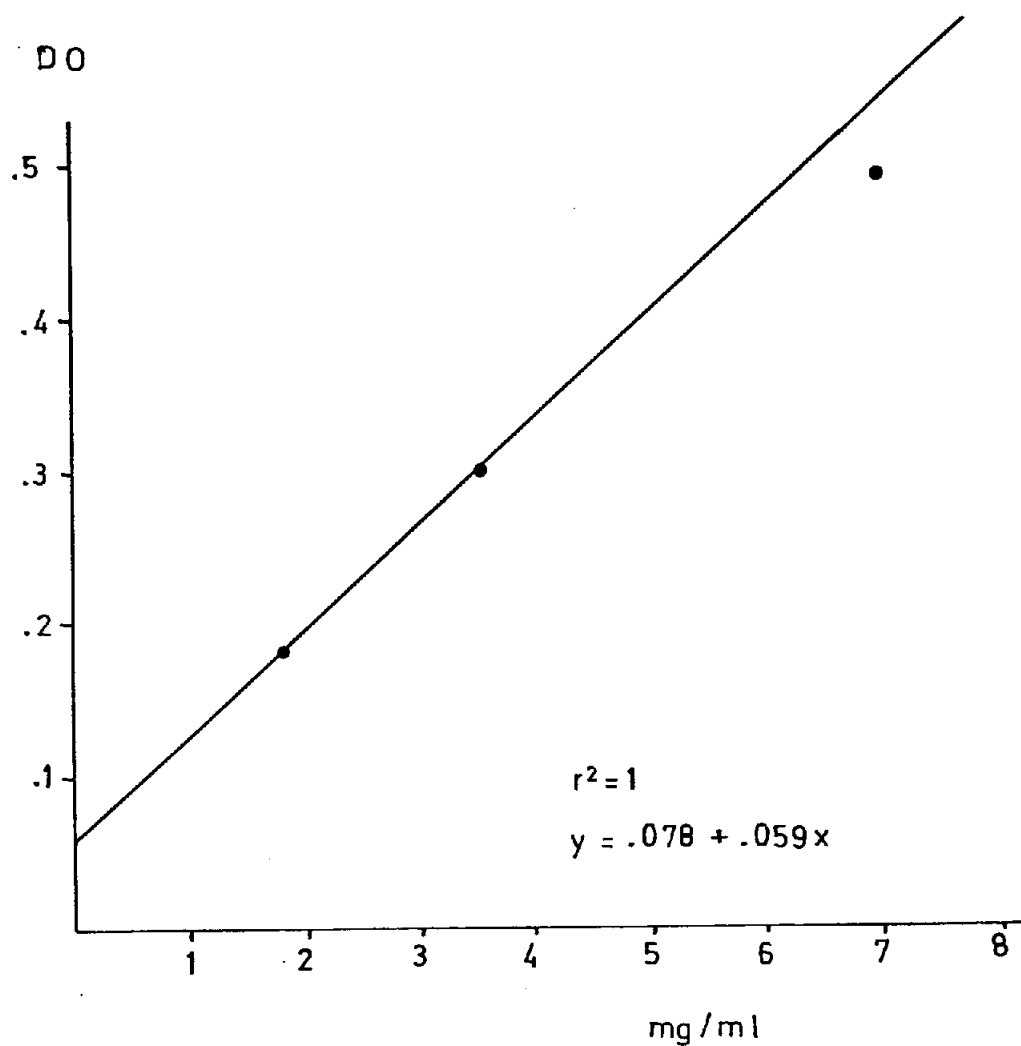




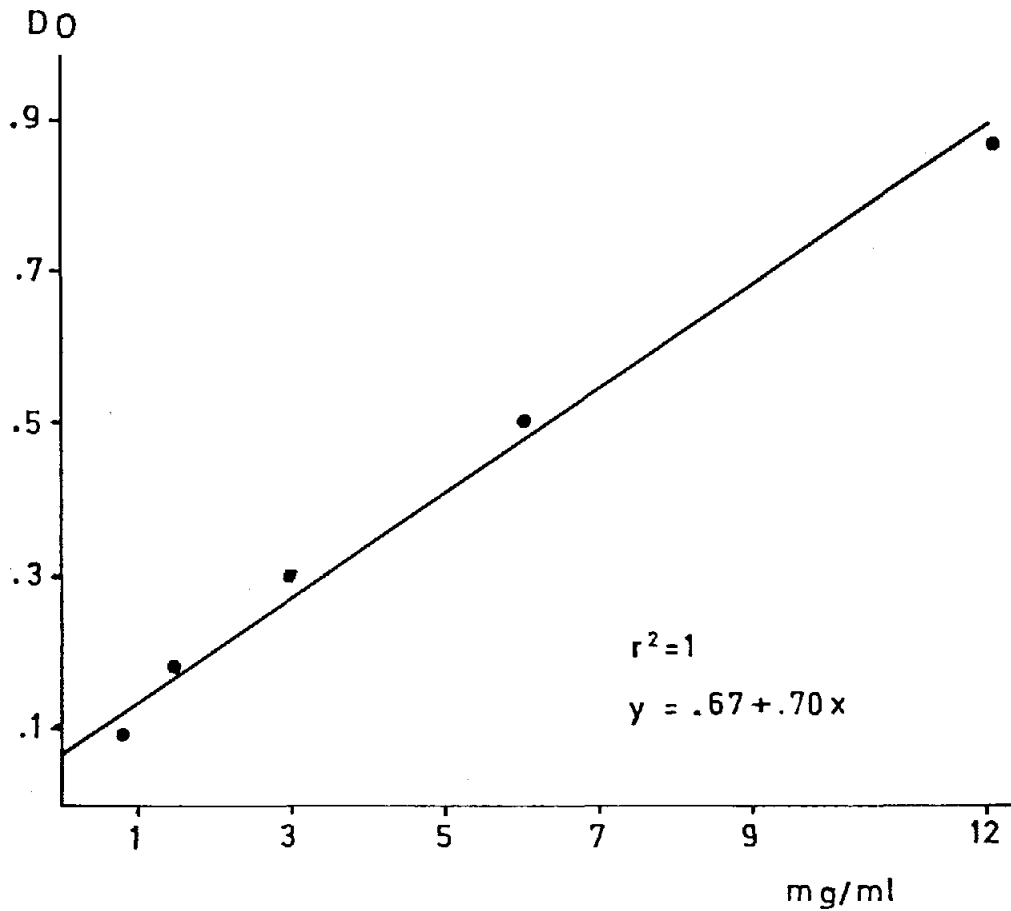
Gráfica 6.-Actividad MDH. Relación entre concentración de sustrato [S] y diferencia de extinción por minuto ( $\Delta E/m$ ).



Gráf. 7. Curva patrón de albumina bovina. Método de LOWRY (1951).



Gráf. 8.-Hipotálamo.-Relación entre concentración de tejido fresco (mg/ml) y densidad óptica (DO). Método de LOWRY (1951).



Gráf. 9.-Corteza.- Relación entre concentración de tejido fresco (mg/ml) y densidad óptica (DO). Metodo de LOWRY (1951).

## RESULTADOS

## RESULTADOS

Para el análisis de los resultados, y con el fin de facilitar la descripción de los mismos, dividiremos este capítulo en tres apartados.

En un primer apartado estudiaremos los valores de actividad leucinaminopeptidasa (LAP, isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y malato deshidrogenasa (MDH), que con las técnicas descritas en el capítulo de material y métodos, hemos obtenido en nuestros experimentos, tanto en hipotálamo como en corteza, de los siguientes grupos de animales mantenidos en un fotoperíodo normal (IN) de 14 horas luz y 10 horas oscuridad. 1<sup>º</sup> Controles o testigos (C). 2<sup>º</sup> Tratados con valerianato de estradiol (+VE). 3<sup>º</sup> Castrados (Gx) y 4<sup>º</sup> Castrados y tratados con valerianato de estradiol (Gx+VE).

En este apartado analizaremos el efecto que sobre la actividad LAP, ICDH y MDH de hipotálamo y corteza tienen la administración de VE, la castración, y la castración + administración de VE, al comparar cada uno de estos grupos con los animales C.

En el segundo apartado estudiaremos los efectos que los

cambios en los fotoperíodos, iluminación permanente (LP) y oscuridad permanente (OP), provocan en la actividad LAP, ICDH y MDH, en hipotálamo y corteza de los distintos grupos de animales explorados: C, +VE, Gx, y Gx+VE. Para ello compararemos, en los diversos grupos de animales mencionados, los valores de actividad enzimática en los fotoperíodos OP y LP con los obtenidos en IN.

En el tercer apartado estudiaremos por último, la forma en que los distintos fotoperíodos modulan el efecto de la administración de valerianato de estradiol, la castración y la castración + administración de VE, producen sobre la actividad enzimática LAP, ICDH y MDH en hipotálamo y corteza. Para ello compararemos los siguientes grupos de animales: C con +VE, C con Gx, Gx con Gx+VE y +VE con Gx+VE, mantenidos en OP, LP e IN respectivamente.

#### 1. ANIMALES CONTROLES

Para poder analizar el efecto que la administración de VE, la castración y la castración + administración de VE tienen sobre las actividades enzimáticas LAP, ICDH y MDH en hipotálamo y corteza, es necesario conocer previamente los valores considerados normales de estas actividades enzimáticas.

Para ello analizaremos los valores que hemos encontrado en el grupo control. Estos animales no han sufrido ninguna manipulación experimental, y se encuentran sometidos a un fotoperíodo normal (IN) de 14 horas luz y 10 horas oscuridad, (véase figuras 1, y 2).

En el hipotálamo hemos encontrado 5 veces mas actividad LAP ( $17,76 \pm .86$ ) que en la corteza ( $3,54 \pm .10$ ). La actividad ICDH en el hipotálamo ( $40,93 \pm 4,22$ ) tambien es mayor que en la corteza ( $26,88 \pm 1,22$ ). Por el contrario la actividad MDH es dos veces superior en la corteza ( $3419,00 \pm 45,76$ ) que en hipotálamo ( $1655,78 \pm 98,76$ ).

Es interesante señalar que los valores (expresados en mU/mg proteínas) de la actividad MDH son unas cien veces superior a los de las restantes actividades enzimáticas exploradas, tanto en la corteza como en el hipotálamo.

2. EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE VALERIANATO DE ESTRADIOL (véase figuras 3, y 4).

2.1. En el hipotálamo la administración de valerianato de estradiol produce un incremento significativo de la actividad LAP ( $21,16 \pm .27$ ), de la actividad ICDH ( $53,54 \pm 1.0$ ) con valores  $p < .01$ , y de la actividad MDH ( $2686 \pm 28,02$ ) con valor  $p < .001$ .

2.2. En la corteza una disminución ( $p < .001$ ) tanto



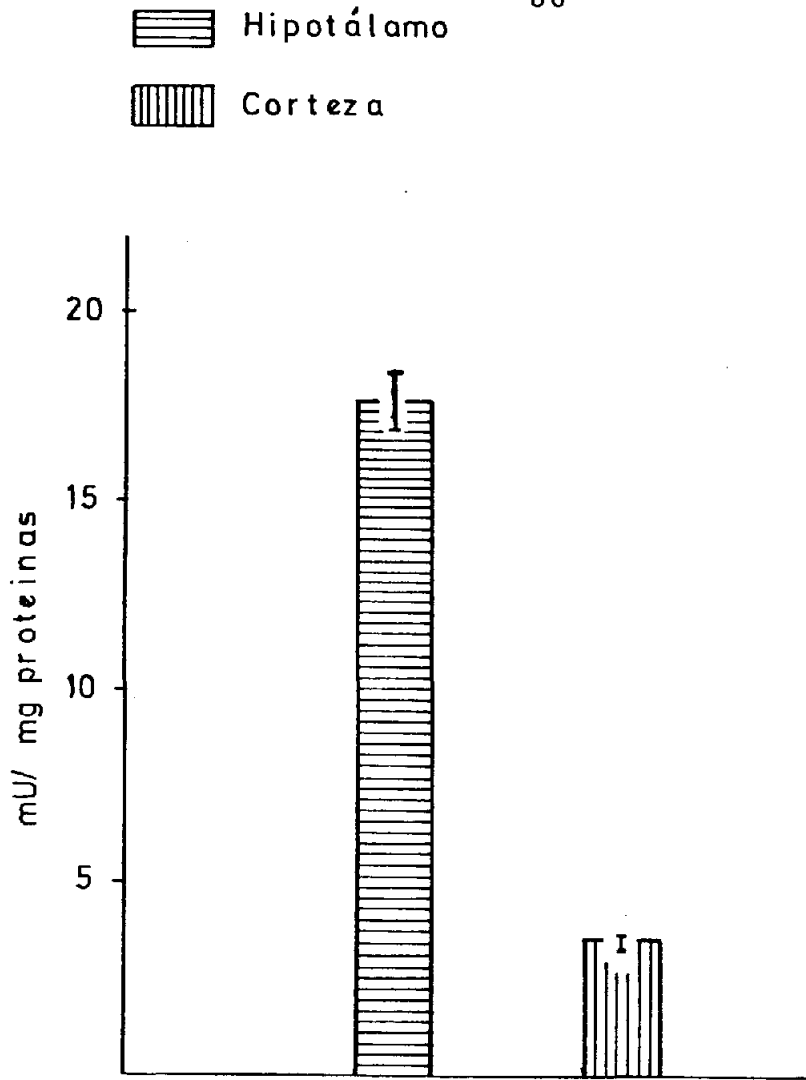


Fig. 1.- Actividad LAP en animales controles.

Las columnas representan la media de los valores obtenidos en 10 animales por grupo y las barras ESM.

\* =  $p < .05$     \*\* =  $p < .01$     \*\*\* =  $p < .001$

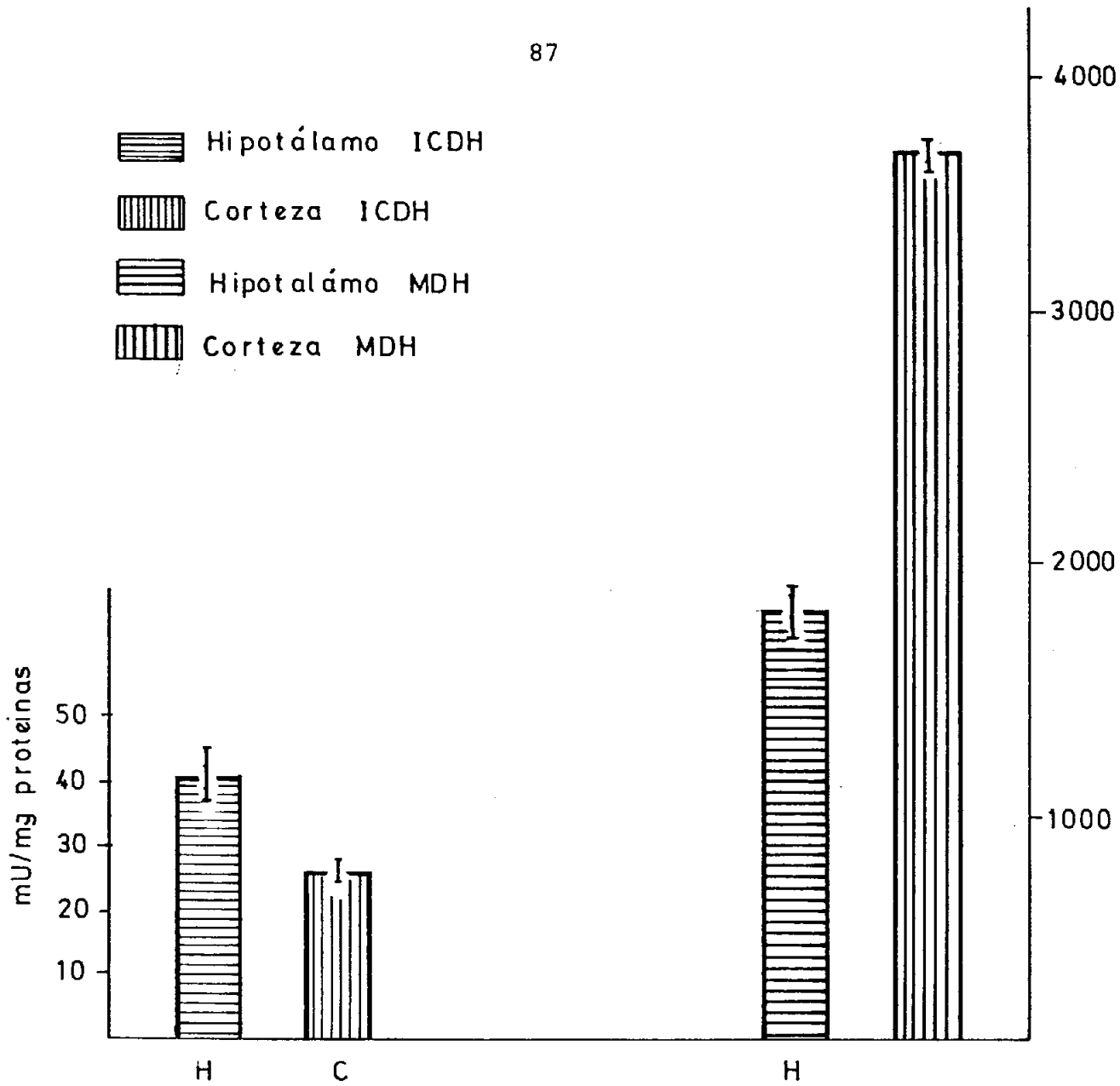


Fig. 2.- Actividad ICDH y MDH en animales controles

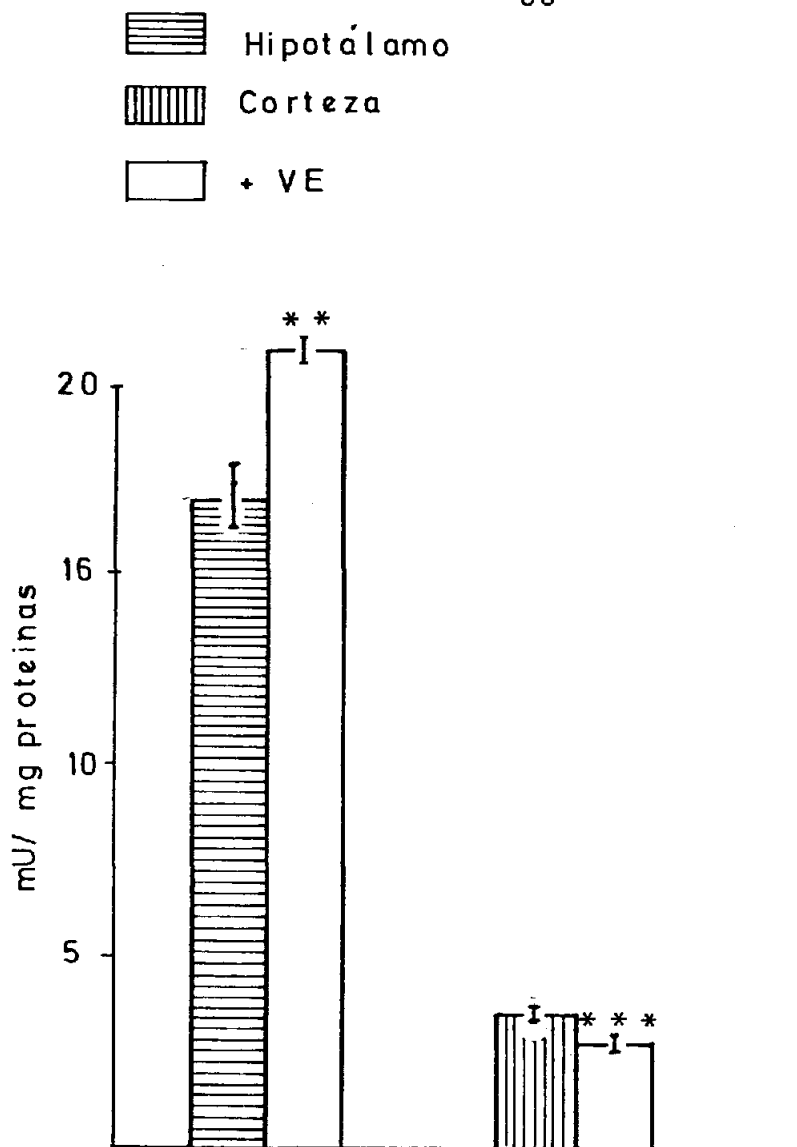


Fig. 3.- Efecto de la administración de valerianato de estradiol (+ VE) sobre la actividad LAP.

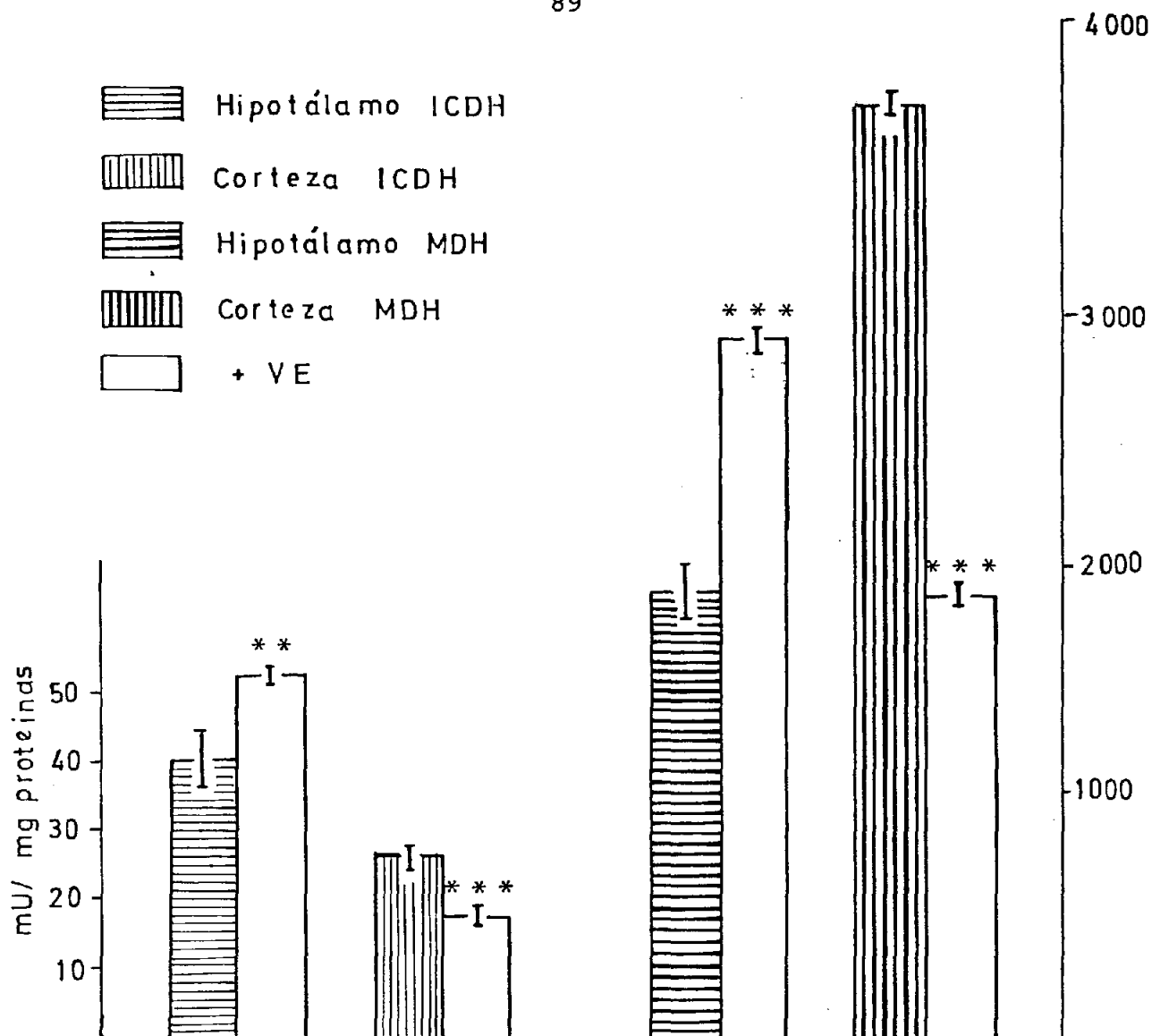


Fig. 4.- Efecto de la administración de valerianato de estradiol (+VE) sobre la actividad ICDH y MDH.

en la actividad LAP (  $2,77 \pm .06$  ), como en la actividad ICDH (  $18,27 \pm .44$  ) y en la MDH (  $1609,00 \pm 19,75$  ).

*En resumen, la administración de VE disminuye significativamente todas las actividades enzimáticas exploradas en la corteza, y aumenta por el contrario, las actividades enzimáticas en el hipotálamo.*

### 3. EFECTO DE LA CASTRACIÓN (véase figuras 5, y 6)

3.1. En el hipotálamo la castración produce una disminución significativa ( $p < .001$ ) en la actividad LAP ( $10,68 \pm .72$ ) y de la ICDH ( $p < .01$ ) ( $26,84 \pm .95$ ), permaneciendo invariable la actividad MDH ( $1886,00 \pm 82,51$ ).

3.2. En la corteza no se aprecian modificaciones significativas en la actividad LAP ( $4,53 \pm .07$ ), aunque disminuyen significativamente ( $p < .01$ ) la actividad ICDH ( $22,10 \pm .52$ ) y la actividad MDH ( $p < .001$ ) ( $2282,0 \pm 43,67$ ).

*En resumen la castración produce un decremento en las actividades enzimáticas exploradas tanto en el hipotálamo como en la corteza.*

### 4. EFECTO DE LA CASTRACION Y ADMINISTRACION DE VALERIANATO DE ESTRADIOL (véase figuras 7, y 8, y cuadros 1, y 2).

4.1. En el hipotálamo la castración + VE produce una disminución significativa de la actividad LAP ( $12,54$

Cuadro n° 1.- Valores de actividad LAP, ICDH y MDH ( expresados en mU/mg proteínas) en hipotálamo de animales sometidos a iluminación normal (14 horas luz/10 horas oscuridad)

	LAP	ICDH	MDH
Controles	17,75 ± .86	40,93 ± 4,22	1655,78 ± 98,76
+ VE	21,16 ± .27	53,54 ± 1.0	2686,00 ± 28,02
Castrados	10,68 ± .72	26,84 ± .95	1886,00 ± 82,51
Gx + VE	12,54 ± 1.59	26,09 ± 1.64	2465,00 ± 88,64

Cuadro nº 2.- Valores de actividad LAP, ICDH y MDH (expresados en mU/mg proteínas) en corteza de animales sometidos a iluminación normal (14 horas luz/10 horas oscuridad)

	LAP	ICDH	MDH
Controles	3,54 ± .10	26,88 ± 1.22	3419,00 ± 45,76
+ VE	2,77 ± .06	18,27 ± .44	1609.00 ± 19,75
Castrados	4,53 ± .07	22,10 ± .52	2828,00 ± 43,67
Gx + VE	3,63 ± .07	19,40 ± .38	2202,00 ± 56.81

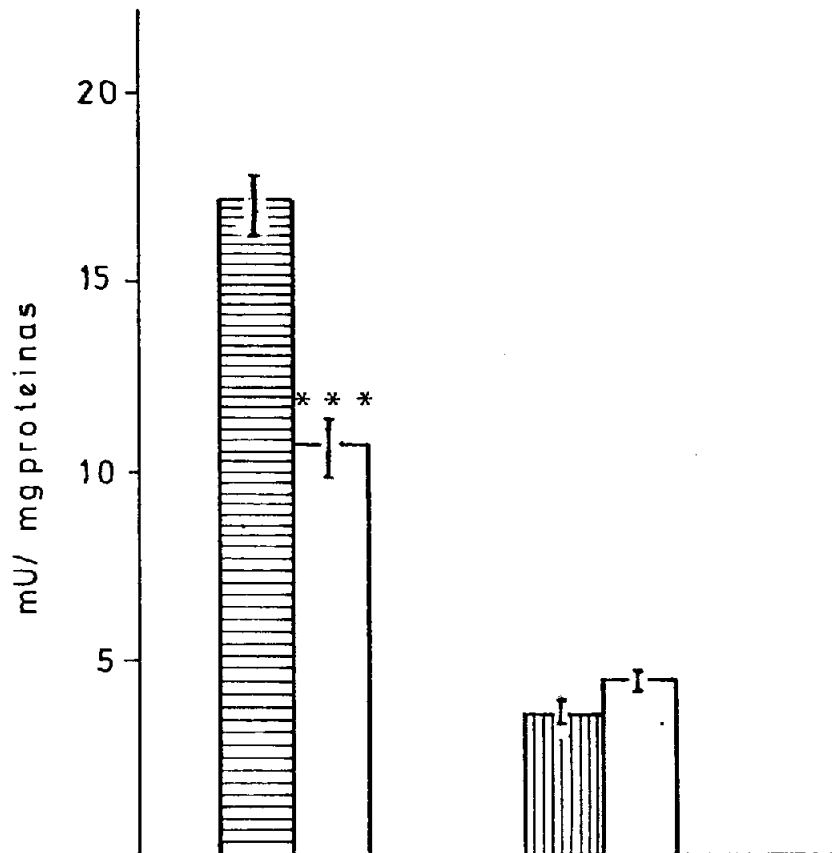
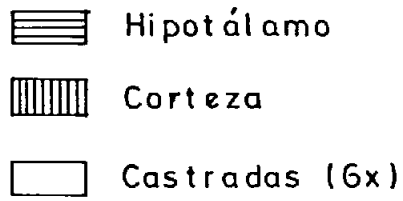


Fig. 5.- Efecto de la castración (6x) sobre la actividad LAP.



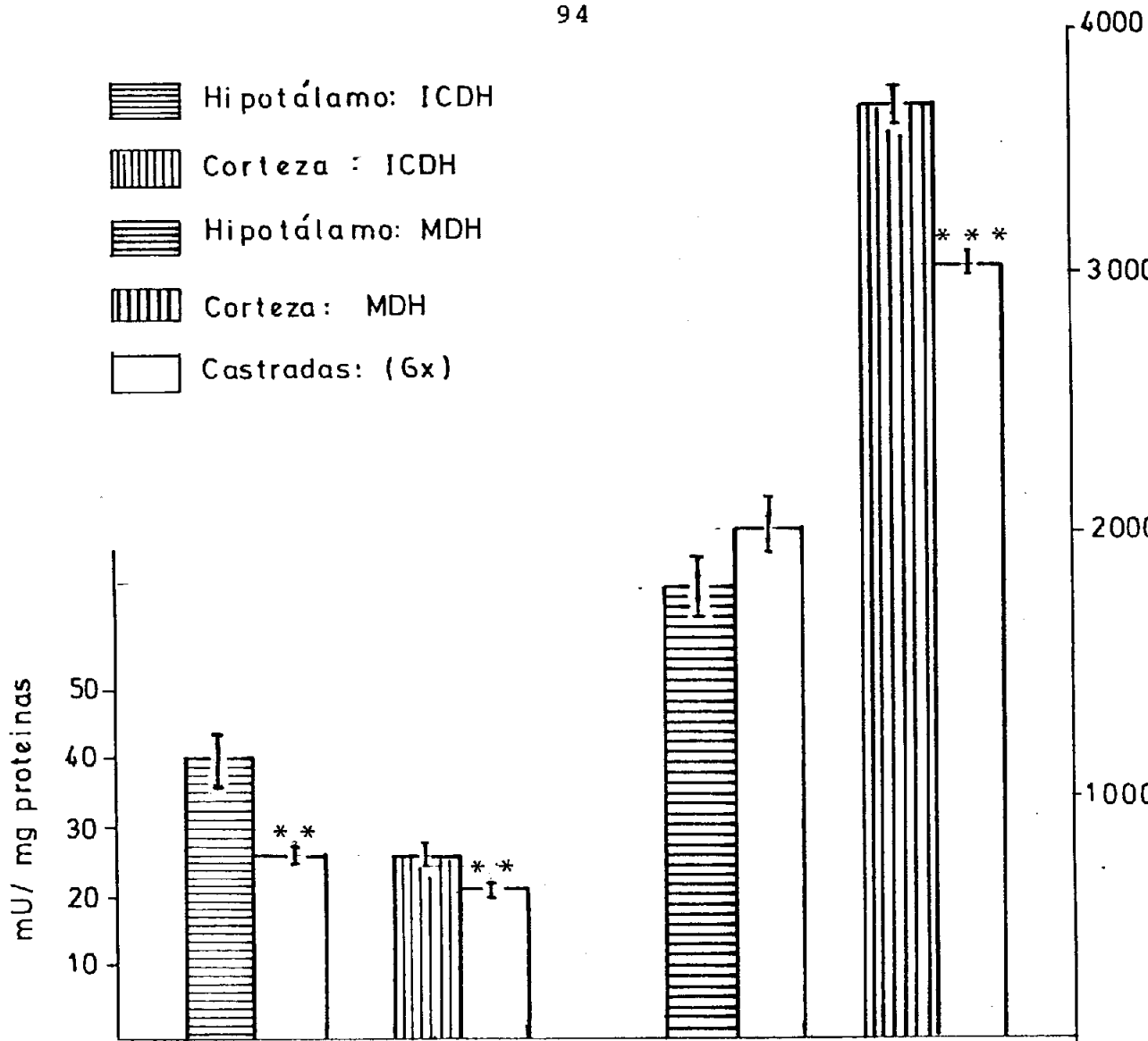


Fig. 6.- Efecto de la castración (Gx) sobre la actividad ICDH y MDH.

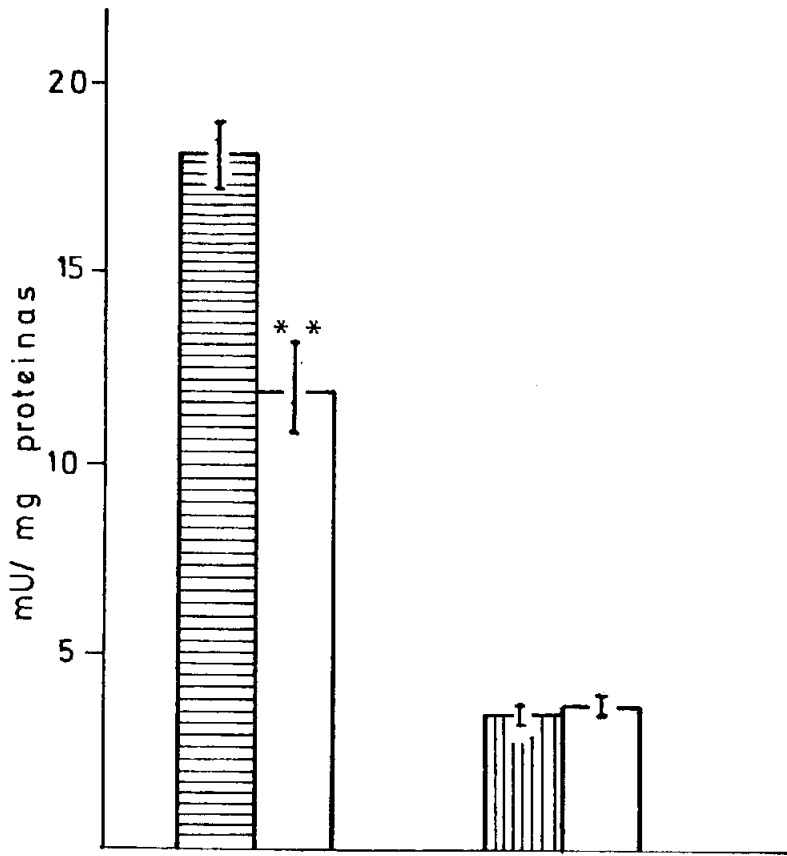
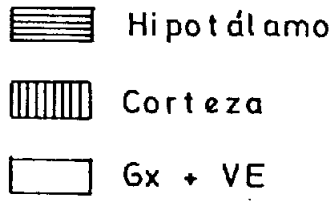


Fig. 7.- Efecto de la castración y administración de valerianato de estradiol (Gx + VE) sobre la actividad LAP.

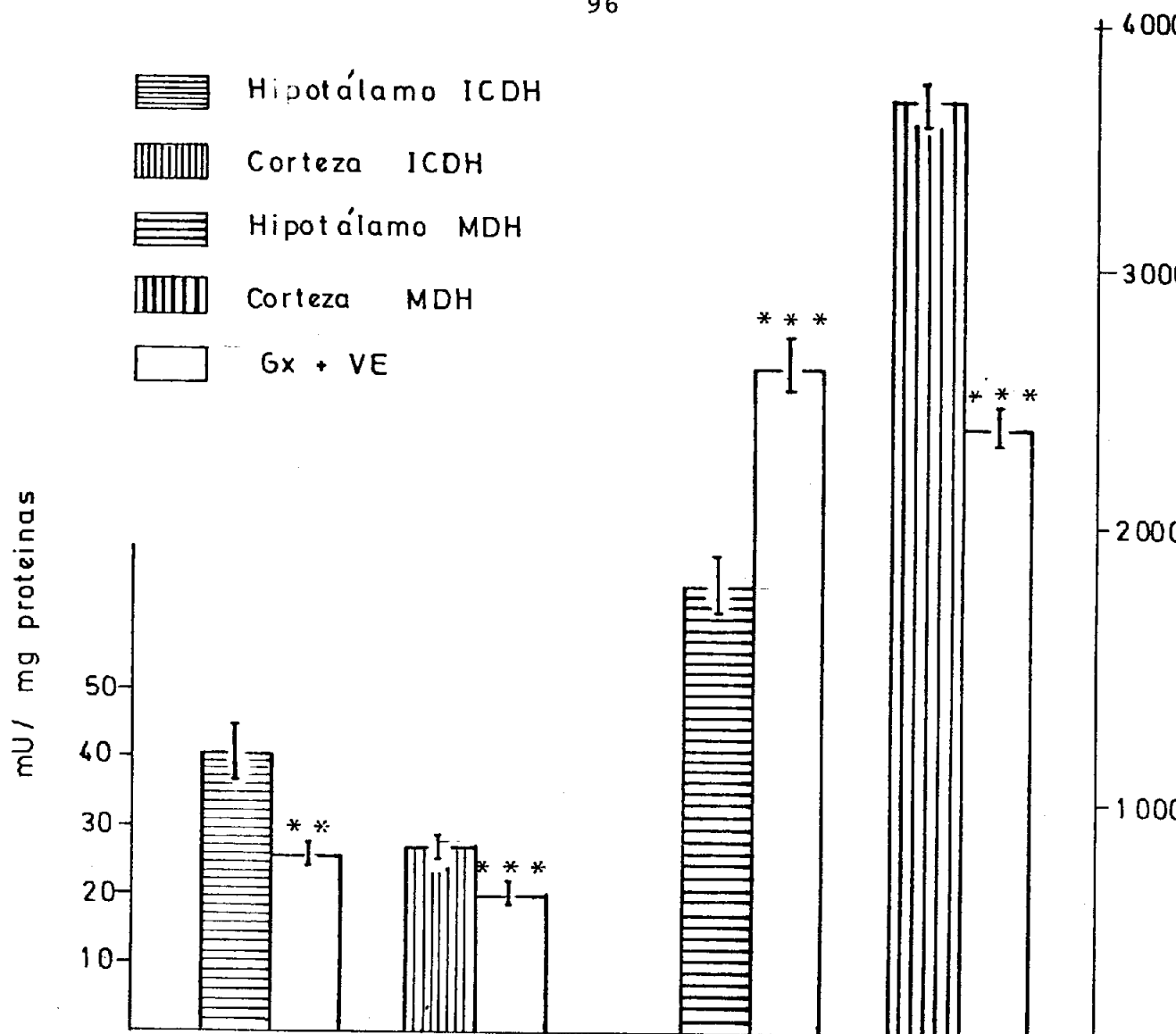


Fig. 8.- Efecto de la castración y administración de valerianato de estradiol (Gx + VE) sobre la actividad ICDH y MDH.

$\pm 1.69$ ) si se les compara con el grupo control ( $p < .01$ ) y con el grupo de ratas +VE ( $p < .001$ ). También disminuye la actividad ICDH ( $26.09 \pm 1.64$ ) en relación con los grupos control ( $p < .01$ ) y +VE ( $p < .001$ ), pero con valores similares al grupo de las Gx.

La actividad MDH ( $2465.0 \pm 88,64$ ) aumenta significativamente ( $p < .001$ ) cuando se las compara tanto con las ratas controles como con las castradas, pero sus valores son similares a los obtenidos en el grupo de ratas +VE.

4.2. En la corteza la actividad LAP ( $3,63 \pm .07$ ) no sufre cambio con respecto a las controles, Comparada con las Gx, la actividad LAP sufre una disminución significativa ( $p < .001$ ) y un aumento también significativo ( $p < .001$ ) en relación con el grupo +VE.

La actividad ICDH ( $19,40 \pm .38$ ) disminuye significativamente ( $p < .001$ ) comparada con las ratas C y con las Gx ( $p < .01$ ), y su valor no varía significativamente con respecto al grupo +VE.

La actividad MDH ( $2202,50 \pm 56,81$ ) disminuye significativamente ( $p < .001$ ) con respecto a las C y Gx, pero aumenta ( $p < .001$ ) con respecto a las ratas +VE.

En resumen, en el hipotálamo la actividad LAP e ICDH en contrada en los animales Gx+VE es mas baja que en los grupos C y +VE; la actividad MDH, por el contrario, es superior a

los C y Gx. En la corteza, la actividad LAP en Gx+VE tiene un valor similar al grupo C, superior a +VE e inferior a las Gx; la actividad ICDH es inferior a las C y Gx y similar a las +VE; la actividad MDH es mayor que la encontrada en todos los demás grupos de animales.

## 5. EFECTOS DE LOS CAMBIOS EN LOS FOTOPERIODOS. OP y LP.

### 5.1. Animales controles (véase figuras 9, y 10)

5.1.1. En el hipotálamo la actividad LAP disminuye significativamente ( $p < .001$ ) tanto al prolongar el período de iluminación (LP) ( $11,79 \pm .13$ ) como al acortarlo (OP) ( $7,4 \pm .80$ ). La disminución es mas marcada en los animales en OP, existiendo diferencias significativas ( $p < .001$ ) entre estos dos grupos.

Los valores de actividad ICDH practicamente no se modifican en OP ( $37,53 \pm 1.32$ ), descendiendo en los animales sometidos a LP ( $28,99 \pm .79$ ). Existend diferencias significativas ( $p < .001$ ) entre los animales en OP y LP.

La actividad MDH aumenta significativamente ( $p < .01$ ) al acortar (OP) ( $2082.0 \pm 96.94$ ) o prolongar el tiempo de iluminación ( $2024,00 \pm 31,74$ ).

5.1.2. En la corteza la actividad LAP no sufre modificaciones en los animales en LP ( $3,41 \pm .10$ ), encontrándose elevada de forma significativa ( $p < .001$ ) en los

● Hipotálamo

▲ Corteza

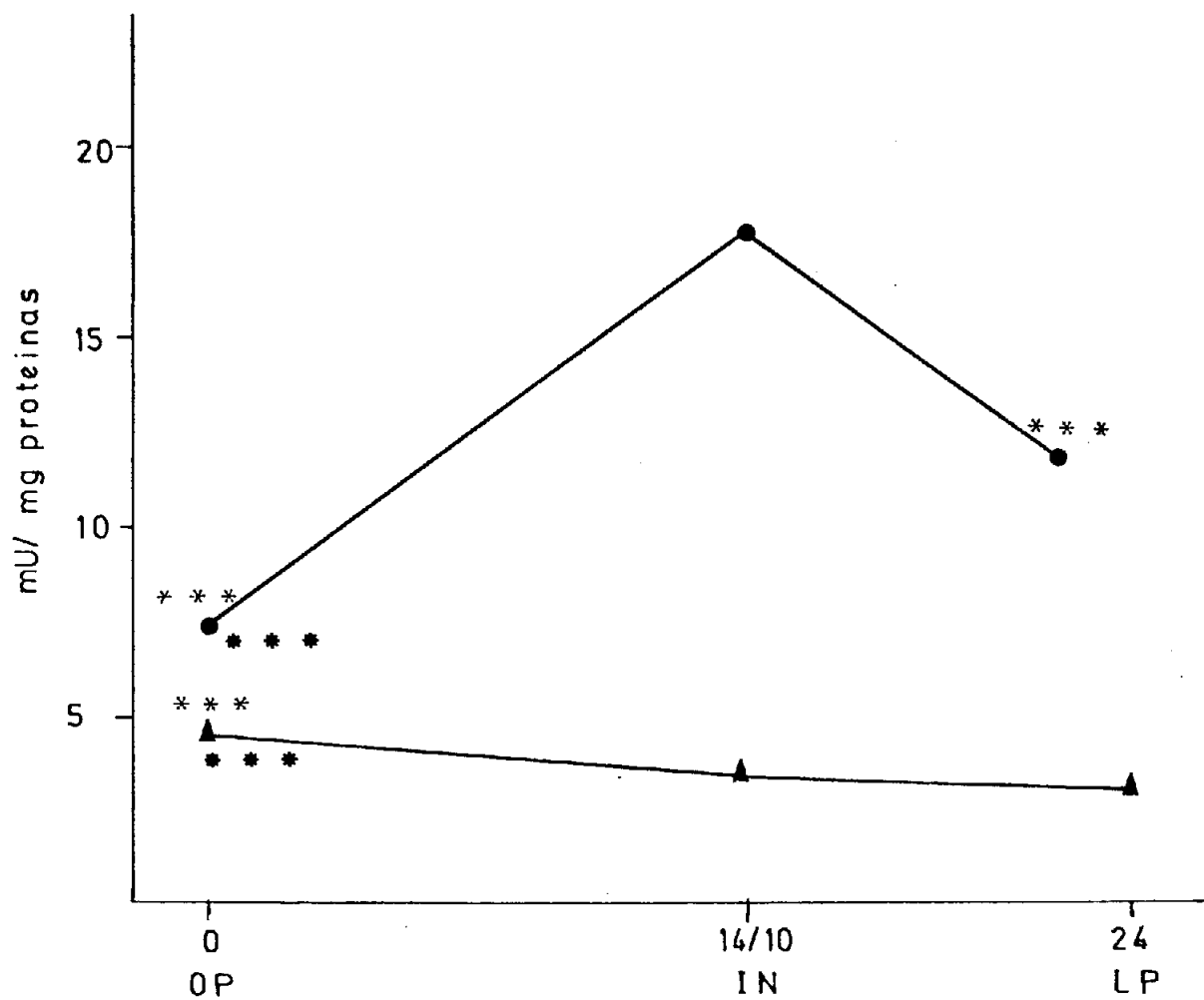


Fig. 9.- Efecto de los fotoperíodos sobre la actividad LAP en animales controles.

\* OP y LP versus IN

• OP versus IP

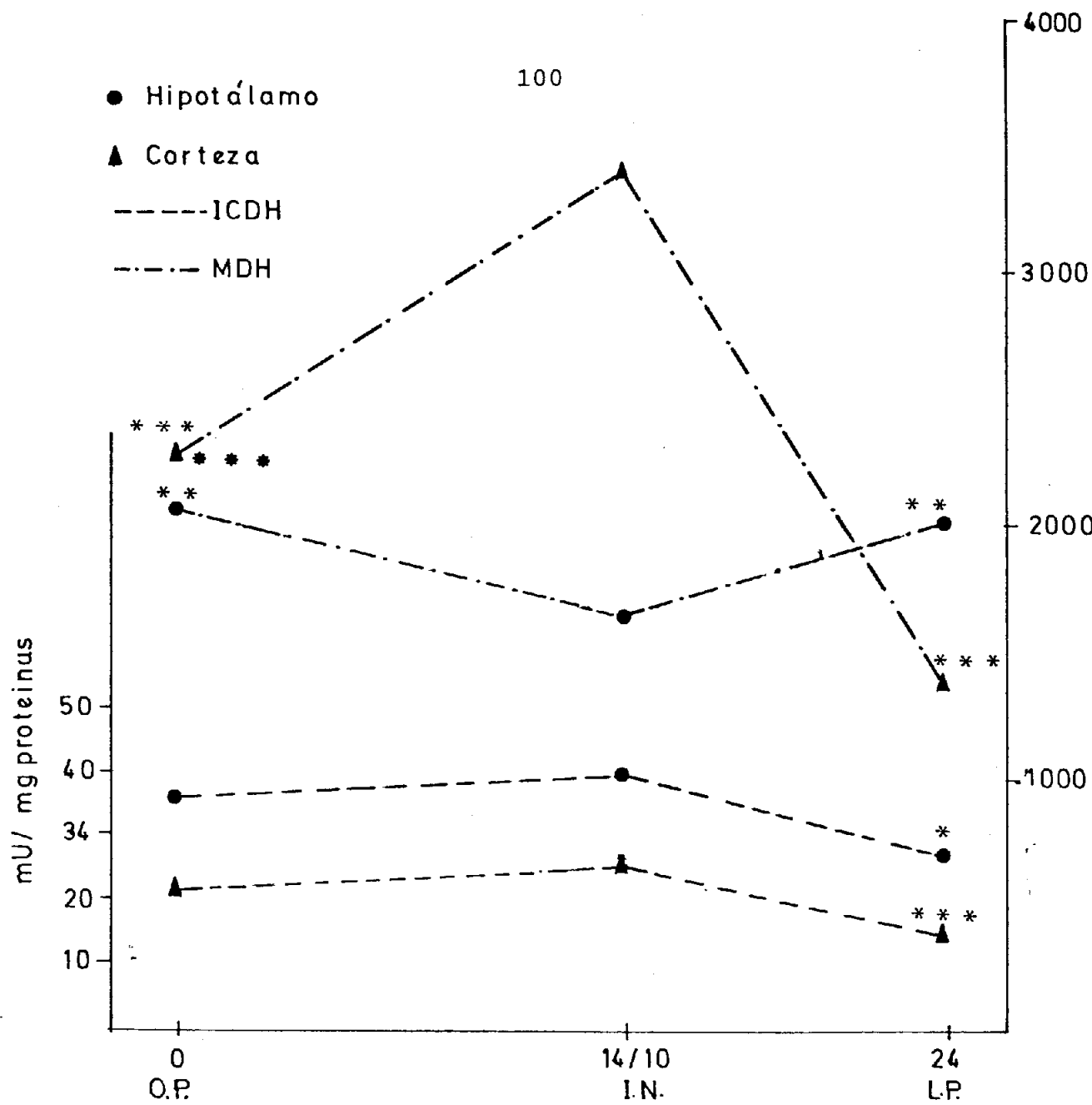


Fig. 10.- Efecto de los fotoperíodos sobre la actividad ICDH y MDH en animales controles.

animales mantenidos en OP (  $4,51 \pm .12$  ), existiendo diferencias también significativas entre los animales en OP y LP (  $p < .001$  ).

La actividad ICDH disminuye significativamente (  $p < .001$  ) en los animales mantenidos en LO (  $16,27 \pm .50$  ).

La actividad MDH disminuye significativamente tanto en los animales en OP como en los LP (  $p < .001$  ). En el grupo de animales en OP los valores (  $2298,00 \pm 44,81$  ) se diferencian significativamente (  $p < .001$  ) de los del grupo de animales en LP (  $1405,0 \pm 57,16$  ).

*En resumen, en hipotálamo cualquier modificación de la duración de los fotoperíodos produce en los animales controles un marcado descenso en la actividad LAP e incremento en la actividad MDH. En corteza la actividad LAP se incrementa en OP y disminuye significativamente la actividad ICDH en LP y la actividad MDH en OP y LP.*

5.2. Animales tratados con valerianato de estradiol (véase figuras 11, y 12 ).

5.2.1. En el hipotálamo la actividad LAP disminuye significativamente (  $p < .001$  ) tanto en los animales en OP (  $13,23 \pm .76$  ) como en los mantenidos en LP (  $10,86 \pm .11$  ) Existen diferencias significativas entre estos dos grupos (  $p < .01$  ).



● Hipotálamo

▲ Corteza

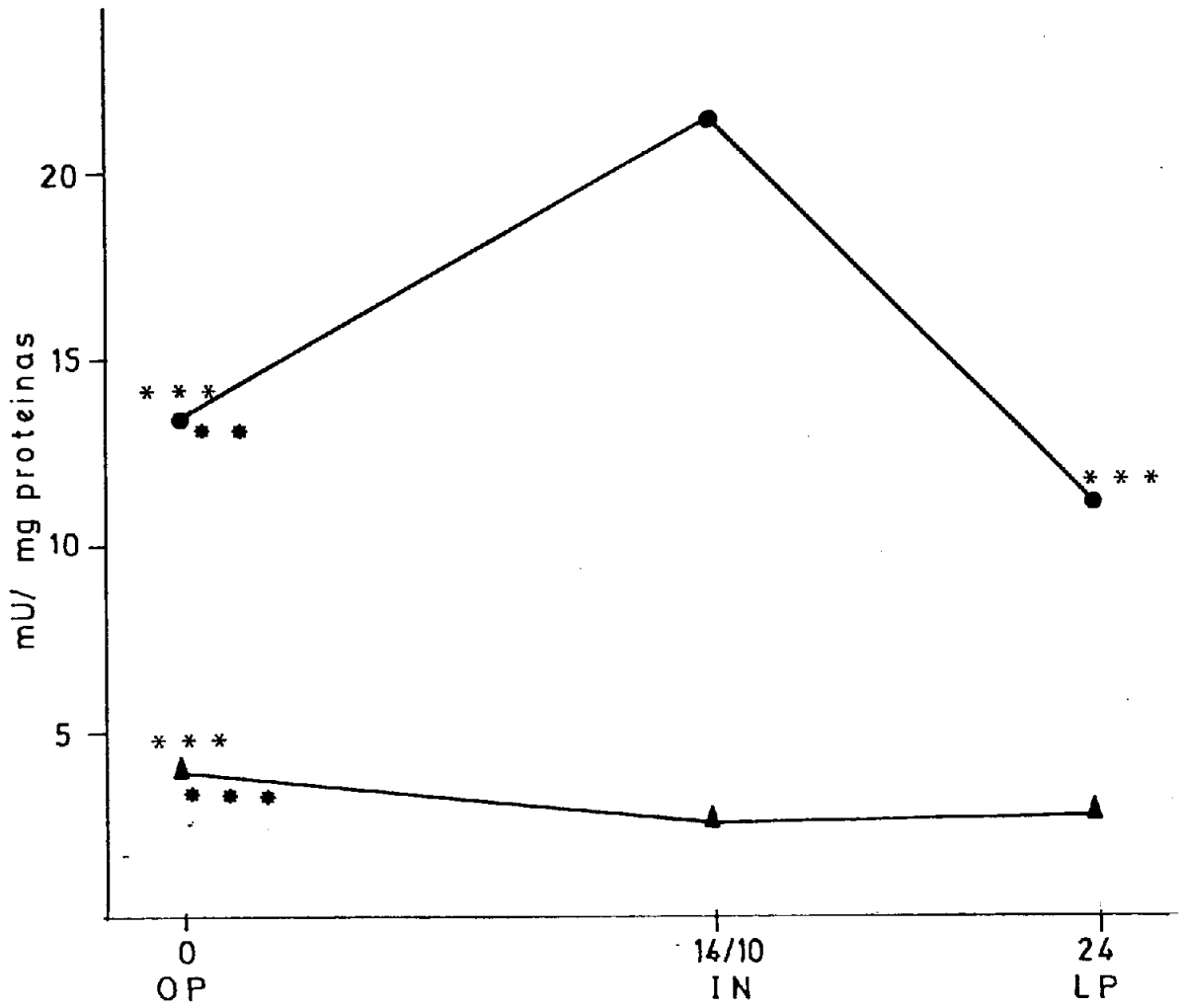


Fig. 11.- Efecto de los fotoperíodos sobre la actividad LAP en animales tratados con valerianato de estradiol (+ VE).

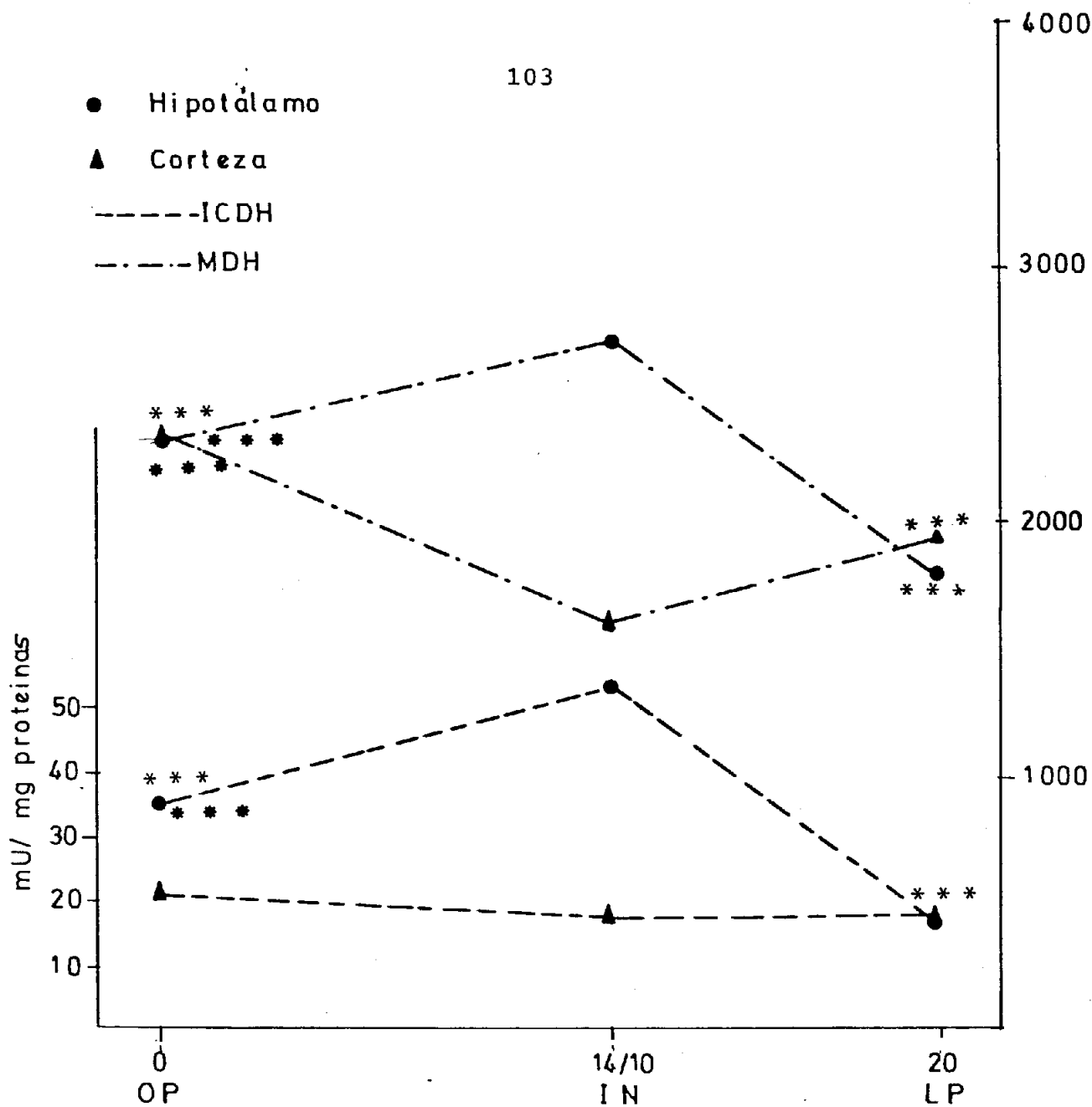


Fig. 12.- Efecto de los fotoperíodos sobre la actividad ICDH y MDH en animales tratados con valerianato de estradiol. (+VE).

La actividad ICDH disminuye significativamente ( $p < .001$ ) por acción de las modificaciones en los fotoperíodos, ya sean estos OP (  $35,66 \pm 1,79$  ) o LP (  $16,61 \pm 1,22$  ). Existen diferencias también significativas ( $p < .001$ ) entre estos dos grupos..

La actividad MDH sufre las mismas modificaciones que la ICDH, disminuye ante cualquier variación en más o en menos, en la duración de los fotoperíodos. En los animales sometidos a OP (  $2312,00 \pm 131,0$  ), el decremento es menos llamativo que en el caso de los mantenidos en LP (  $1816,00 \pm 128,0$  ) valores  $p < .001$ . Existen diferencias significativas entre estos dos grupos ( $p < .001$ ).

5.2.2. En la corteza la actividad LAP aumenta significativamente ( $p < .001$ ) en los animales sometidos a OP (  $3,97 \pm .13$  ) y no se modifica en los mantenidos en LP (  $2,87 \pm .09$  ). Existen diferencias significativas ( $p < .001$ ) entre los animales mantenidos en OP y LP.

La actividad ICDH no sufre modificaciones significativas ni en el grupo de animales en OP ni en el grupo mantenido en LP.

La actividad MDH aumenta significativamente ( $p < .001$ ), sea cual fuere la modificación del fotoperíodo. En los animales en OP (  $2321,00 \pm 44,81$  ), este incremento es más acentuado que en los mantenidos en LP (  $1928,00 \pm 22,27$  ). Existen

diferencias significativas ( $p < .001$ ) entre estos grupos.

En resumen, las modificaciones en los fotoperíodos produce en las ratas tratadas con valerianato de estradiol (+VE) una disminución de la actividad LAO, ICDH y MDH en el hipotálamo, tanto en las circunstancias experimentales de OP como de LP. En la corteza, las modificaciones son menos manifiestas, se aprecia un discreto aumento de actividad LAP en los animales en OP, ausencia de modificaciones significativas en la actividad ICDH y aumento en la actividad MDH tanto en el grupo de animales en OP como en los mantenidos en LP.

### 5.3. Animales castrados (véase figuras 13, y 14)

5.3.1. En el hipotálamo la actividad LAP disminuye significativamente ( $p < .001$ ) tanto en los animales sometidos a OP (  $7,79 \pm .67$  ) como en los mantenidos en LP (  $7,13 \pm .28$  ). No existen diferencias significativas entre estos grupos.

La actividad ICDH, aumenta tanto en los animales en OP (  $41,82 \pm 1.11$  ) ( $p < .001$ ) como en los animales en LP (  $58,70 \pm 1,20$  ) ( $p < .001$ ). Existen diferencias significativas entre estos grupos ( $p < .001$ ).

La actividad MDH, se comporta de forma diferente en el grupo de animales en OP (  $1416,90 \pm 57,60$  ) que en el de los animales en LP (  $3536,60 \pm 62,46$  ), pues mientras el primer

● Hipotálamo

▲ Corteza

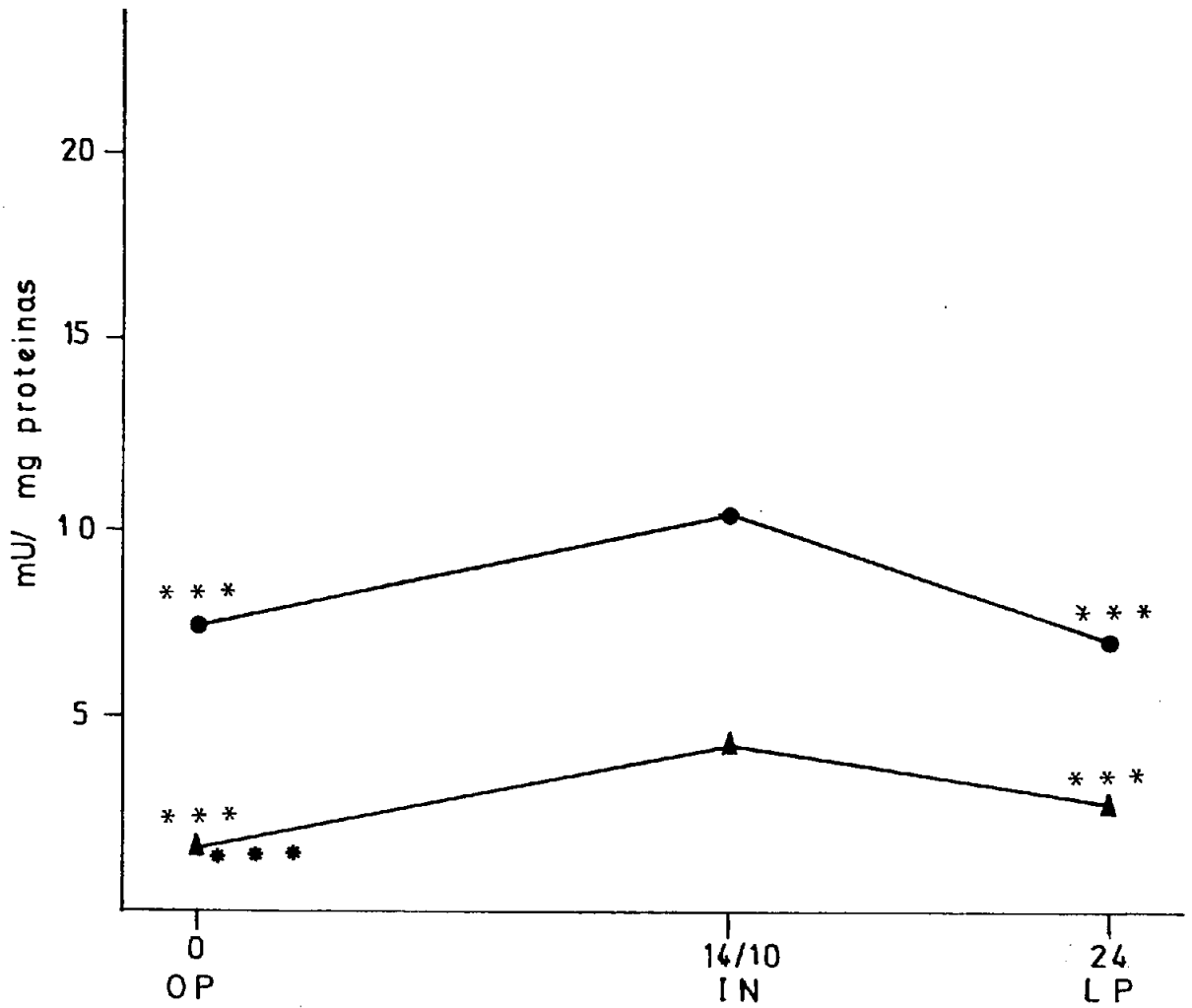


Fig. 13.- Efecto de los fotoperíodos sobre la actividad LAP en animales castrados (6x).

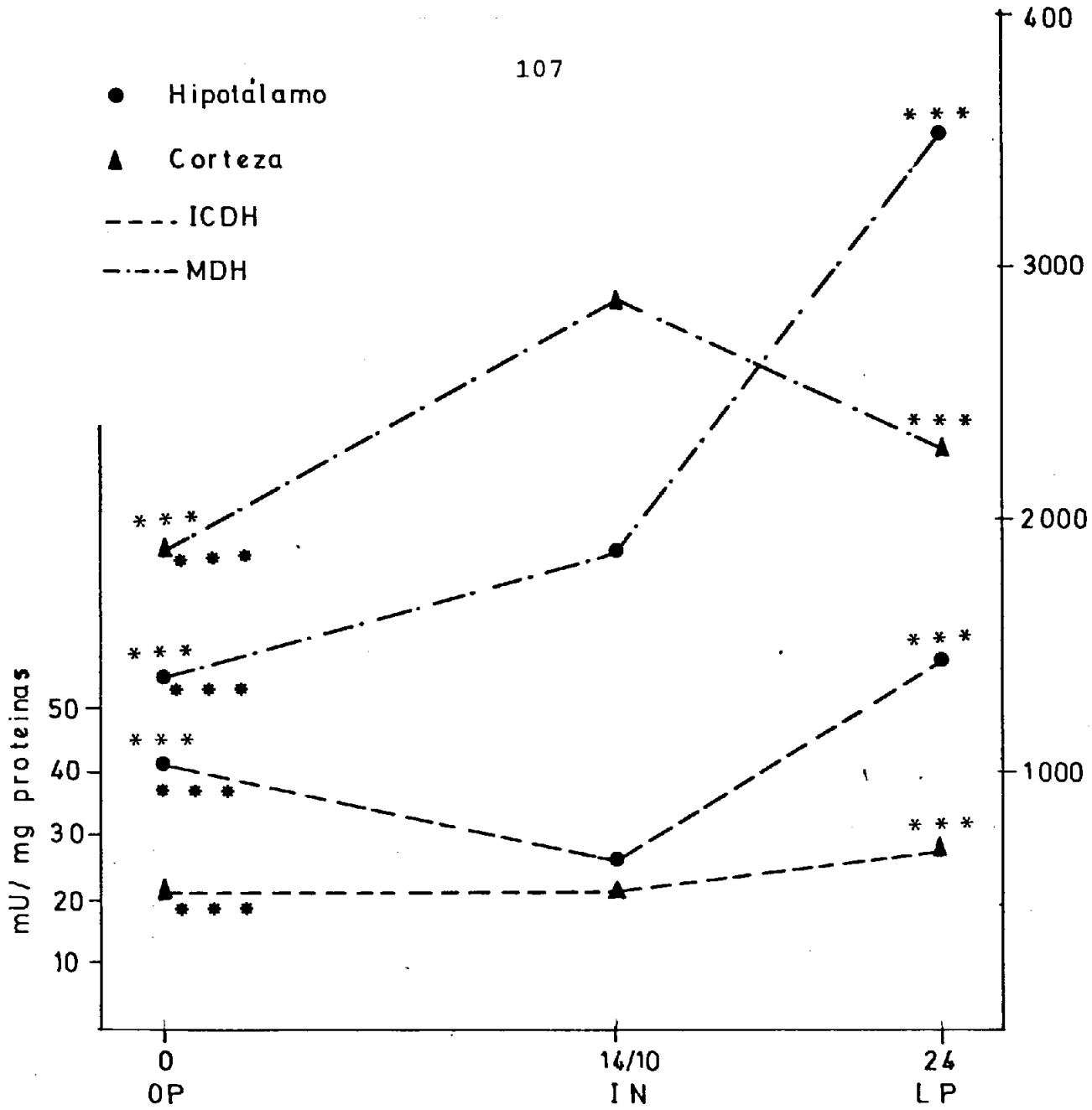


Fig. 14.- Efecto de los fotoperíodos sobre la actividad ICDH y MDH en animales castrados (Gx).



grupo disminuye ( $p < .001$ ), en el segundo aumenta ( $p < .001$ ). Existen diferencias significativas ( $p < .001$ ) entre estos grupos.

5.3.2. En la corteza la actividad LAP disminuye ( $p < .001$ ) tanto en los animales en OP (  $1,72 \pm .60$  ) como en los animales en LP (  $3,02 \pm .12$  ), aunque la disminución es man intensa en los primeros. Existen diferencias significativas ( $p < .001$ ) entre estos grupos.

La actividad ICDH permanece constante tras mantener los animales en OP (  $22.87 \pm .70$  ) y se incrementa significativamente ( $p < .001$ ) en los animales en LP (  $26,67 \pm .76$  ). Existen diferencias significativas entre estos dos grupos ( $p < .001$ ).

La actividad MDH disminuye significativamente ( $p < .001$ ) en el grupo de animales en OP (  $1863,00 \pm 49.07$  ) y en menor cuantía en el grupo de animales en LP (  $2319,00 \pm 57,25$  ). Existen diferencias significativas entre estos dos grupos ( $p < .001$ ).

*En resumen, las modificaciones en los fotoperíodos produce en la rata castrada las siguientes variaciones en la actividad de las enzimas hipotalámicas: LAP disminuye e ICDH aumenta ante cualquier modificación en la duración del fotoperíodo, mientras que MDH disminuye al reducir el tiempo de iluminación y aumenta al prolongarlo. En la corteza la actividad*

LAP sigue el mismo perfil que en el hipotálamo, la actividad ICDH se modifica cuantitativamente poco al cambiar el fotoperíodo, y por último la actividad MDH disminuye tanto al prolongar como al acortar el período de iluminación.

#### 5.4. Animales castrados y tratados con valerianato de estradiol (véase figuras 15, y 16)

5.4.1. En el hipotálamo no se aprecian modificaciones en la actividad LAP ni en los animales en OP (  $11,89 \pm .34$  ) ni en los animales en LP (  $11,31 \pm .31$  ).

Tampoco existen variaciones significativas entre la actividad ICDH de los animales en LP (  $23,48 \pm 1.05$  ) ni en los animales en OP (  $31,87 \pm 1,94$  ), aunque en este último grupo hay una tendencia al aumento.

La actividad MDH no se modifica significativamente ni al acortar el período de iluminación, OP (  $2255,00 \pm 114,0$  ), ni al prolongarlo, LP (  $2698,00 \pm 119,0$  ).

5.4.2. En la corteza la actividad LAP sigue el mismo perfil que en el hipotálamo, no varía cualquiera que sea la modificación que realicemos en el período de iluminación, OP (  $3,41 \pm .07$  ) y LP (  $3,50 \pm .11$  ).

La actividad ICDH aumenta, aunque sin significatividad estadística, en los animales en OP (  $25,24 \pm 3,31$  ) y disminuye en los animales en LP (  $16,70 \pm .19$  ) (  $p < .001$  ).



● Hipotálamo

▲ Corteza

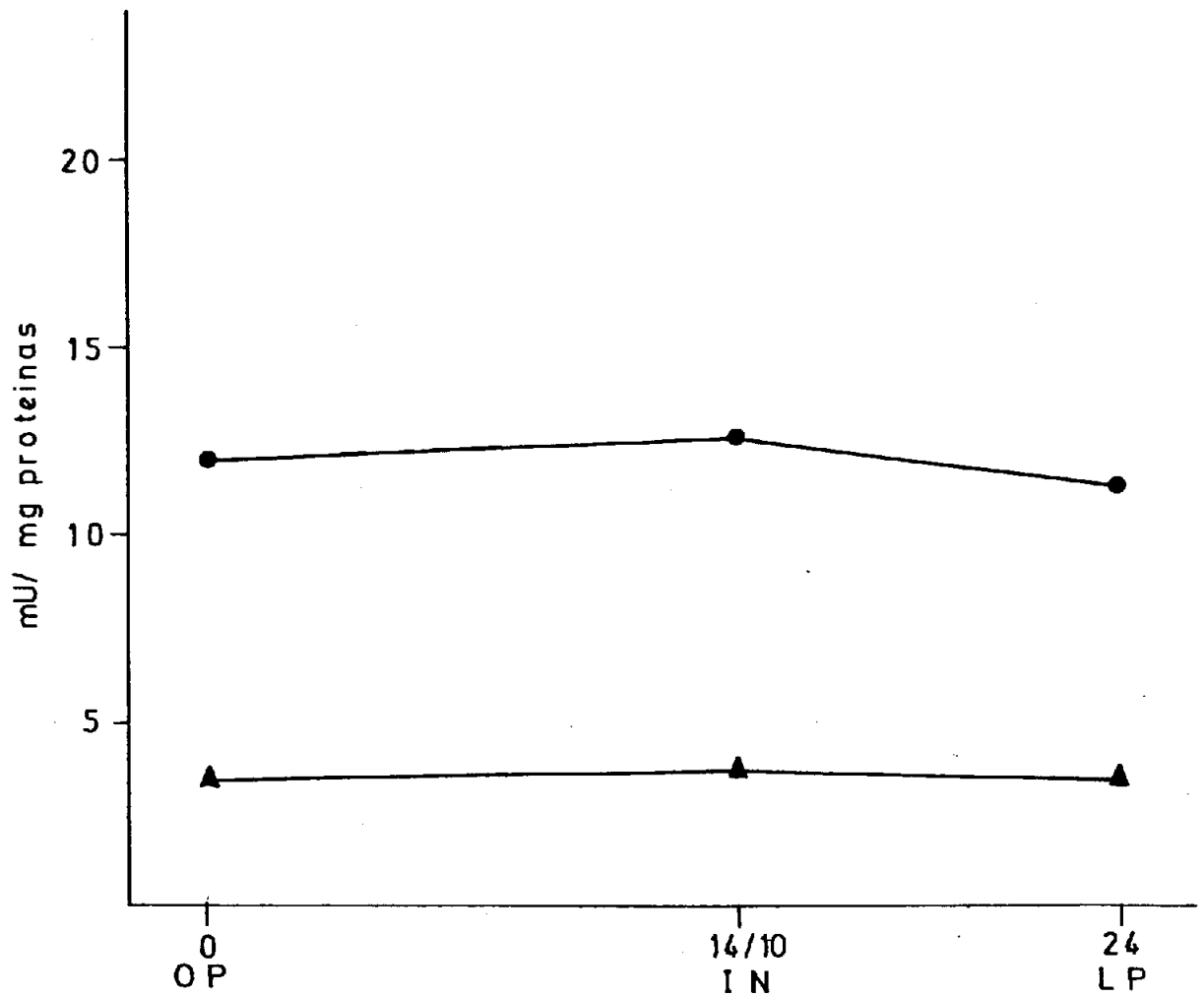


Fig. 15.- Efecto de los fotoperíodos sobre la actividad LAP en animales castrados y tratados con valerianato de estradiol (Gx+VE).

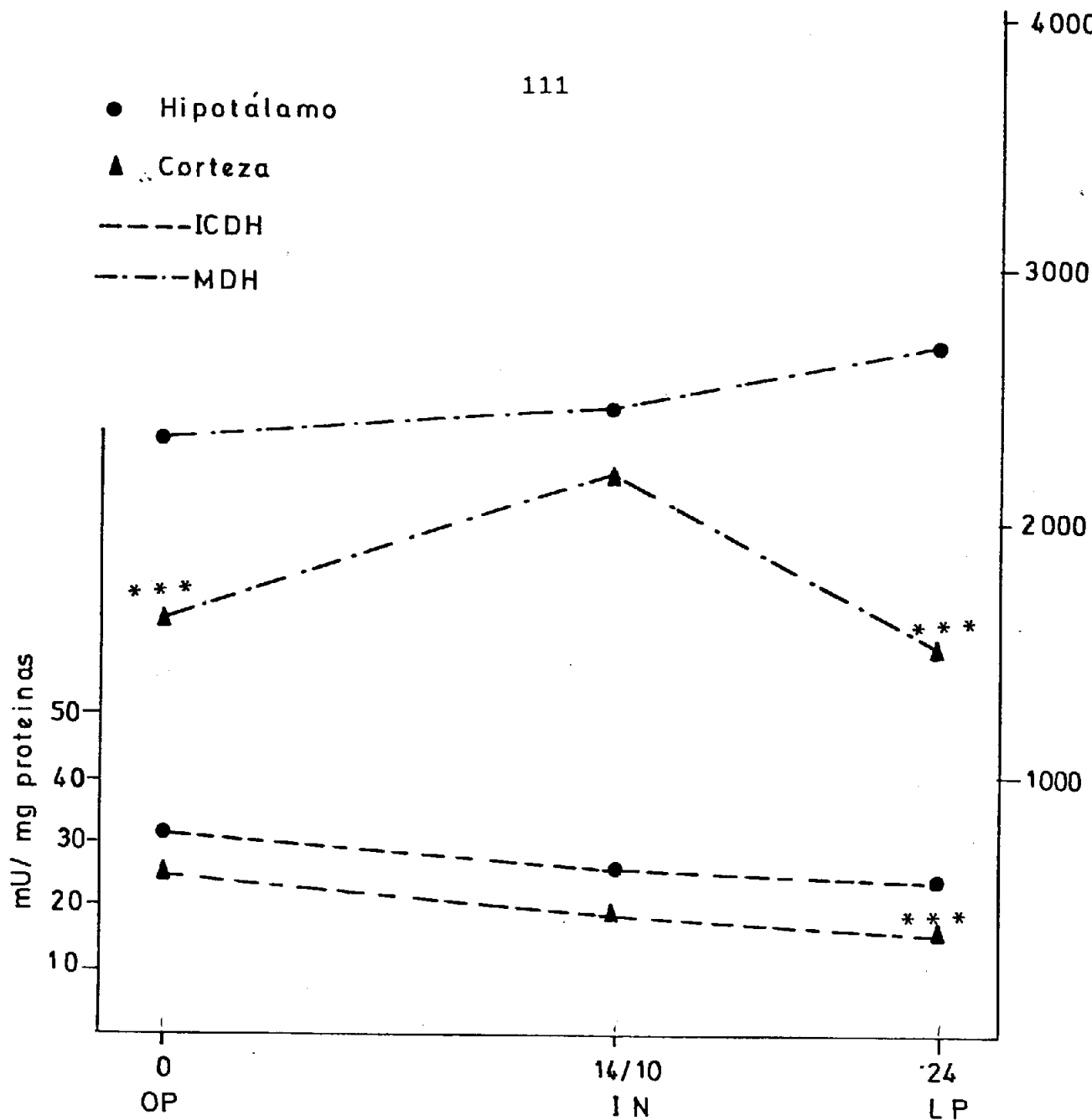


Fig. 16.- Efecto de los fotoperíodos sobre la actividad ICDH y MDH en animales castrados y tratados con valerianato de estradiol (6x+ VE).

En cuanto a la actividad MDH se aprecia una disminución significativa ( $p < .001$ ) al modificar en mas o en menos la duración del período de iluminación, OP (  $1630.00 \pm 27,32$  ), LP (  $1530.00 \pm 38,20$  ).

*En resumen los cambios en el período de iluminación no produce en las ratas caastradas + VE ninguna modificación en la actividad LAP, ICDH y MDH en hipotálamo. En corteza solo la actividad MDH disminuye de forma apreciable ante cualquier modificación del fotoperíodo.*

## 6. MODULACION POR LOS FOTOPERIODOS, OP Y LP, DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE ESTRADIOL Y CASTRACION

6.1. Administración de valerianato de estradiol (véase figuras 17, 18, 19, y 20)

6.1.1. En el hipotálamo la administración de VE incrementa la actividad LAP en los animales C y en los sometidos a OP, especialmente en estos últimos, donde el incremento alcanza el valor del 179%, mientras que lo disminuye en los animales mantenidos en LP.

La actividad ICDH aumenta por la acción del VE en los animales C y disminuye en los animales en LP. La actividad MDH presenta el mismo comportamiento que la LAP.

6.1.2. En la corteza , trás la administración de VE, la actividad LAP disminuye en los tres tipos de fotope-

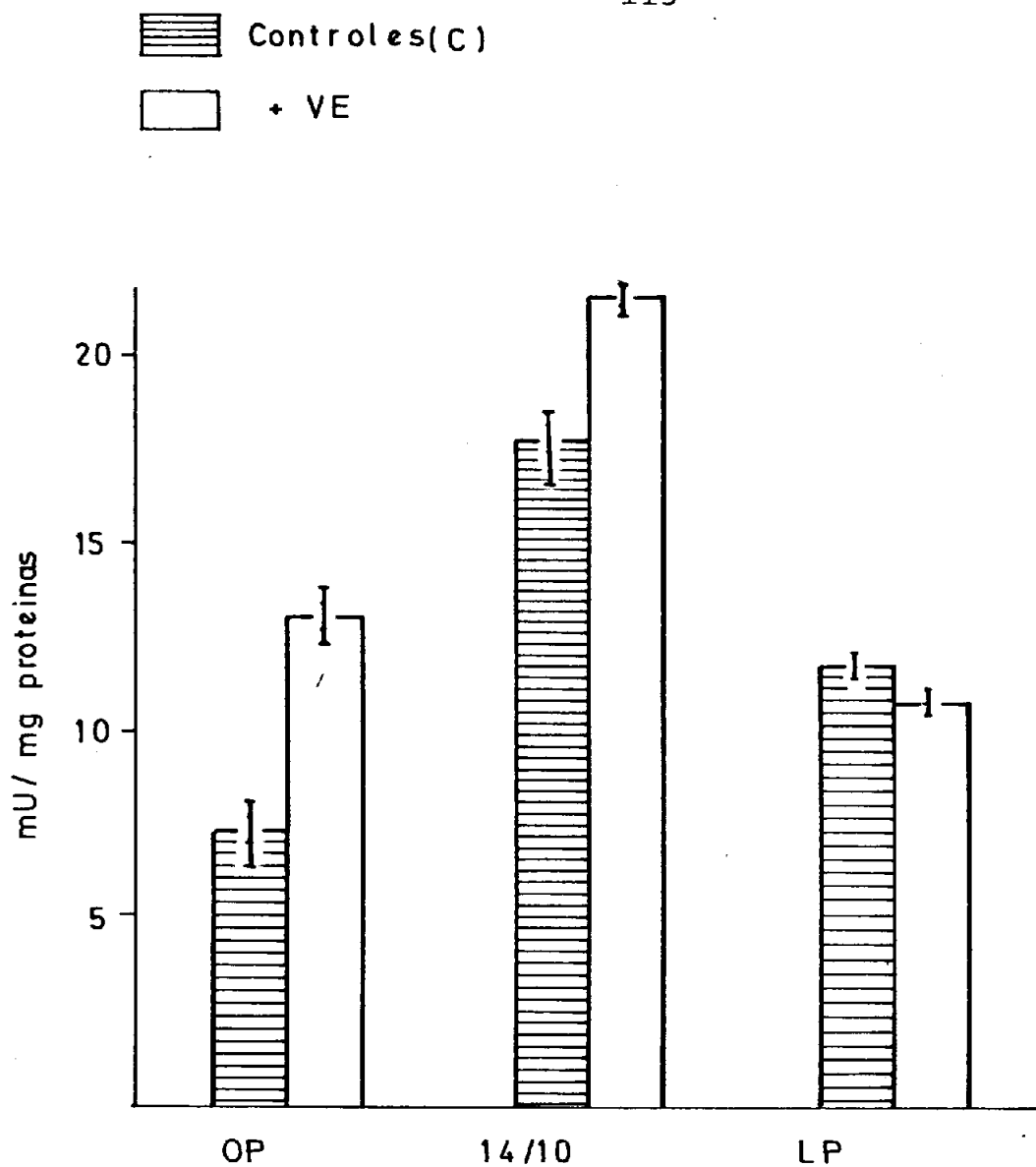


Fig. 17.- Efectos, según los fotoperíodos, de la administración de valerianato de estradiol (+VE) sobre la actividad LAP de hipotálamo

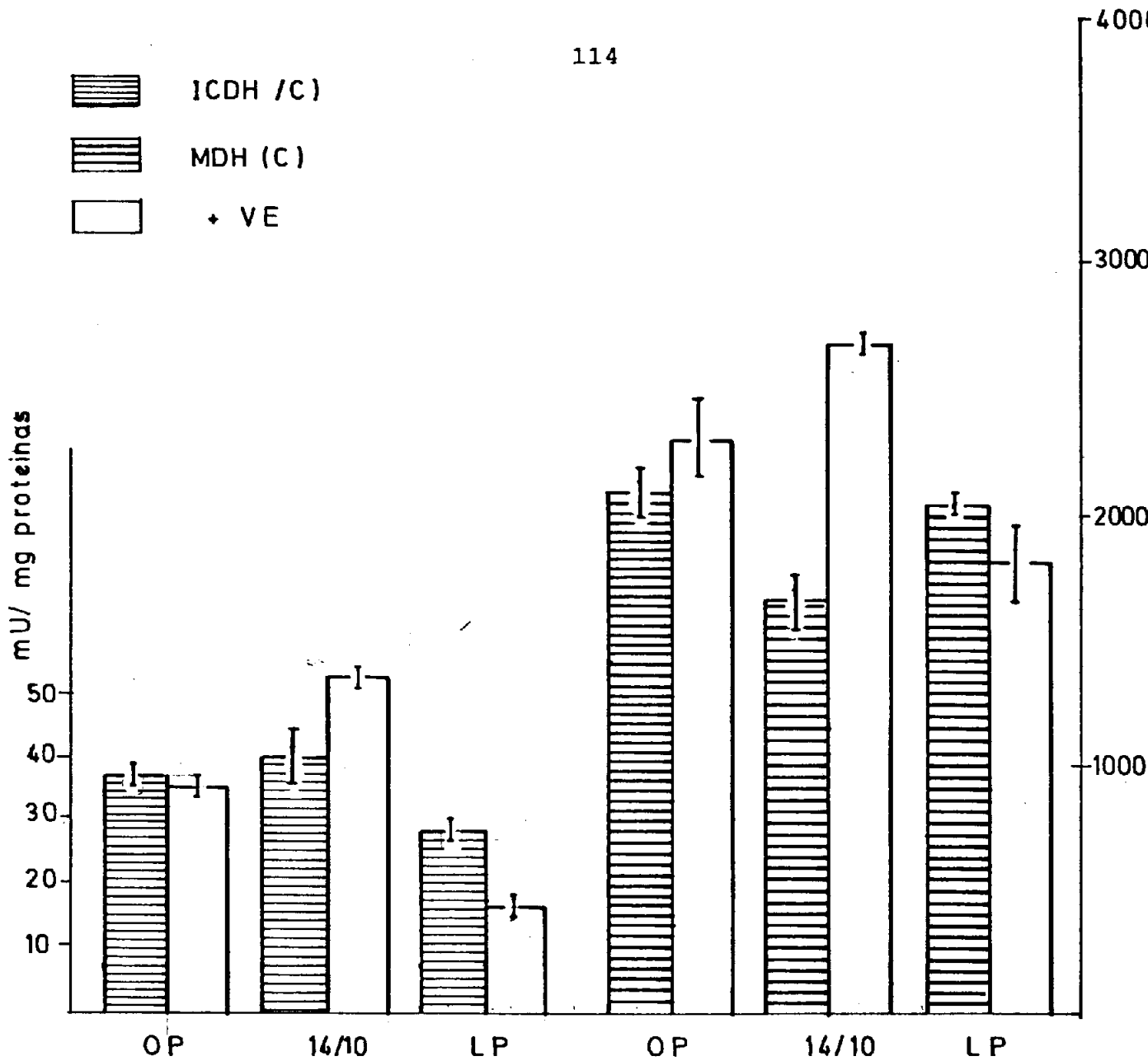


Fig- 18.- Efectos, según los fotoperíodos, de la administración de valerianato de estradiol(+VE) sobre la actividad ICDH y MDH de hipotálamo.

▨ Controles (C)

□ + VE

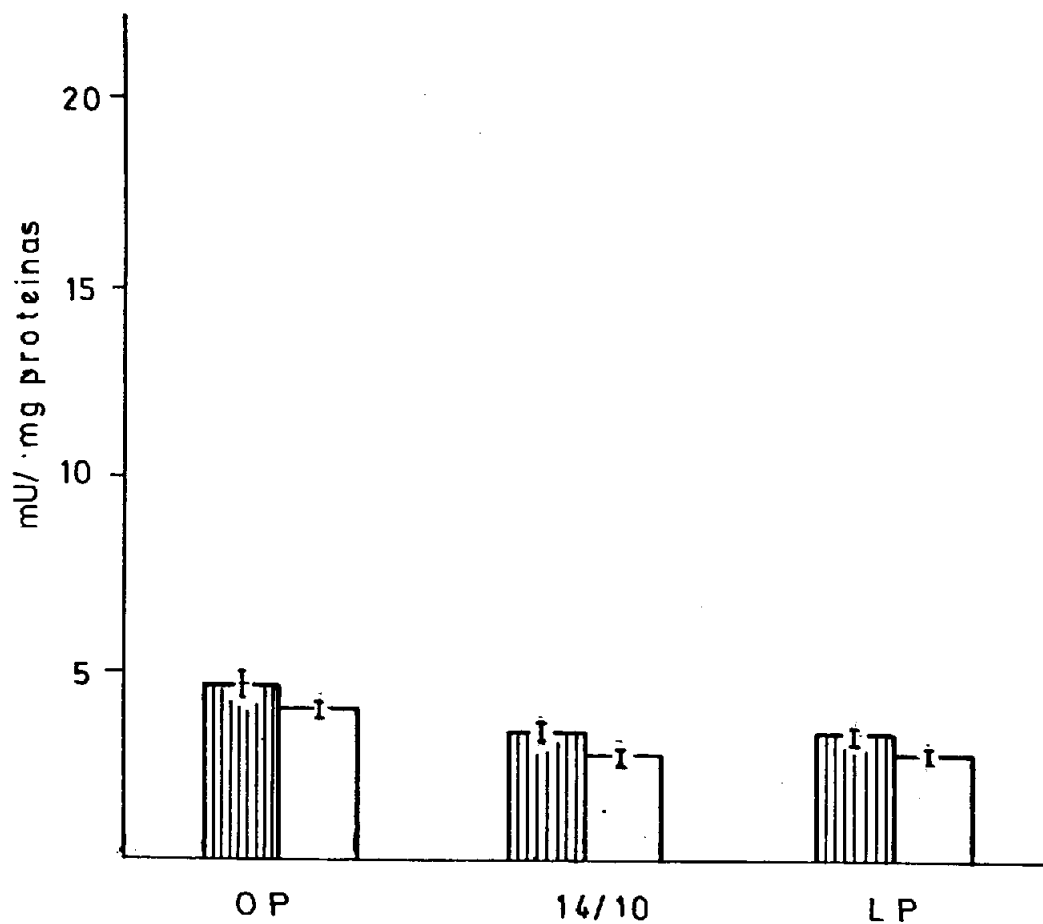


Fig. 19.- Efectos, según los fotoperíodos, de la administración de valerianato de estradiol(+VE) sobre la actividad LAP de corteza

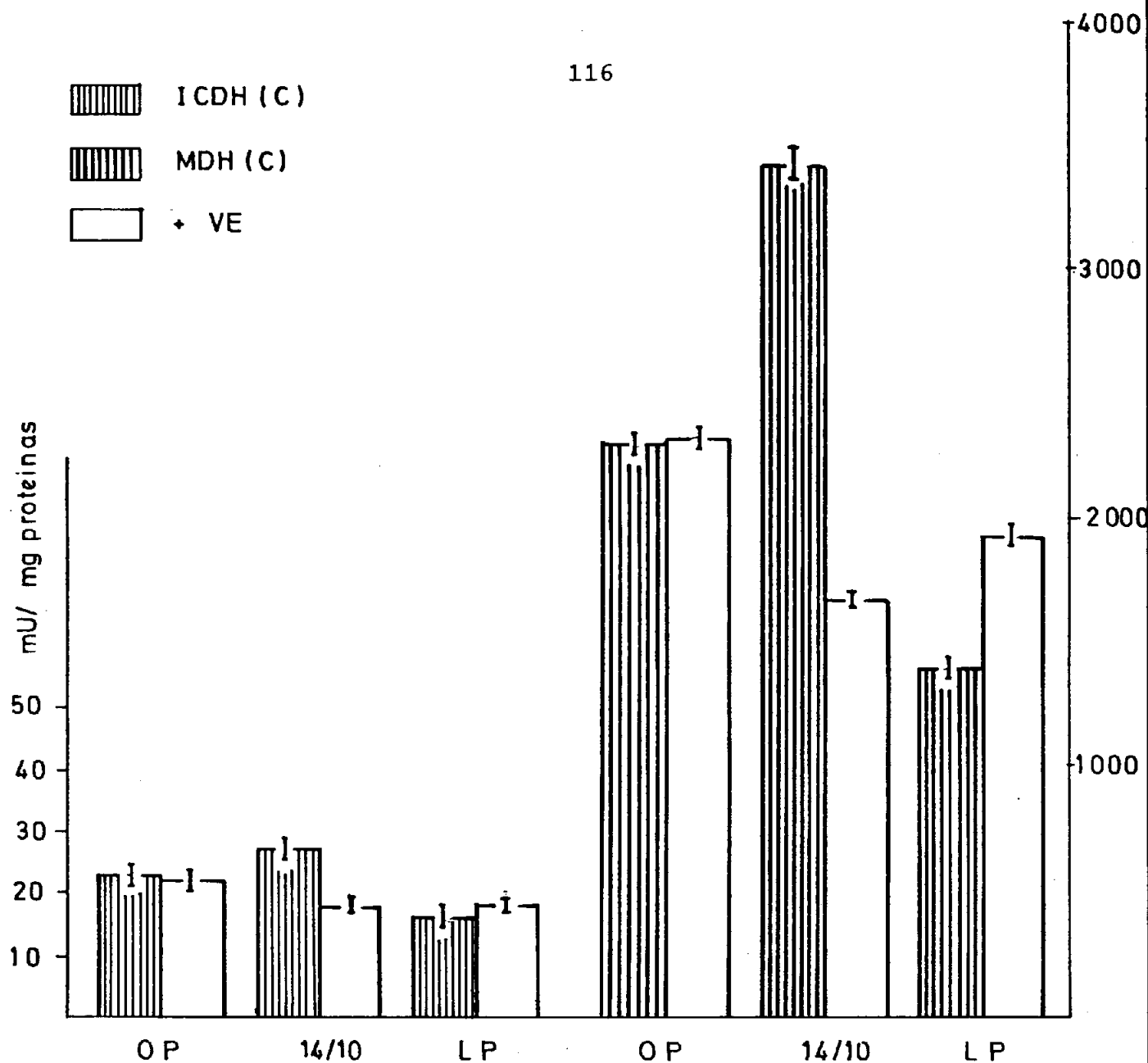


Fig. 20.- Efectos, según los fotoperíodos, de la administración de valerianato de estradiol (+VE) sobre la actividad ICDH y MDH de corteza.

ríodos explorados.

La actividad ICDH solamente varía en el grupo C, y la MDH no se modifica en los animales sometidos a OP, y lo hacen de forma inversa, disminuyendo en un 53% en los animales C y aumentando en un 37% en los animales sometidos a LP.

*En resumen, la administración de VE produce efectos distintos sobre la actividad enzimática hipotalámica y cortical, según las características del fotoperíodo a que el animal se encuentre sometido. Destaca de forma especial, el incremento que sufre la actividad LAP en el hipotálamo en los animales en OP y la ausencia de modificaciones de la actividad enzimática LAP e ICDH en la corteza, junto con las modificaciones de signo opuesto en la actividad MDH cortical, según la duración del período de iluminación del fotoperíodo.*

## 6.2. Castración (véase figuras 21, 22, 23, y 24).

6.2.1. En el hipotálamo la castración disminuye en un 40% la actividad LAP tanto en el grupo IN como en el sometido a LP, pero no varía su actividad en el grupo de animales en OP.

La actividad ICDH disminuye en un 34% tras la castración en los animales mantenidos en IN, pero aumenta en un 11% en los animales en OP y en un 102% en los sometidos a LP.

La actividad MDH que se incrementa en un 14% tras la



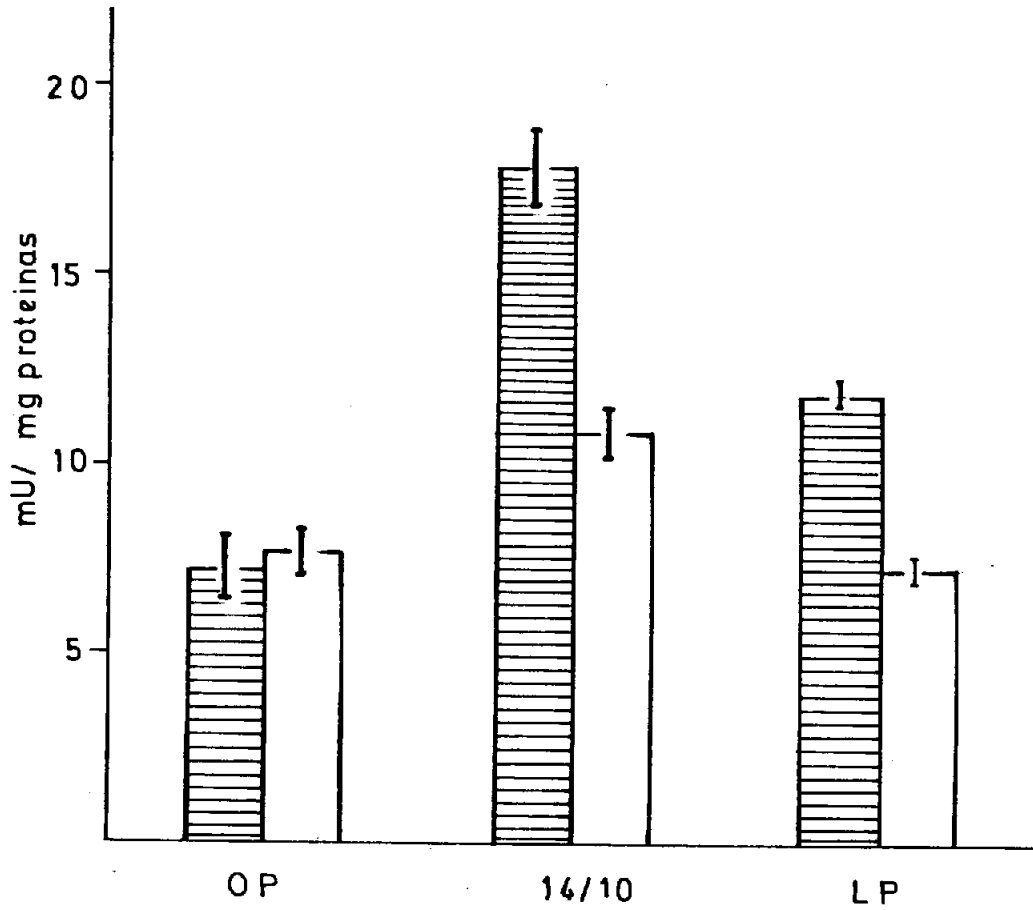
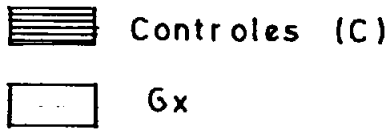


Fig. 21.- Efectos, según los fotoperíodos, de la castración (Gx) sobre la actividad LAP de hipotálamo

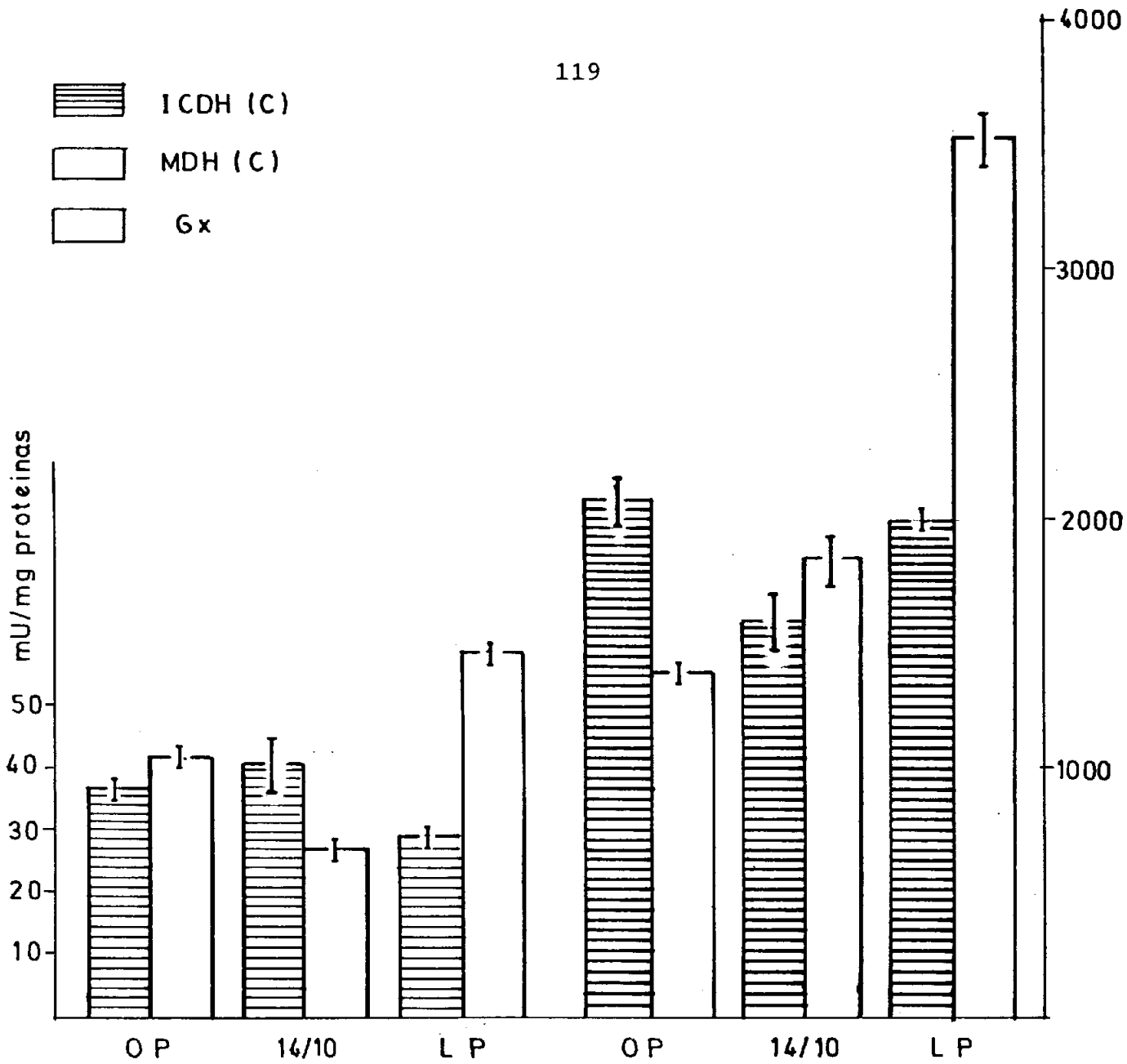


Fig. 22.- Efectos, según los fotoperíodos, de la castración (Gx) sobre la actividad ICDH y MDH de hipotálamo.

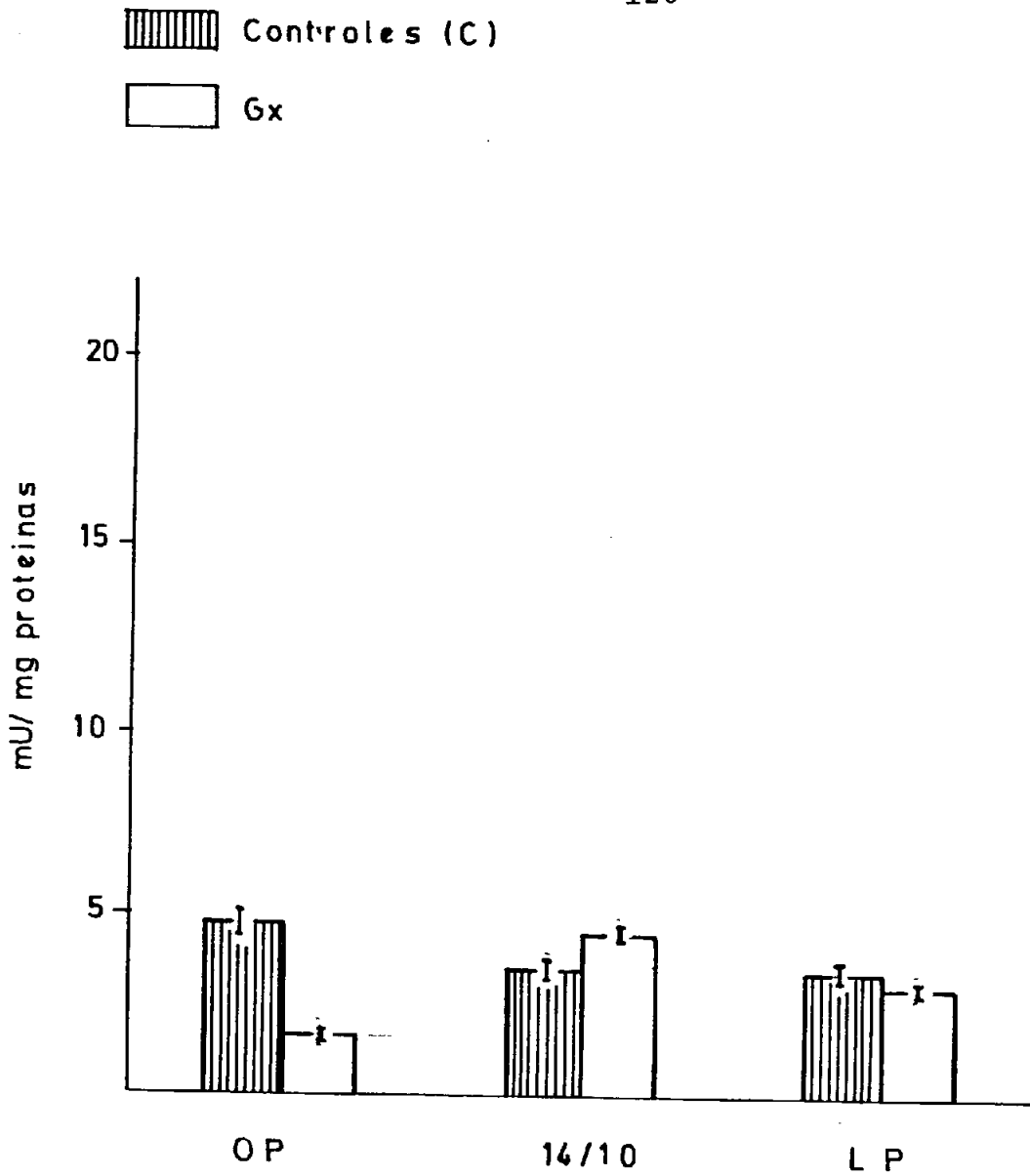


Fig. 23.- Efectos, según los fotoperíodos, de la castración sobre la actividad LAP de corteza

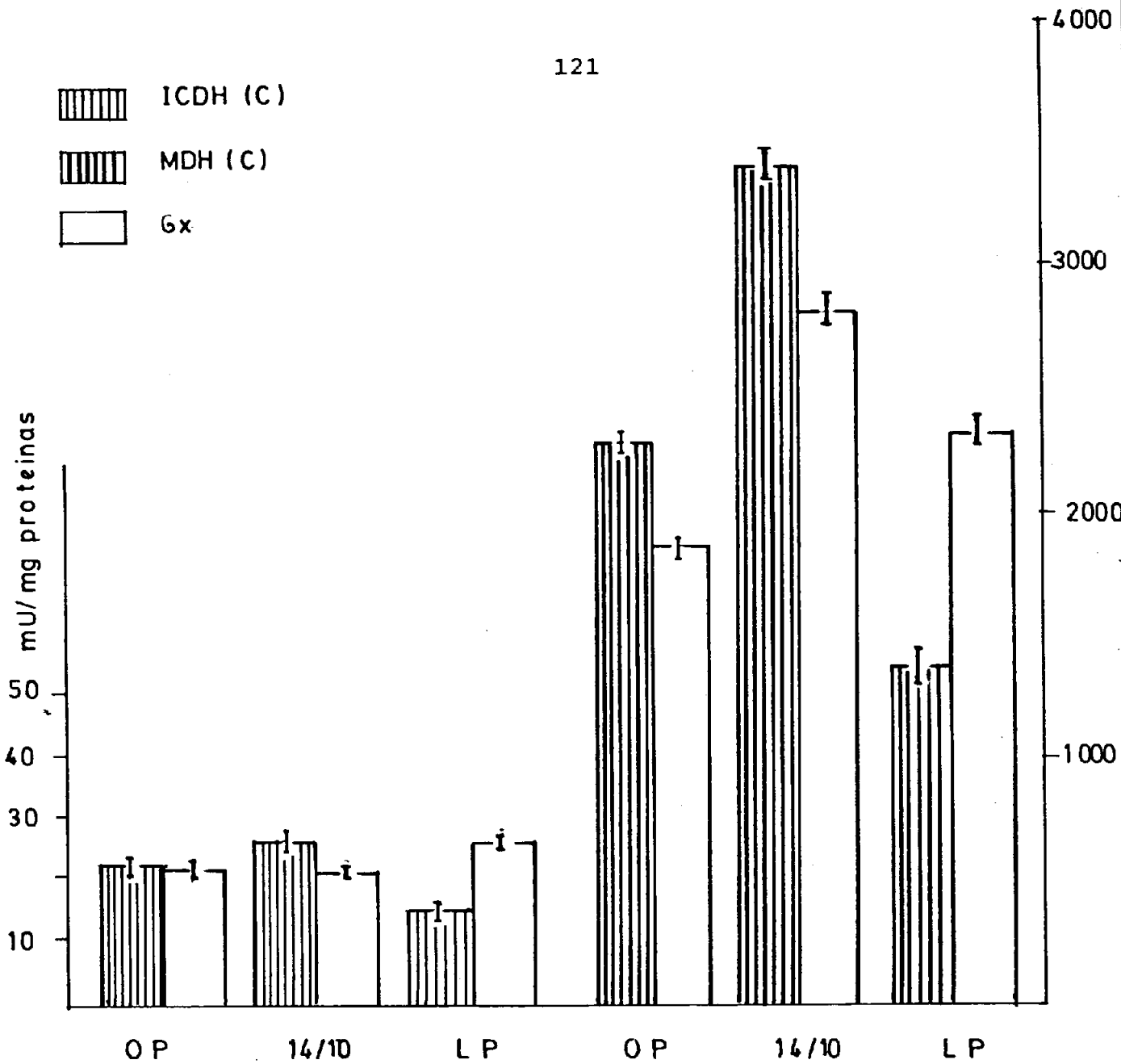


Fig. 24.- Efectos, según los fotoperíodos, de la castración sobre la actividad ICDH y MDH de corteza.

castración , en los animales en IN, disminuye en un 25% en los animales en OP y se incrementa en un 87,5% en los sometidos a LP.

6.2.2. En la corteza la actividad LAP disminuye en un 62% en el grupo de animales en OP, permaneciendo sin variaciones importantes en los demás grupos.

La actividad ICDH disminuye en el grupo mantenido en IN en un 18%, aumenta en un 82% en el grupo de animales en LP y permanece constante en el grupo de animales en OP.

La actividad MDH disminuye tras la castración en la corteza de ratas en OP en un 19%, y en un 17% en las mantenidas en IN, aumentando en un 64% en el grupo de animales en LP.

*En resumen, la castración modifica la actividad enzimática de hipotálamo y corteza, de forma diferente, dependiendo de las características del fotoperíodo en que el animal se encuentre. Destacan la disminución en la actividad LAP hipotálamica en los animales en IN y en LP, y el aumento de ICDH en ratas mantenidas en LP. En la corteza, junto a la disminución de actividad LAP en los animales en OP, se aprecia un aumento considerable de la actividad MDH en los animales en LP.*

6.3. Administración de valerianato de estradiol en animales castrados (véase figuras 25, 26, 27, y 28).

6.3.1. En el hipotálamo aumenta la actividad LAP

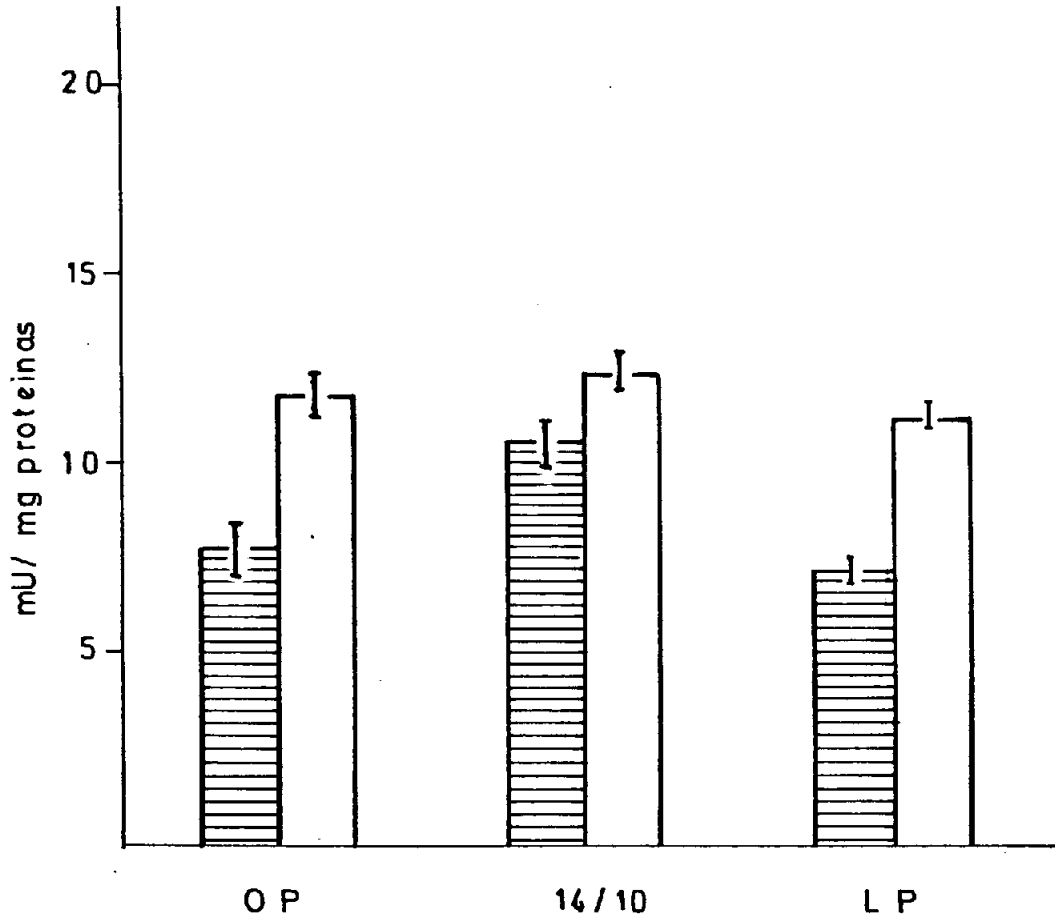
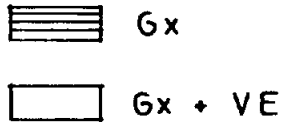


Fig. 25.- Efectos, según los fotoperíodos, de la administración de valerianato de estradiol sobre la actividad LAP de hipotálamo en animales castrados.

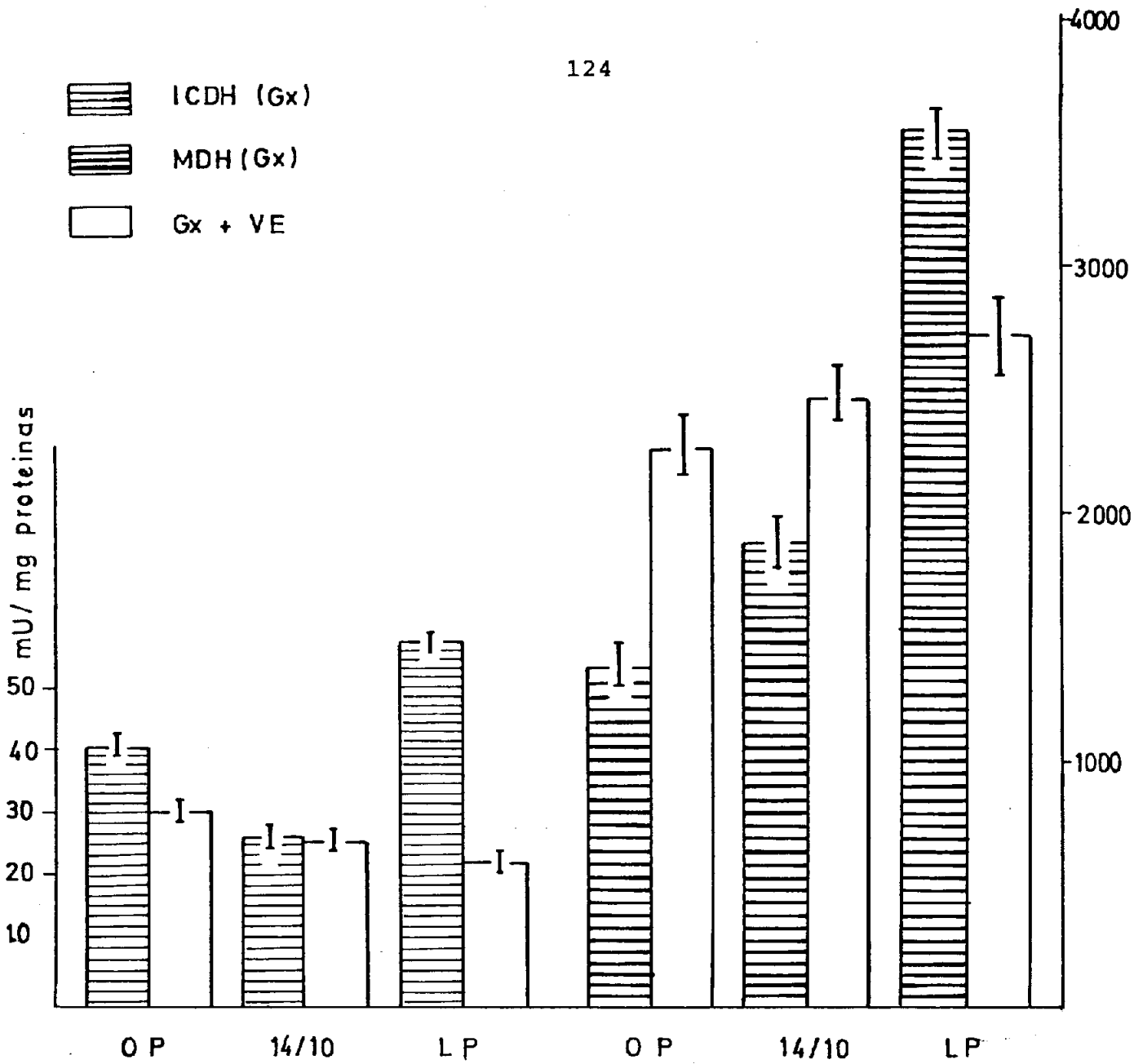


Fig. 26.- Efectos, según los fotoperíodos, de la administración de valerianato de estradiol sobre la actividad ICDH y MDH de hipotálamo en animales castrados.

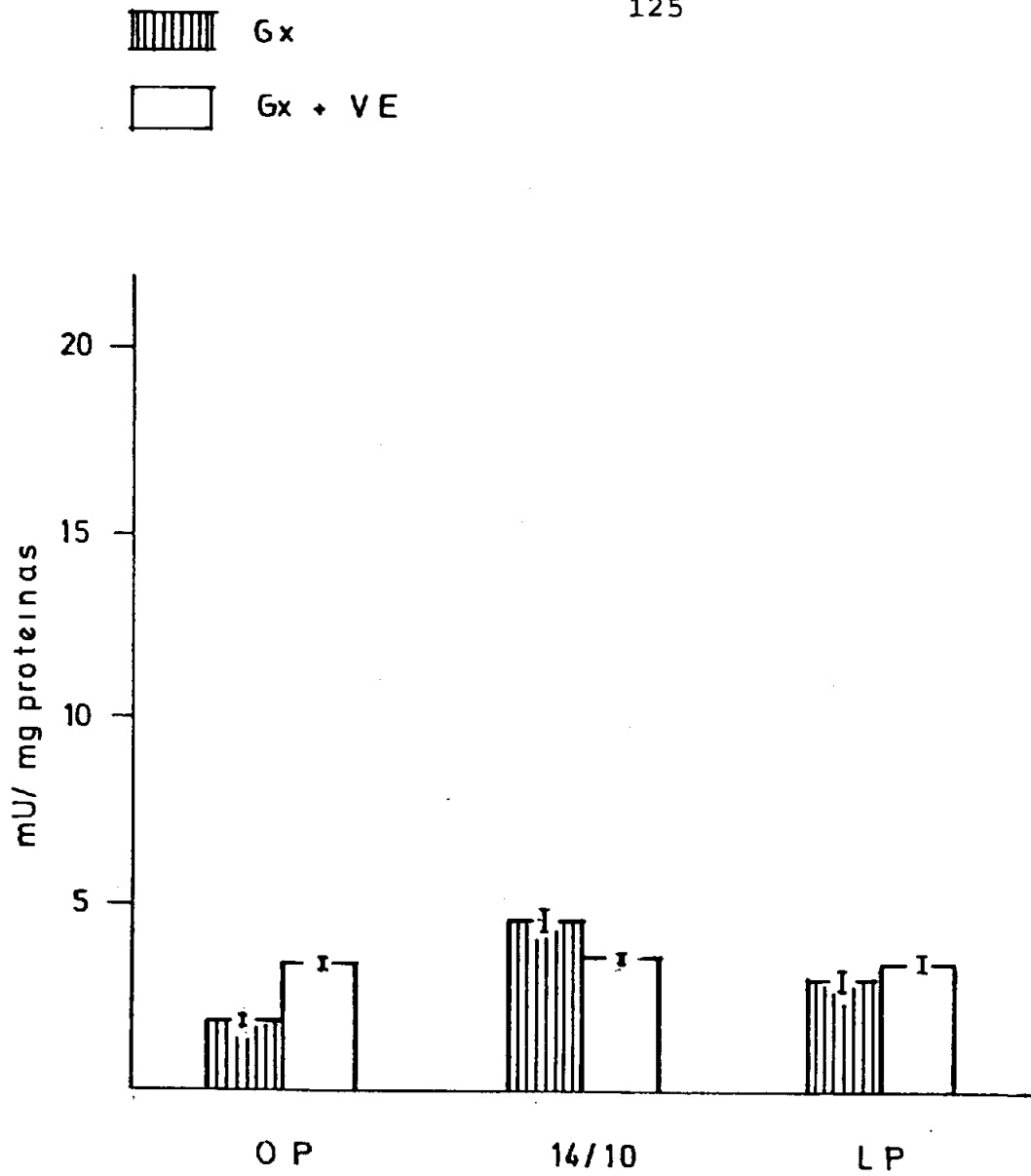


Fig. 27.- Efectos, según los fotoperíodos, de la administración de valerianato de estradiol sobre la actividad LAP de corteza en animales castrados.



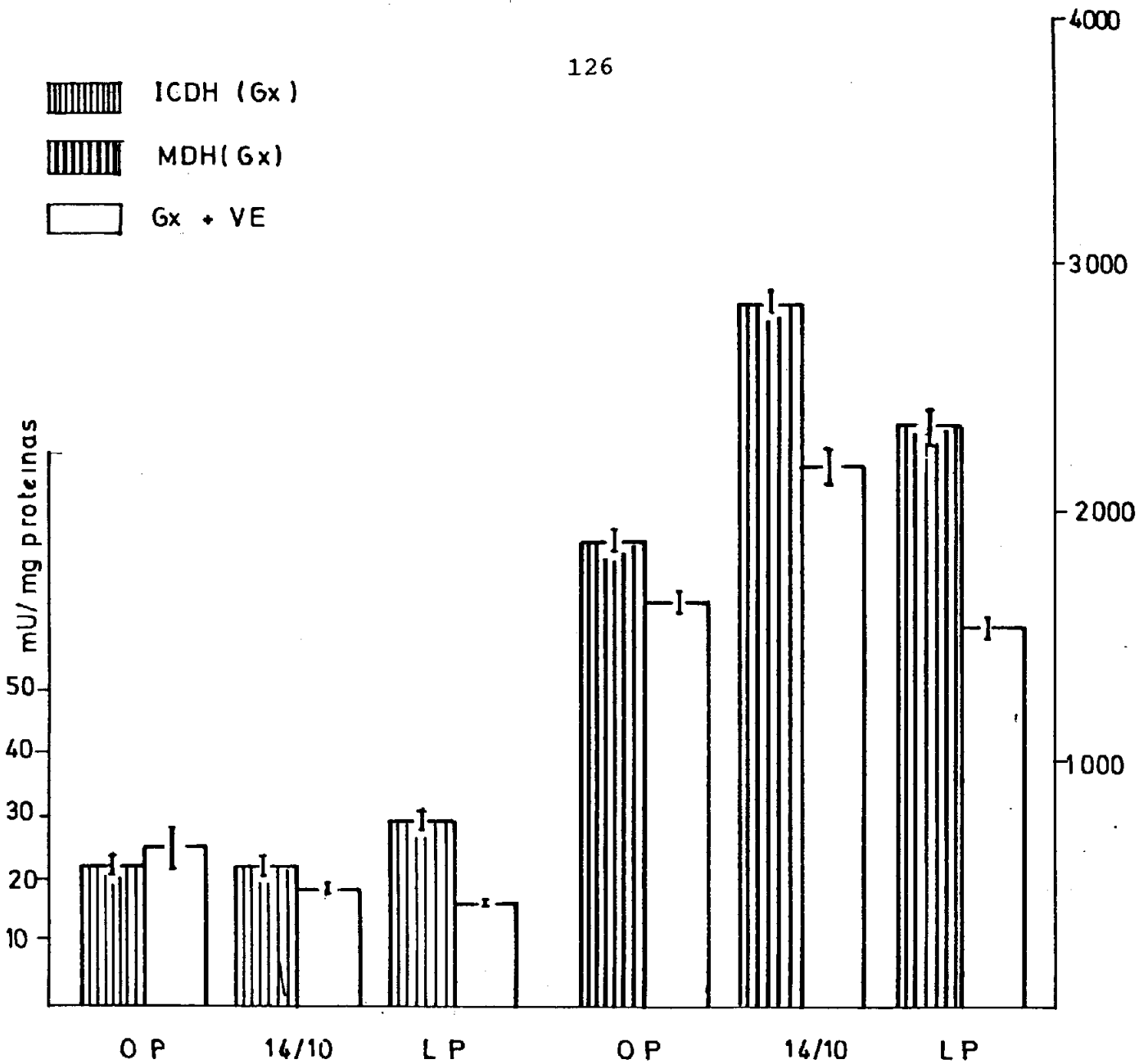


Fig. 28.- Efectos, según los fotoperíodos, de la administración de valerianato de estradiol sobre la actividad ICDH y MDH de corteza en animales castrados.

en los tres fotoperíodos explorados, IN, OP y LP, siendo más manifiesto este incremento en los animales en OP y LP, donde alcanza valores del 52 y 58% respectivamente.

La actividad ICDH disminuye especialmente en los animales en LP, en los que la disminución represente un 60%.

La actividad MDH aumenta en los animales en OP (59%) y en los de IN (31%), disminuyendo en el grupo de animales en LP (24%).

6.3.2. En la corteza la actividad LAP, aumenta tanto en los animales en OP, como en los mantenidos en LP, especialmente en el primer grupo, donde el incremento alcanza un 98%.

La actividad ICDH disminuye en un 42% solo en el grupo de animales en LP.

La actividad MDH, desciende en los tres fotoperíodos explorados, preferentemente en los animales en LP, donde este descenso alcanza un valor de 34%.

*En resumen, el efecto del valerianato de estradiol sobre la actividad enzimática de hipotálamo y corteza de ratas castradas, varía con las modificaciones en el período de iluminación en el que los animales se encuentren. Destaca el comportamiento homogéneo de la actividad LAP en hipotálamo y de la MDH en corteza.*

6.4. Castración en animales tratados con valerianato de estradiol (véase figuras 29, 30, 31, y 32).

6.4.1. En el hipotálamo la actividad LAP disminuye tanto en el grupo de animales en OP como en los mantenidos en IN, especialmente en estos últimos (43%), permaneciendo in variable en los animales en LP.

La actividad ICDH no varía en los animales en OP, disminuye en un 51% en los IN y aumenta en un 41% en los animales mantenidos en LP.

La actividad MDH se incrementa solamente en un 48% en el grupo de animales en LP.

6.4.2. En la corteza la actividad LAP se incrementa en un 31% en los animales en IN y en un 22% en los anima-les en LP, permanenciando constante en los animales en OP.

La actividad ICDH no se modifica en ninguno de los foto-períodos.

La actividad MDH se eleva en un 33% en el grupo manteni-do en IN y desciende tanto en los animales en OP (30%) como en los LP (21%).

*En resumen la castración produce efectos distintos sobre la actividad enzimática hipotalámica y cortical según el foto-período en que el animal +VE se encuentre. Destaca sobre todo la disminución de la actividad LAP en hipotálamo de animales*

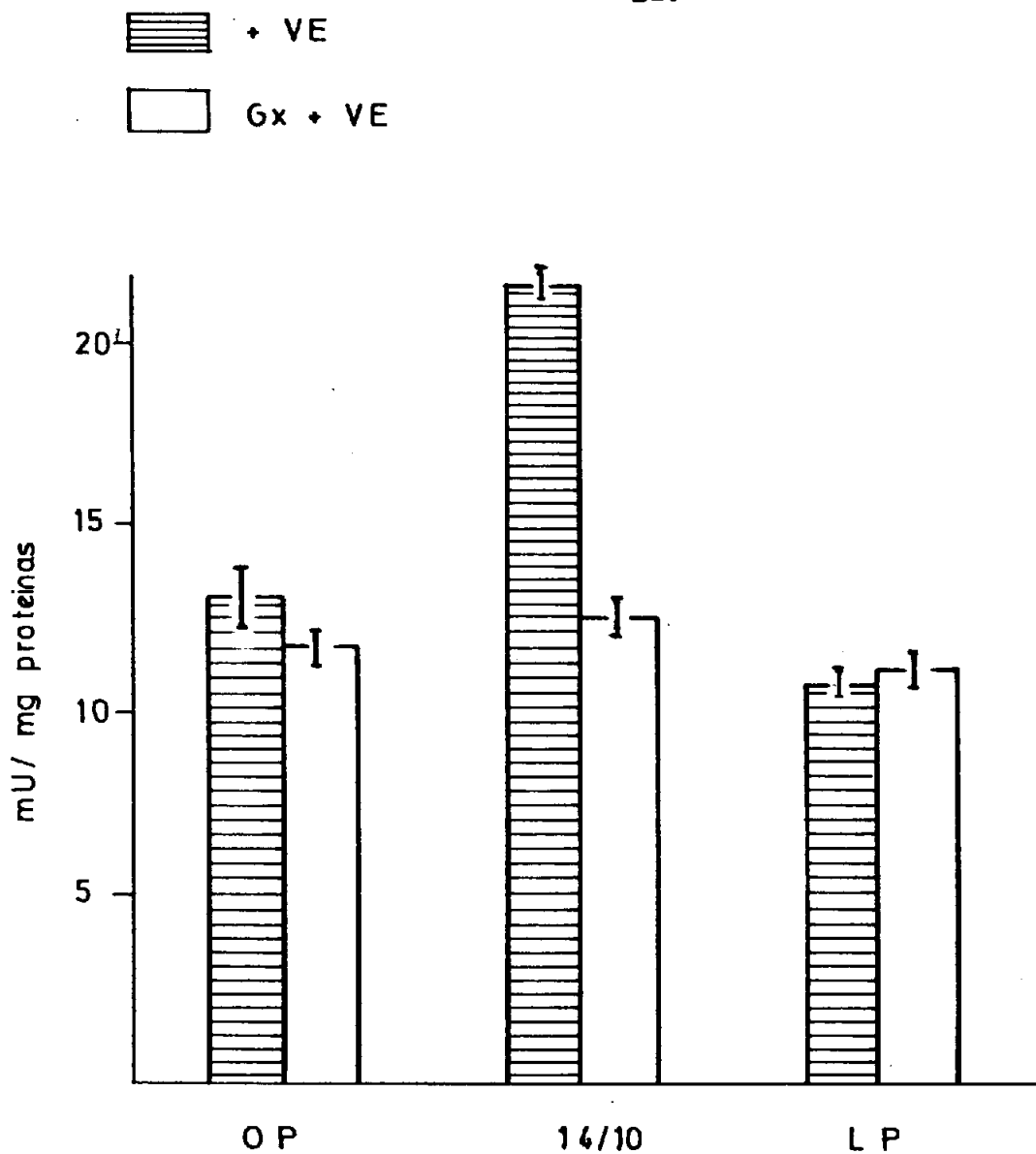


Fig. 29.- Efectos según los fotoperíodos, de la administración de valerianato de estradiol sobre la actividad LAP de hipotálamo en animales controles y castrados.

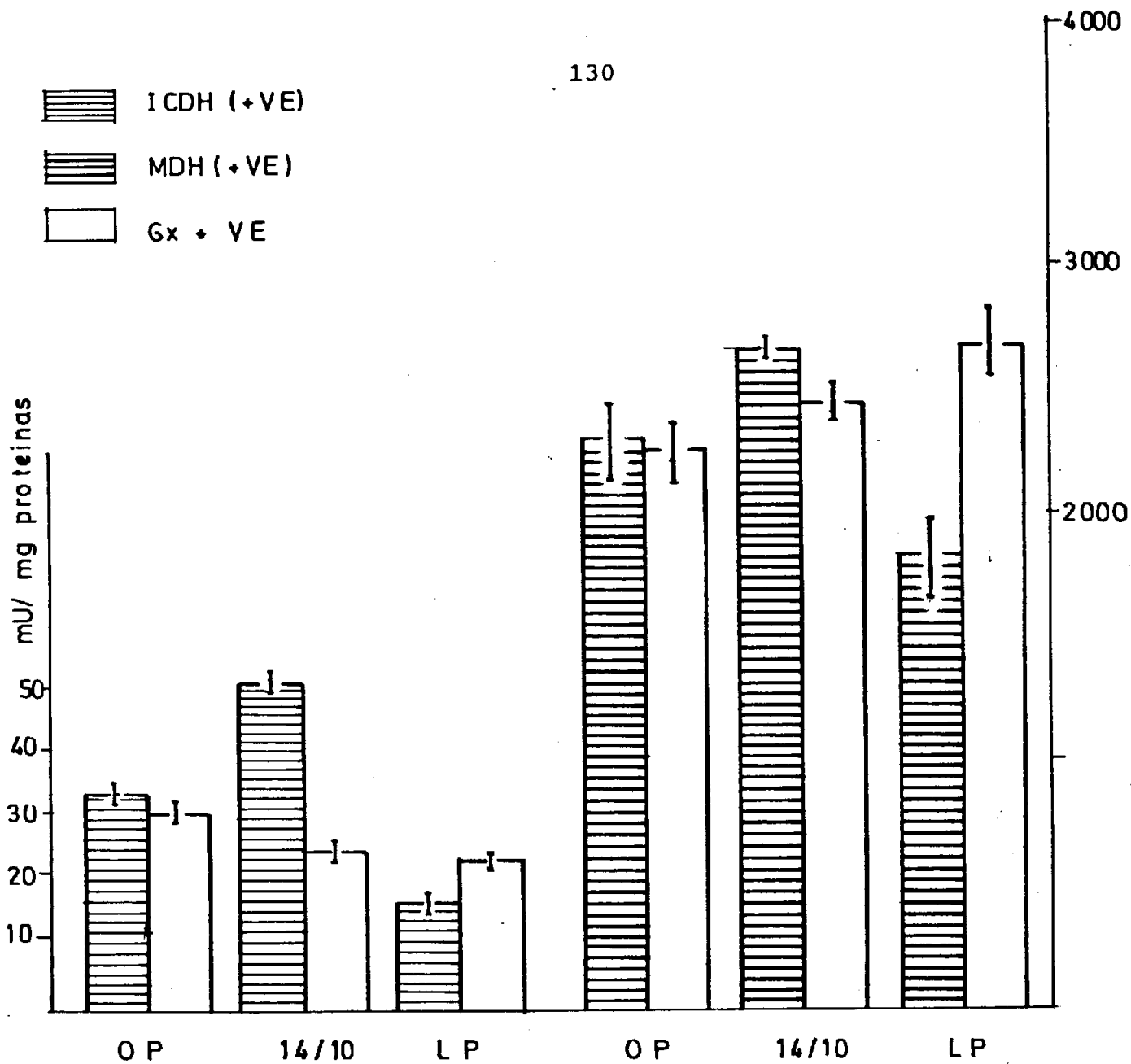


Fig. 30.- Efectos, según los fotoperíodos, de la administración de valerianato de estradiol sobre la actividad ICDH y MDH de hipotálamo en animales controles y castrados

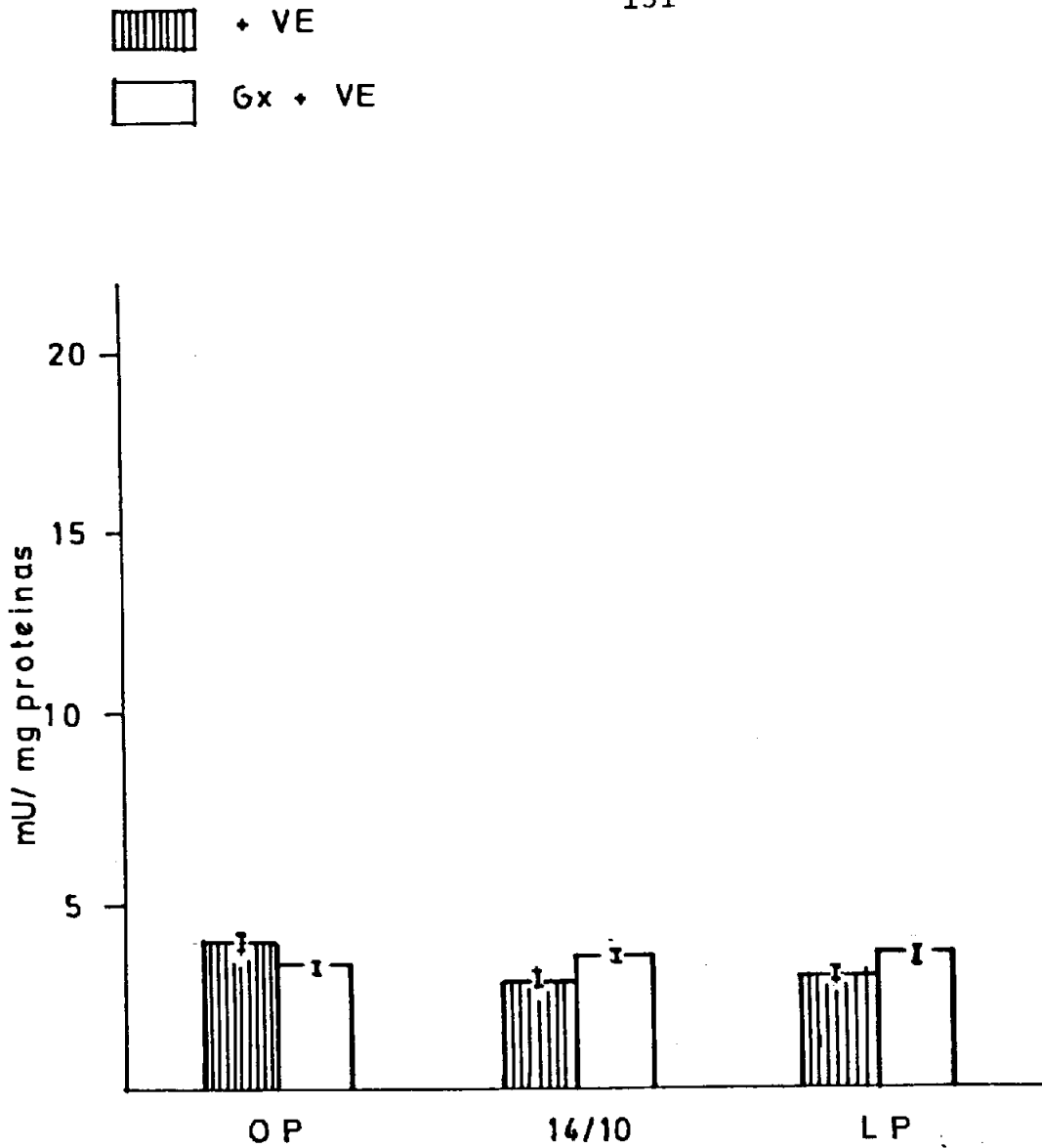


Fig. 31.- Efectos, según los fotoperíodos, de la administración de valerianato de estradiol sobre la actividad LAP de corteza en animales controles y castrados.

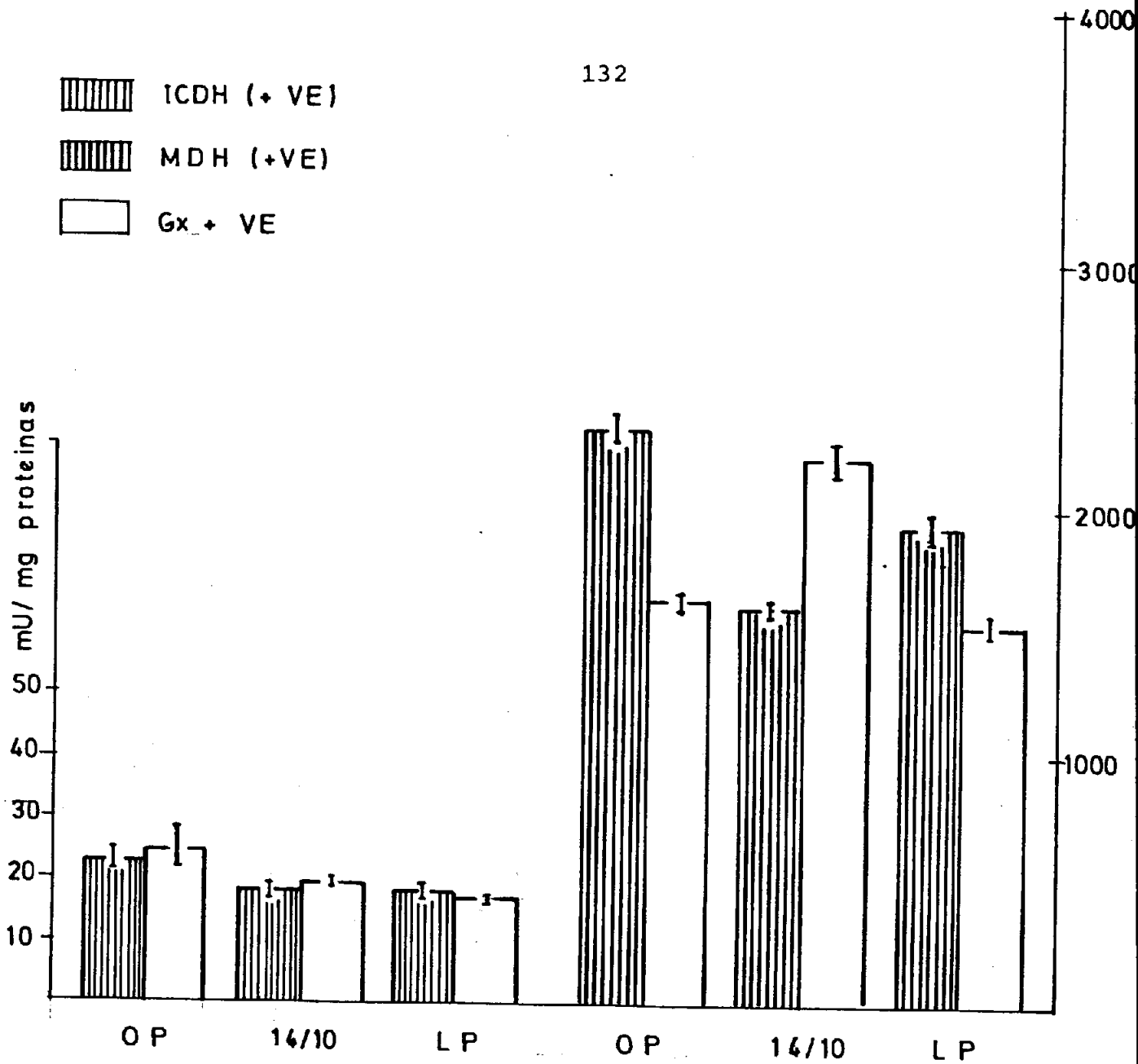


Fig. 32.- Efectos, según los fotoperíodos, de la administración de valerianato de estradiol sobre la actividad ICDH y MDH de corteza en animales controles y castrados.

en IN, y el aumento en la actividad ICDH; la actividad MDH au  
menta trās la castraci3n en animales +VE especialmente man-  
tenidos en LP.



## DISCUSSION

## DISCUSION

### 1. ANIMALES CONTROLES.

En el grupo de animales controles ( C ), sometidos a ritmo de iluminación normal ( 14 horas luz- 10 horas oscuridad ), hemos encontrado en hipotálamo valores de actividad LAP, ICDH y MDH diferentes a los encontrados en corteza.

En nuestros experimentos hemos constatado - utilizando como sustrato L-leucina-p-nitranilida- una mayor actividad LAP en hipotálamo que en corteza. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores utilizando tanto sustratos naturales - vasopresina ( HOOPER, 1963 ), leucil-glicina y leucil-glicil-glicina, ( MARKS y cols., 1974 ) y LH-RF ( SUNDBERG y KNIGGE, 1978 ) -, como sustratos artificiales - L-leucina-beta-naftilamida ( ARVY, 1962 ).

Tambien hemos encontrado mayor actividad ICDH en hipotálamo que en corteza, resultados que coinciden con los obtenidos por LUINE y cols. ( 1974 ). Por el contrario hemos detectado mayor actividad MDH en corteza que en hipotálamo, datos

comprobados también por SZE-CHUNG CHEN ( 1971 ) y por MANOCHA y SHANTHA ( 1969 ), llegando estos autores a describir una mayor actividad en las capas mas superficiales para disminuir en las profundas.

En el momento actual no tenemos elementos de juicio suficientes para descifrar el significado biológico de estas diferencias regionales en actividad peptidásica ( LAP ) y enzimas oxidativas ( MDH e ICDH ). Ninguno de los autores que se han ocupado de este tema han dado explicación satisfactoria al respecto, solamente HOOPER, al comprobar la capacidad del hipotálamo para degradar vasopresina, sugirió la posibilidad de que las enzimas peptidásicas participasen en el metabolismo de las hormonas peptídicas hipotalámicas. Esto explicaría alguna de las diferencias regionales comentadas.

## 2. EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE VALERIANATO DE ESTRADIOL

En nuestros experimentos hemos comprobado que en el hipotálamo, la administración de V.E. incrementa todas las actividades enzimáticas exploradas ( LAP, ICDH y MDH ).

Estos resultados coinciden con los publicados por HOOPER ( 1966 ), BICKEL y cols ( 1972 ), KHUL y cols. ( 1974 ), BELLIDO ( 1975 ) y GRIFFITHS y cols. ( 1975 ). Estos autores constataron un aumento en el hipotálamo de actividad peptidásica

tras la administración de estradiol. LUINE y cols en 1974 publicaron un trabajo en el que demostraron en el hipotálamo una elevación de actividad MDH e ICDH tras la administración de estradiol.

El incremento en el hipotálamo de actividad peptidásica tras la administración de V.E. podemos interpretarlo por la siguiente sucesión de eventos: la administración de V.E. aumenta la concentración de estradiol en sangre circulante, que al llegar al hipotálamo, por retroalimentación negativa, o bien frena la síntesis y/o liberación de algunos de los factores liberadores hipotálamicos, o bien aumenta su catabolismo, disminuyendo en ambos casos su concentración.

En algunos de estos dos procesos pueden estar involucradas las enzimas con actividad peptidásica presentes en el hipotálamo. La correlación encontrada entre la disminución de péptidos hipotálamicos, producida por el V.E. y el aumento de actividad peptidásica, sugiere la posibilidad de que estas enzimas peptidásicas participen en el catabolismo de los péptidos hipotálamicos.

Por otro lado, MOGUILVSKY y MALINOW ( 1964 ) demostraron en la rata que la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gonadas se correlacionaba estrechamente con el índice de captación de oxígeno por el hipotálamo y con su metabolismo oxidativo.

La cuantía de este metabolismo oxidativo dependerá en parte del grado de actividad de las enzimas que en él participan, como ICDH y MDH entre otras, tal y como demostraron GORDAN y cols. ( 1951 ) al comprobar que el estradiol administrado " in vivo " aumenta la captación de oxígeno por el hipotálamo y LUINE y cols. ( 1974 ) al obtener en las mismas circunstancias experimentales un aumento de actividad ICDH y MDH en hipotálamo.

El aumento de actividad de ICDH y MDH en hipotálamo encontrado en nuestros experimentos puede explicarse por el incremento que el V.E. produce sobre el metabolismo oxidativo de las células hipotálamicas.

Sin embargo el estradiol " in vitro " no incrementa ni la captación de oxígeno ( MOGUILVSKY y MALINOW, 1964 ) ni la actividad ICDH y MDH ( LUINE y cols., 1974 ) de un homogenado de hipotálamo. Esta discrepancia entre los resultados " in vivo " e " in vitro " pueden desaparecer si aceptamos que la acción de los estrógenos sobre el hipotálamo puede no ser una acción directa, sino mediada por otras estructuras nerviosas.

En apoyo de este punto de vista están los receptores para estrógenos descritos en el sistema nervioso central. En efecto, se han encontrado receptores específicos en hipotálamo, hipófisis y amígdala ( Mc. EWEN y cols., 1978 ), glándula pineal ( CARDINALI, 1977 ) y receptores inespecíficos en corteza

cerebral ( ROSNER y cols., 1973 ). Estos datos sugieren que la acción de los estrógenos sobre las gonadotrofinas hipofisarias probablemente no son solamente debidas a una acción directa de esta hormona sobre hipotálamo e hipófisis, sino que en esta respuesta intervienen otras estructuras nerviosas.

Estos hechos explicarian que el valerianato de estradiol tenga un claro efecto sobre la actividad enzimática y consumo de oxígeno del hipotálamo de ratas cuando se administra " in vivo " y la ausencia de estas respuesta cuando se administra " in vitro ".

Por otro lado el aumento de actividad en enzimas oxidativas ( ICDH y MDH ) en el hipotálamo de ratas tratadas con V.E. puede estar relacionado con la acción que estas hormonas, translocadas al núcleo por sus receptores, tienen sobre el genoma de las células diana del hipotálamo, aumentando la duplicación, transcripción ( biosíntesis de RNA ) y traducción ( biosíntesis proteica ).

Nuestros resultados demuestran también que en la corteza la administración de V.E. disminuye significativamente las actividades enzimáticas LAP, ICDH y MDH.

No existen en la literatura datos concretos que relacionen específicamente actividad neuroproteasa en corteza y administración de estrógenos. BICKEL y cols. ( 1972 ), estudiaron

en paleo-pallium la actividad CAPA después de tratar a los ani males con estrógenos, no detectando modificaciones significativas, en la actividad enzimática explorada, tras el tratamiento.

En cuanto a la actividad ICDH y MDH en corteza tras la administración de estrógenos, solo podemos hacer referencia a los trabajos de LUINE y cols. ( 1974 ) que comprobaron una disminución, aunque sin significatividad estadística, de actividad de estas enzimas oxidativas.

Por carecer de antecedentes bibliográficos suficientes no podemos emitir ninguna explicación al aumento significativo, obtenido en nuestros experimentos, en la actividad LAP, ICDH y MDH tras la administración de V.E. en corteza.

### 3. EFECTO DE LA CASTRACION

En nuestros experimentos hemos observado que en el hipotálamo la castración produce un descenso de la actividad LAP e ICDH.

La disminución de la actividad peptidásica del hipotálamo tras la castración ya había sido comprobada por HOOPER ( 1968 ) y confirmada por GRIFFITHS y HOOPER ( 1973,a ) y por BELLIDO ( 1975 ). Estos resultados podemos interpretarlos como sigue: la castración, al disminuir la concentración de es-

teroides gonadales circulantes interrumpe el mecanismo de regulación, por retroalimentación negativa, que estas hormonas tienen sobre hipotálamo e hipofísis, provocando un aumento en la concentración de hormonas gonadotróficas hipofisarias ( MARTINI y cols. 1968,b ) y de sus factores de liberación hipotálamicos. Este incremento puede deberse a un aumento en la sintesis de estos o bien a la disminución en la cuantía de su degradación.

El descenso en la actividad LAP del hipotálamo, sugiere que la castración prolonga la vida media de estos factores de liberación hipotálamicos al disminuir la velocidad de su degradación.

Tras la castración, nuestros resultados en lo que a actividad ICDH se refiere, coinciden con los aportados por MOGUILLEVSKY y cols. ( 1966 ) y XCHIAFFINI y cols. ( 1968 ). Estos autores demostraron que tras la castración se aprecia una disminución del consumo de oxígeno y de la oxidación del succinato.

En la corteza hemos encontrado que la castración disminuye la actividad enzimática oxidativa explorada ( ICDH y MDH ).

Estos resultados sugieren la posibilidad de que las modificaciones en el metabolismo oxidativo de determinadas áreas del sistema nervioso central, puedan ser secundarias a las va-



riaciones en la intensidad de la biosíntesis proteica, regulada por los niveles circulantes de algunas hormonas. La castración, al disminuir la concentración de estrógenos circulantes, puede frenar la biosíntesis protéica y acompañarse de una disminución en la intensidad del metabolismo oxidativo y en consecuencia de una disminución en la actividad ICDH y MDH.

#### 4. EFECTO DE LA CASTRACION Y ADMINISTRACION DE VALERIANA TO DE ESTRADIOL.

En nuestros experimentos hemos demostrado que en el hipotálamo de ratas castradas, la administración de V.E. eleva la actividad LAP, previamente deprimida por la castración, aunque sin llegar a las tasas de las ratas controles, e incrementa significativamente la actividad MDH sin modificar la actividad ICDH.

Estos resultados coinciden con los aportados por HOOPER ( 1966 ) y GRIFFITHS y HOOPER ( 1973,a ). Estos autores comprobaron que la actividad peptidásica en el hipotálamo de ratas gonadectomizadas, se recupera con la administración de V.E., y concluyen afirmando que la hormona administrada, al elevar su concentración en sangre, ejerce una acción frenadora sobre hipotálamo e hipófisis, originando una disminución en la concentración de hormonas hipofisarias gonadotropas y

de sus factores liberadores hipotalámicos. Este efecto se realiza, entre otros posibles mecanismos, por un aumento en la degradación de los factores hipotalámicos, como lo demuestra la recuperación de la actividad LAP.

HALL y STEINBERGER ( 1977 ) han encontrado, despues de administrar benzoato de estradiol a animales gonadectomizados, una recuperación de los valores basales de LH, FSH y LH-RF en plasma y una acusada elevación en el contenido hipotalámico de LH-RF. Estos datos coinciden con los que nosotros hemos aportado, pues los animales Gx+V.E. no recuperan totalmente la actividad peptidásica en el hipotálamo, explicando con ello un aumento en la concentración de factores liberadores gonadotropos hipotalámicos.

En lo que a ICDH y MDH se refiere, nuestros resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos por LUINE y cols. ( 1974 ), que demostraron un aumento de actividad tanto de ICDH como de MDH en los hipotálamos de animales gonadectomizados y tratados con benzoato de estradiol.

##### 5. EFECTO DE LOS CAMBIOS EN LOS FOTOPERIODOS. OP y LP.

Para interpretar nuestros resultados en este apartado, en el que aparece como circunstancia experimental determinante la modificación del ritmo de iluminación normal ( 14 horas

10 horas oscuridad ), es necesario implicar, además de los mecanismos de retroalimentación, las interacciones luz glándula pineal y luz hipotálamo, por lo que vamos a recordar, de una forma esquemática, las vías nerviosas y los mecanismos neuroendocrinos de estas interacciones.

La luz desencadena en las células ganglionares de la retina ( MASON y cols., 1977 ) que son conducidos por una vía retinohipotalámica directa ( MOORE y LENN, 1972 ) hasta el núcleo supraquiasmático ( WNISCH, 1976 ). A partir de este núcleo y por medio del haz prosencefálico medial ( MOORE y KLEIN, 1974 ) y ganglio cervical superior, es conducido hasta las fibras postsinápticas simpáticas que inervan la glándula pineal ( KAPPERS, 196 ) , ocasionando a este nivel una disminución de la liberación de noradrenalina ( ROMERO y AXELROD, 1975 ). La oscuridad por el contrario incrementa la descarga de noradrenalina ( REITER, 1976 ).

La noradrenalina actúa sobre los receptores beta-adrenérgicos de los pinealocitos y por medio de una serie de reacciones enzimáticas concatenadas se produce un incremento de indolo pineales. De esta forma un potencial de acción, a través de una ruta multisináptica, se transforma en una respuesta neuroendocrina.

También el núcleo supraquiasmático tiene conexiones con

otros núcleos hipotalámicos, ventromedial y arcuato ( SWANSON y COWAN, 1975 ), núcleos íntimamente relacionados con la secreción fásica de factores liberadores de gonadotrofinas ( FLERKO, 1974 ).

#### 5.1. Animales controles.

En el grupo de animales controles la oscuridad permanente ( OP ) y luz permanente ( LP ) provocan en el hipotálamo una disminución de la actividad LAP e incremento en la actividad MDH.

La actividad LAP disminuye tanto en OP como en LP, pero la caída es más marcada en OP. Estos resultados refuerzan la idea de que los cambios de actividad peptidásica en el hipotálamo están relacionados con la intensidad de su actividad gonadotropa.

La falta de estímulos luminosos aumenta la actividad pineal ( WURTMAN, 1968 ) y los indoles pineales, que por un mecanismo directo sobre las gónadas, como defiende VAUGHAN y cols. ( 1970 ), o a través del hipotálamo, como precisa REITER ( 1977 ), desencadenan en la rata una atrofia gonadal. Es precisamente esta atrofia gonadal, la que al interrumpir el mecanismo de retroalimentación negativa de los esteroides gonadales sobre hipófisis e hipotálamo, permite un aumento de hormonas

gonadotropas hipofisarias y de sus factores de liberación hipotalámicos. El incremento de estos factores de liberación puede explicarse por disminuir la intensidad de su degradación, como lo sugiere el descenso que hemos encontrado en la actividad LAP hipotalámica.

El descenso de actividad LAP en el hipotálamo de ratas sometidas a LP puede explicarse por una interacción luz-hipotálamo sin intervención de la pineal. En efecto, la pinealectomía no provoca en la rata los mismos cambios que la exposición a la luz permanente ( REITER, 1977 ), como cabría esperar si todas las interacciones luz-gónadas estuviesen mediadas por la pineal, pues la luz permanente bloquea la síntesis y liberación de indoles pineales y produce una pinealectomía funcional.

CRTCHLOW ( 1963 ), FLERKO ( 1966 ) y LAWTON y SCHWARTZ ( 1965 ), apoyan esta hipótesis al afirmar que en el desarrollo del estro, bloqueo de la ovulación e incremento de gonadotropinashipofisarias , producidas por ritmos de iluminación constantes, intervienen, además de la pineal, otras estructuras nerviosas. Entre estas áreas del sistema nervioso involucradas en los efectos de la iluminación permanente puede considerarse el núcleo supraquiasmático, como puede deducirse de los trabajos tanto de CRTCHLOW ( 1963 ), en los que demuestra

cambios morfológicos en este núcleo en los animales sometidos a prolongados períodos de luz permanente, como los de FISKE y GREEP ( 1959 ) , que consiguen bloquear la respuesta vaginal a la luz permanente destruyendo el núcleo supraquiasmático.

Dado que el núcleo supraquiasmático, considerado como verdadero reloj biológico ( JOSEPH y KNIGGE, 1978 ), tiene conexiones con los núcleos arcuatos y ventromediales del hipotálamo ( SWANSON y COWAN, 1975 ), estas conexiones podrían explicar la interacción directa luz-hipotálamo y permitirnos entender una elevación de los factores liberadores hipotalámicos, debido en parte a la disminución de la actividad LAP.

El incremento de actividad MDH encontrada en hipotálamo puede relacionarse con el aumento en la síntesis de factores liberadores de gonadotrofinas, que parece ocurrir tanto en OP como en LP.

## 5.2. Animales tratados con valerianato de estradiol.

A lo largo de esta discusión y en distintas ocasiones, para interpretar nuestros resultados, hemos puesto de relieve el importante papel que en la regulación de la actividad gonadotropina del hipotálamo juegan la luz de una parte, y el mecanismo de retroalimentación de los estrógenos por otra.

Al introducir en nuestro trabajo un grupo de animales a los que experimentalmente modificamos estos dos factores reguladores, luz y estrógenos, intentamos comprobar si posibles modificaciones de la actividad LAP, ICDH y MDH serían un índice de relación entre la fotoestimulación y la retroalimentación.

En un reciente trabajo HOFFMAN y CULLIN ( 1977 ), estudiando el efecto de los fotoperíodos sobre el mecanismo de retroalimentación negativo del estradiol, valorando la liberación de LH por la hipófisis, han encontrado que la rata sometida a fotoperíodos cortos ( 2 horas luz / 22 horas oscuridad y 8 horas luz / 16 horas oscuridad ), es más sensible al efecto negativo de los estrógenos. Según estos autores en la rata hembra la sensibilidad del sistema control de LH al efecto negativo de los estrógenos, está modulado por las características de los fotoperíodos a los que se encuentra sometida.

En el hipotálamo disminuye la actividad LAP, ICDH y MDH tanto en OP como en LP. Estos resultados sugieren que los mecanismos que regulan la síntesis y/o liberación de factores liberadores hipotalámicos de gonadotrofinas hipofisarias, pueden ser distintos en los animales mantenidos en OP y en LP.

En los animales mantenidos en OP, la regulación de los factores liberadores hipotalámicos de hormonas gonadotropas

hipofisarias, puede relacionarse con los niveles de esteroides gonadales circulantes. En estos animales, la ausencia de estímulos luminosos permite un incremento de la actividad biosintética pineal y de su acción antigonadotropa, lo que determina un descenso de esteroides gonadales circulantes y una respuesta hipotalámica de incrementar la concentración de FSH-RF y LH-RF. Este incremento en hormonas liberadoras puede explicarse, entre otras causas, por una disminución en su catabolismo, como parece sugerir la disminución de actividad LAP encontrada en el hipotálamo.

En los animales mantenidos en LP, los estímulos luminosos originan por un lado, una acción directa a través del núcleo supraquiasmático y sus conexiones con los núcleos arcuatos y ventromedial, sobre el hipotálamo, desencadenando un aumento en los FSH-RF y LH-RF hipotalámicos; y por otro lado, una disminución en la actividad biosintética pineal con caída en su acción antigonadotropa. Tanto el incremento de factores hipotalámicos gonadotropos, como la disminución de la acción antigonadotropa pineal, actuarían sinérgicamente para permitir un incremento en los esteroides gonadales circulantes, y estos, por retroalimentación negativa, disminuir la concentración hipotalámica de FSH y LH-RF. En estas circunstancias experimentales hay una disminución de sensibilidad del hipotálamo a la



retroacción negativa ejercida por las tasas de esteroides gonadales circulantes ( HOFFMAN y CULLIN, 1977 ), lo que permite explicar un aumento de FSH-RF y LH-RF, debido, entre otras causas, a un descenso en la velocidad de su catabolismo, como parece indicar la actividad LAP encontrada en el hipotálamo.

También la actividad ICDH y MDH disminuyen. Como siempre estas actividades enzimáticas oxidativas parecen estar ligadas a las necesidades de energía para la biosíntesis.

### 5.3. Animales castrados.

En hipotálamo los ritmos OP y LP desencadenan en el animal castrado disminución de la actividad LAP e incremento de la actividad ICDH.

Nos encontramos de nuevo con que cualquier modificación en la duración del fotoperíodo se acompaña de disminución en la actividad LAP en hipotálamo, resultado que coincide con los obtenidos en los animales controles y en los tratados con V.E.

Estos resultados refuerzan la hipótesis anteriormente comentada de que los mecanismos que regulan la tasa de factores liberadores de gonadotrofinas, pueden ser distintos en los animales sometidos a OP que en los mantenidos en LP. En OP la síntesis y/o liberación de estos factores puede depender de los niveles de esteroides gonadales circulantes, y estos estar

modulados por la actividad pineal. En LP esta regulación depende de las interacciones directas luz-hipotálamo.

En los animales mantenidos en OP la acción antigona - tropa de la pineal, que en estas circunstancias experimentales se encuentra aumentada, solo puede explicarse a nivel central por carecer estos animales de gónadas, y tenderían a disminuir la síntesis y/o liberación de hormonas gonadotropas hipofisarias y sus factores de liberación hipotalámicos. La falta de esteroides gonadales circulantes por la gonadectomía tiende a producir un efecto opuesto, al disminuir la retroalimentación negativa sobre hipotálamo e hipofisis. Efecto este último predominante como parece deducirse de la disminución de actividad LAP en hipotálamo.

En los animales mantenidos en LP la inhibición de la acción antigona - tropa de la pineal junto con la ausencia de esteroides gonadales circulantes, puede explicar un aumento en la concentración de FSH-RF y LH-RF hipotalámicos, debido entre otras causas a una disminución de la actividad LAP, como hemos encontrado experimentalmente en el hipotálamo.

#### 5.4. Animal castrado y tratado con VE

En este grupo de animales prácticamente no encontramos diferencias entre los valores de actividad LAP, ICDH y MDH ni en hipotálamo ni en corteza.

## 6. MODULACION POR LOS FOTOPERIODOS, OP y LP, DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE VE Y CASTRACION

El analisis de las influencias que la duraci3n de los fotoperiodos ejercen sobre las modificaciones producidas en la actividad enzimática hipotalámica y cortical, por la administracion de VE y la castración, nos llevaria de nuevo a considerar los mecanismos que regulan esta actividad en las distintas circuns<sup>t</sup>ancias experimentales estudiadas. Por ello en este tercer apartado vamos solo a comentar las modificaciones que la luz y la oscuridad provocan en estos mecanismos reguladores.

En los fotoperiodos cortos HOFFMANN y CULLIN (1977) demostraron una mayor sensibilidad del hipotálamo a los cambios en la concentraci3n plasmática de esteroides gonadales circulantes, en el sentido de que pequeños cambios, aumentos o descensos, en la concentraci3n de estos esteroides circulantes, originaban oscilaciones importantes, descensos o incrementos, por retroalimentaci3n negativa, de la concentraci3n de factores liberadores hipotalámicos de hormonas gonadotropas hipofisarias.

Aunque no se conoce exactamente el mecanismo mediante el cual el acortamiento del período de iluminaci3n modifica la sensibilidad hipotalámica a los esteroides gonadales, TUREK

y cols, (1977) demostraron que al menos este efecto no se debía a un cambio en la intensidad de respuesta de la hipófisis a los niveles de factores de liberación hipotalámicos.

La luz permanente, por el contrario, disminuye la sensibilidad hipotalámica a los cambios de concentración de esteroides gonadales (HOFFMANN y CULLIN, 1977), y provoca un fallo en la retroalimentación positiva que los niveles de esteroides gonadales circulantes, tienen sobre la liberación de LH por la hipófisis (MENNIN y GORSKI, 1975).

Estos cambios en la sensibilidad hipotalámica, a los niveles de esteroides gonadales circulantes, no parece deberse a cambios en el número de receptores específicos en el sistema nervioso central (HEFFNER, 1976).

6.1. Hemos encontrado que en el hipotálamo la administración de Valerianato de estradiol incrementa la actividad LAP tanto en los animales controles como en los sometidos a oscuridad permanente, mientras que disminuye en los animales en LP.

El incremento de actividad LAP hipotalámica en el animal tratado con VE y en OP puede interpretarse como debido a una mayor sensibilidad hipotalámica a la retroalimentación negativa ejercida por los niveles de hormonas gonadales circulantes, en los fotoperíodos cortos, como sugiere la disminu-

ción de factores hipotalámicos liberadores de gonadotrofinas hipofisarias producidos por el gran aumento de actividad LAP encontrado experimentalmente.

En luz permanente nos encontramos una disminución de la actividad LAP que confirma la menor sensibilidad del hipotálamo al estradiol y pone de manifiesto la importancia de la luz sobre los factores liberadores de gonadotrofinas, actuando por una vía neural directa sobre el hipotálamo.

## CONCLUSIONES

### CONCLUSIONES

1. En el grupo de animales controles la actividad LAP es mayor en el hipotálamo que en la corteza. La actividad enzimática oxidativa es mayor en el hipotálamo para ICDH y menor para MDH.

2. La administración de valerianato de estradiol incrementa en el hipotálamo todas las actividades enzimáticas exploradas ( LAP, ICDH y MDH ), mientras que las disminuye en la corteza.

3. La castración produce un descenso tanto en la actividad enzimática LAP e ICDH en el hipotálamo, como en la actividad enzimática oxidativa en la corteza ( ICDH y MDH )

4. La castración y administración de valerianato de estradiol no modifica significativamente las actividades enzimáticas

cas estudiadas ( LAP, ICDH y MDH ) ni en el hipotálamo ni en la corteza.

5. El aumento y la disminución en la duración del período de iluminación, determinan un decremento significativo en la actividad LAP en el hipotálamo de los animales controles, de los castrados y de los tratados con valerianato de estradiol.

6. En el hipotálamo la actividad LAP aumenta en todas aquellas circunstancias experimentales en las que existe una disminución en la concentración de factores liberadores hipotalámicos de hormonas gonadotropas hipofisarias, y disminuye cuando aumenta la concentración de estos factores liberadores.

7. La correlación inversa, demostrada en el hipotálamo, entre actividad LAP y concentración de factores liberadores gonadotropos, apoyan la hipótesis de la participación de las enzimas peptidasas en el catabolismo de los péptidos hipotalámicos biológicamente activos.

8. Nuestros resultados sugieren la existencia de un do-



ble mecanismo de control de la síntesis y/o liberación de los factores liberadores gonadotropos hipotalámicos.

## BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. ABDERHALDEN, E. y CEASER, G.: "Untersuchungen uber das vorkommen von polypeptidasen in centralen und peripheren nerven system". Fermentforschung, 16: 255-262, 1940.
2. ADAMS, C.W.M.: "Histochemistry of the cells in the nervous system". En Neurochemistry. C.W.M. Adams (ed). Elsevier, Amsterdam. pp. 253-331, 1965.
3. ADAMS, C.W.M. y GLENNER, G.G.: "Histochemistry of myelin - IV. Aminopeptidase activity in CNS and PNS". J. Neurochem, 9: 233-239, 1962.
4. ADAMS, E.S. y SMITH, E.: "Proteolytic activity of pituitary extracts". J. Biol. Chem. 191: 651-664, 1951.
5. ALBERTAZZI, E., BARBANI-SILVA, C., TRENTINI, G.P. y BOTTICELLI, A.: "Influence de l'epiphysectomie et du traitement avec le 5-hydroxytryptamine sur le cycle oestral de la ratte albinos". Ann. Endocrinol. 27: 93-99, 1966.
6. ANSELL, G.B. y RICHTER, D.: "The proteolytic activity of the brain tissue". Biochim. Biophys. Acta 13: 87-91 , 1954a.
7. ANSELL, G.B. y RICHTER, D.: "Evidence for neural proteinase in brain tissue". Biochim. Biophys. Acta 13: 92-97 , 1954b.

8. ARAI, Y. y KUSAMA, T.: "Leucine aminopeptidase in the supraoptic and paraventricular nuclei of the hypothalamus in normal and dehydrated rats". Proc. Japan Acad. 41: 734-736, 1965.
9. ARVY, L.: "Histochemical demonstration of enzymatic activities in neurosecretory centers of some homiothermic animals". En Neurosecretion. H. Heller y R.B. Clark (eds.). Academic Press, New York. pp. 215-225, 1962.
10. AXELROD, J. y ZATZ, M.: "The  $\beta$ -adrenergic receptor and the regulation of circadian rhythms in the pineal gland". En Biochemical Actions of Hormones. G. Litwack (ed.). Vol. IV, Academic Press, New York. pp. 249-265, 1977.
11. AXELROD, J., WURTMAN, R.J. y SNYDER, S.: "Control of hydroxyindol-O-methyltransferase activity in the rata pineal gland by environmental lighting". J. Biol. Chem. 240: 949-954, 1965.
12. BALLARD, W.W.: "The mechanism for synchronous spawning in hydractinia and pennaria". Bio. Bull. 82: 329-339, 1942.
13. BAKKE, J.L. y LAWRENCE, N.: "Circadian periodicity in thyroid stimulating hormone titer in the rat hypophysis and serum". Metabolism 14: 841-843, 1965.

14. BARRACLOUGH, C.A. y GORSKI, R.A.: "Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat". *Endocrinology* 68: 68-79, 1961.
15. BARTTER, F.C., DELEA, C.S. y HALBERG, F.: "A map of blood and urinary changes related to circadian variations in adrenal cortical function in normal subjects". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 98: 969-983, 1962.
16. BELIK, Y.V., SMERCHINSKA, L.S., TERLETSKA, Y.T. y GEINEKO, O.G.: "Proteolytic activity in nerve tissue". *Ukr. J. Biochem.* 40: 543-548, 1968.
17. BELLIDO, M.C.: "Efecto de la castración y administración de benzoato de estradiol (BE) y propionato de testosterona (PT) sobre la actividad L-leucinaminopeptidasa (LAP) y gamma-glutamyltranspeptidasa ( $\gamma$ -GT) en diversas áreas cerebrales". *Tesina de Licenciatura. Sevilla. 1975.*
18. BERGMAYER, H.U.: "Methoden der enzymatischen analyse". *Verlag Chemie, Weinheim, Bd. I., S. 575, 2. Auflage, 1970.*
19. BICKEL, M., KUHLE, H., JEANNE SIOE ENG TANG, y TAUBERT, H.D.: "Evidence of sex-specific effect of testosterone and progesterone upon L-cystine-aminopeptidase activity in the hypothalamus and paleopallium of the rat". *Neuroendocrinology* 9: 321-331, 1972.
20. BINKLEY, S., KLEIN, D.C. y WELLER, J.: "Dark induced increase in pineal serotonin N-acetyltransferase activity: A

- refractory period". *Experientia* 29: 1339-1340, 1974.
21. BISSONETTE, T.H.: "Modification of mammalian sexual cycles; reactions of ferrets ("Putoris vulgaris") of both sexes to electric light added after dark in November and December". *Proc. Roy. Soc. B* 110: 32w-336, 1932.
  22. BISSONETTE, T.H. y CHAPNICK, M.N.: "Studies in the sexual cycle in birds". *Am. J. Anat.* 45: 307-344, 1930.
  23. BLUM, E., YAKOVCHUK, A.I. y YARMOSLEVICH, A.I.: "Proteolytic enzymes of the brain". *Bull. Biol. Med. Exptl. U. R.S.S.* 1: 17-18, 1936.
  24. BRECHER, A.S.: "The distribution and activity of calf brain peptidases". *J. Neurochem.* 10: 1-6, 1963.
  25. BROWNSTEIN, M.J., PALKOVITS, M., SAAVEDRA, J.M. y KIZER, J. S.: "Distribution of hypothamic hormones and neurotransmitters within the diencephalon". En *Frontiers in Neuroendocrinology*. L. Martini y W.F. Ganong (eds.). Raven Press, New York. pp. 1-23, 1976.
  26. BUNN, J.P. y EVERETT, J.W.: "Ovulation in persistent-oes-trous rats after electrical stimulation of the brain". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 96: 369-371, 1957.
  27. CARDINALI, D.P.: "Nuclear receptor estrogen complex in the pineal gland. Modulation by sympathetic nerves". *Neuroendocrinology* 24: 333-346, 1977.
  28. CHABAS, J.: "Oxidorreductasas" En *Enzimologia*. J. Chabás

- (ed.). Editorial Científico Médica, Barcelona. pp. 123-175, 1969.
29. COHEN, G.: "le cycle des acides tricarboxyliques". En Le métabolisme cellulaire et sa régulation". G. Cohen (ed.). Herman, Paris. pp. 73-88, 1971.
30. CORBIN, A.: "Pituitary and plasma LH of ovariectomized rats with median eminence implants". Endocrinology 78: 893-896, 1966.
31. CRITCHLOW, V.: "The role of light in the neuroendocrine system". En Advances in Neuroendocrinology. A.N. Nalbandov (ed.). Univ. of Illinois. Press, Urbana, Illinois. pp. 377-402, 1963.
32. DATTA, R.K., MARKS, N. y LAJTHA, A.: "Purification and properties of brain tripeptidase". Federation Proc. 26:452, 1967.
33. DAVID, M.A., FRASCHINI, F. y MARTINI, L.: "Control of LH secretion: Role a "short" feedback mechanism". Endocrinology 78: 55-60, 1966.
34. DE OLMOS, J.S.: "The amygdaloid projection field in the rat as studied with the cupric-silver method". En Neurobiology of the Amigdala. B.E. Eleftheriou (ed.). Plenum Press, New York. pp. 145-204, 1972.
35. DOCKE, F.: "Differential effects of amygdaloid and hippocampal lesions on female puberty". Neuroendocrinology 14: 345-350, 1974.

36. DOCKE, F., LEMKE, M. y OKRASA, R.: "Studies on the puberty-controlling function of the medialcortical amygdala in the immature female rat". *Neuroendocrinology* 20: 166-175, 1976.
37. DONOVAN, B.T.: "The regulation of the secretion of follicle-stimulating hormone". En *The Pituitary Gland*. G.W. Harris y B.T. Donovan (eds.). Butterworths, London. Vol. 2. Anterior Pituitary. pp. 49-97, 1966.
38. ELEFThERIOU, B.E.: " El sistema límbico y los procesos neuroendocrinos". En *Neuroendocrinologia*. O. Schiaffini, A. Oriol-Boch, L. Martini y M. Motta (eds.). Ediciones Toray, Barcelona. pp. 315-351, 1975.
39. ELLIS, D. y FRUTON, J.S.: "On the proteolytic enzymes of animal tissue. IX Calf thymus tripeptidase". *J. Biol. Chem.* 191: 153-159, 1951.
40. ELWERS, M. y CRITCHLOW, V.: "Role of amygdala in regulating LH secretion in the adult female rat". *Amer. J. Physiol.* 218: 622-626, 1966.
41. EVERETT, J.W. y SAWYER, C.H.: "A 24-hour periodicity in the LH-release-apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation". *Endocrinology* 47: 198-218, 1950.
42. FIRTH, A. y HOOPER, K.C.: "The effect of 17-ethynilestradiol on the metabolism of polypeptides in the hypothalamus". *Biochem.* 108: 510-511, 1968.



43. FIRTH, A. y HOOPER, K.C.: "The effect of coitus on the activity of certain enzymes in the female rabbit hypothalamus". *Acta Endocrinológica* 66: 213-220, 1971.
44. FISKE, V.M.: "Effect of light on sexual maturation, estrous cycles, and anterior pituitary of the rat". *Endocrinology* 29: 187-196, 1941.
45. FISKE, V.M. y GREEP, R.O.: "Neurosecretory activity in rats under conditions of continuous light or darkness". *Endocrinology* 64: 175-185, 1959.
46. FISKE, V.M. y LAMBERT, H.H.: "Effect of light on the weight of the pineal gland in the rat". *Endocrinology* 66: 489-491, 1962.
47. FLERKÓ, B.: "Die rolle hypothalamischer strukturen bei der hennungswirkning de erhothen ostrogenblutspiegels and die gonadotrophinsekretion". *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 9: suppl. 17, 1956.
48. FLERKÓ, B.: "Hypothalamic control of hypophyseal gonadotrophic function". En *Hypothalamic control of Anterior Pituitary*. J. Szentgothai, B. Flerkó, B. Mess y B. Halász (eds.). Akademiai Kiadó, Budapest. pp. 192-265, 1962.
49. FLERKÓ, B.: "Control of gonadotrophin secretion in the female". En *Neuroendocrinology*. L. Martini y W.F. Ganong (eds.). Academic Press, New York, London. pp. 613-668, 1966.

50. FLERKÓ, B.: "Steroid hormones and the differentiation of the central nervous system". En Current Topics Experimental Endocrinology. L. Martini y U.H.T. James (eds.). Academic Press, New York. Vol. 1. pp. 41-80, 1971.
51. FLERKÓ, B.: "Hypothalamic mediatone of neuroendocrine regulation of hypophysial gonadotrophic function". En Reproductive Physiology. R.O. Greep (ed.). Butterworths, London, University Park Press, Baltimore. pp. 1-32, 1974.
52. FRUTON, J.S.: "Cathepsins". En The Enzymes. P.D. Boyer, H. Lardy y K. Myrback (eds.). Academic Press, New York. pp. 233-241, 1960.
53. FUXE, K., HÖKFELT, T., LÖFSTROM, A., JOHANSSON, O., AGNATI, L., EVERITT, B., GOLDSTEIN, M., JEFFCOATE, S., WHITE, N., ENEROTH, P., GUSTAFFSON, J.A. y SKETT, P. : "On the role of neurotransmitters and hypothalamic hormones and their interactions in hypothalamic and extra hypothalamic control of pituitary function and sexual behavior". En Subcelular Mechanism in Reproductive Neuroendocrinology. F. Naftolin, K.J. Ryan y J. Davies (eds.). Elsevier, Amsterdam. pp. 193-246, 1976.
54. GABRIELESCU, E.: "Structural integration of neuroprotease activity". En International Review of Neurobiology. D.C. Pfeiffer y J.R. Smythies (eds.). Academic Press,

- New York, San Francisco, London. pp. 189-239, 1975.
55. GANONG, W.F.: "Role of the nervous system in reproductive processes". En *Reproduction in Domestic Animals*. H.H. Cole y P.T. Cupps (eds.). Academic Press, New York. pp. 185-221, 1959.
  56. GLOOR, P.: "Physiology of the limbic system". En *Advances in Neurologie*. J.K. Penry y D.D. Dalm (eds.). Vol. 11 *Complex Partial Zeizure and their treatmen*. pp. 27-55. 1975.
  57. GORDAN, G.S., BENTINCK, R.C. y EISENBERG, E.: "The influence of steroids on cerebral metabolism". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 54: 575-607, 1951.
  58. GORSKI, R.A. y CLEMENS, L.G.: "Action of gonadal hormones". En *Handbook of Neurochemistry*. A. Lajtha (ed.). Plenum Press, New York. Vol. 4 , *Control Mechanism of the Nervous System*. pp. 429-449, 1071.
  59. GRABER, A.L., NICHOLSON, W.E., ISLAND, D.P., GIVENS, J.R. y LIDDLE, G.W.: "Persistence of a diurnal rhythm in plasma ACTH concentrations of cortisol-deficient patients". Program 46th Meeting Endocrine Soc. Chicago. pp. 41, 1964.
  60. GRAHAN, L.T., SHANK, R.P., WERMAN, R. y APRISON, M.H.:  
 "Distribution of some synaptic transmitters in cat spi  
 nal cord: Glutamic acid, aspartic acid, gamma-aminobu-

- tyric acid, glycine and glutamine". J. Neurochem. 14: 465-472, 1967.
61. GREEP, R.P.: "Physiology of the anterior hypophysis in relation to reproduction". En Sex and Internal Secretions. W. E. Young (ed.). Williams and Wilkins Co, Baltimore. Vol. 1. pp. 240-301, 1961.
  62. GREEP, R.P. y Jones, I.C.: "Steroid control of pituitary function". Recent Progr. Hormone Res. 5: 197-254, 1950.
  63. GRIFFITHS, E.C. y HOOPER, K.C.: "The effects of orchidectomy and testosterone propionate injection on peptidase activity in the male rat hypothalamus". Acta Endocrinológica 72: 1-8, 1973a.
  64. GRIFFITHS, E.C. y HOOPER, K.C.: "Peptidase activity in the hypothalamus of rats neonatally with oestrogen". Acta Endocrinológica 77: 10-18, 1973b.
  65. GRIFFITHS, E.C. y HOOPER, K.C.: "Changes in hypothalamic peptidase activity during the oestrous cycle in the adult female rat". Acta endocrinológica 74: 41-48 , 1973c.
  66. GRIFFITHS, E.C. y HOOPER, K.C.: "Competitive inhibition between oxytocin and luteinizing hormone-releasing factor (LRF) for the same enzyme system in the rat hypothalamus". Acta Endocrinológica 75: 435-442, 1974a.
  67. GRIFFITHS, E.C. y HOOPER, K.C. : "Peptidase activity in

- different areas of the rat hypothalamus". *Acta Endocrinológica* 77: 10-18, 1974b.
68. GRIFFITHS, E.C., HOOPER, K.C., JEFFCOATE, S.L. y HOLLAND, D.I.: "Peptidases in different areas of the brain inactivating luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RF)". *Brain Res.* 85: 161-164, 1975a.
69. GRIFFITHS, E.C., HOOPER, K.C., JEFFCOATE, S.L. y HOLLAND, D.I.: "The effects of gonadectomy and gonadal steroid on the activity of hypothalamic peptidases inactivating luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RF)". *Brain Res.* 88: 384-388, 1975b.
70. GUILLEMIN, R., DEAR, W.E. y LIEBELT, R.A.: "Nycthemeral variations in plasma free corticosteroid levels in the rat". *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 101: 394-395, 1959.
71. GUROFF, G.: "A neutral, calcium activated proteinase from the soluble fraction of the rat brain". *J. Biol. Chem.* 239: 149-155, 1964.
72. HALÁSZ, B.: "The endocrine effects of isolation of the hypothalamus from the rest of the brain". En *Frontiers in Neuroendocrinology*. W.F. Ganong y L. Martini (eds.). Oxford University Press, London. pp. 307-342, 1969.
73. HALÁSZ, B., PUPP, L. y WHILARIK, S.: "Hypophysitropic area in the hypothalamus". *J. Endocrinol.* 25: 147-154. 1962.
74. HALBERG, F.: "Cronobiology". *Ann. Rev. Physiol.* 31: 675-725, 1969.

75. HALBERG, F. y WISSCHER, M.B. : "Regular diurnal physiological variation in eosinophil levels in 5 stocks of mice". Proc. Soc. Explt. Biol. Med. 75: 846-847, 1950.
76. HALL, R.W. y STEINBERGER, E.: "Synthesis of LH-RH by rat hypothalamic tissue "in vitro". II effect of short-term ovariectomy and estradiol benzoate therapy". Neuroendocrinology 24: 325-332, 1977.
77. HANSON, H. y TENDIS, N.: "Darstellung von Zellbestandteilpräparationen aus Hirngewebe und ihre Peptidase-Aktivität". En Vergleich zu Niere und Leber. Z. Ges. Inn. Med. Ihre Gremzebiete 5: 224-233, 1954.
78. HEFFNER, L.J.: "<sup>3</sup>H-estradiol uptake and retention by target tissue of light-sterilized female rats". Neuroendocrinology 20: 319-327, 1976.
79. HEIL, H., MELTZER, V., KUHL, H., ABRAHAN, R. y TAUBERT, H. D.: "Stimulation of L-cystine-aminopeptidase activity by hormonal steroids and steroid-analogs in the hypothalamus and other tissues of the female rats". Fertil Steril 22: 181-187, 1971.
80. HEMMINGSEN, A.M. y KRARUP. N.B.: "Rhythmic diurnal variations in the oestrus phenomena of the rat and their susceptibility to light and dark". Kgl. Danske Videnskab. Selskab. Biol. Med. 13: 1-61, 1937.
81. HOFFMAN, J.C. y CULLIN, A.M.: "Effect of photoperiod length

- on feedback sensitivity to estradiol in the female rat". *Neuroendocrinology* 23: 285-296, 1977.
82. HÖKFELT, T. y FUXE, K.: "On the morphology and the neuroendocrine role of the hypothalamic catecholamine neurons". En *Brain-Endocrine Interaction. Media Eminence : Structure and Function*. K.M. Knigge, D. E. Scott y A. Weindl (eds.). Skarger, Basel. pp. 181-223, 1972.
83. HOOPER, K.C.: "The catabolism of some physiologically active polypeptides by homogenate of dog hypothalamus". *Biochem. J.* 83: 511-517, 1962.
84. HOOPER, K.C.: "The enzymic inactivation of some physiologically active polypeptides by different parts of the nervous system". *Biochem. J.* 88: 394-340, 1963.
85. HOOPER, K.C.: "Some observations on the behavior of hypothalamic enzymes during the time of blastocyst implantation in the rabbit". *Biochem. J.* 99: 128-132, 1966a.
86. HOOPER, K.C.: "The metabolism of oxytocin during lactation in the rabbit". *Biochem. J.* 100: 823-826, 1966b.
87. HOOPER, K.C.: " The effect of injected oestradiol benzoate on the concentrations of some peptidases in the rabbit" *Biochem. J.* 100: 37P, 1966c.
88. HOOPER, K.C.: "The effect of ovariectomy and injected oestradiol monobenzoate on polipeptide metabolism in the hypothalamus". *Biochem. J.* 110: 151-153, 1968.

89. HOPUSU-HAVU, V.K., MAKINEN, K.K. y GLENNER, G.G.: "Formation of bradykinin from kalliden-10 by aminopeptidase B ". Nature 212: 1271-1271, 1966.
90. International Unión of Biochemistry (I.U.B.): "Enzyme No - menclature". Elsevier, Pub. Comp. Amsterdam. 1965.
91. JOSEPH, S.A. y KNIGGE, K.K.: "The endocrine hypothalamus: Recent anatomical studies". En The Hypothalamus. S. Reichlin, J. Baldessarini y J.B. Martin (eds.). Raven Press, New York. pp' 15-47, 1978.
92. KAPPERS, J.A.: "The development topographical relations and inervation of the epiphýsis cerebri in the albino rat". Z. Zellforsch. 52: 163-215, 1960.
93. KAPPERS, J.A., SMITH, A.R. y de VRIES, R.A.C.: "The mammalian pineal gland and its control of hypothalamic activity". En Progress in Brain Research. D. F. Swaab y J. P. Schadé (eds.). Elsevier, Amsterdam, Oxford. Vol. 41 pp. 149-174, 1974.
94. KAWAKAMI, M., SETO, K. y YOSHIDA, K.: "Influence of the limbic system on ovulation and on progesterone and oestrogen formation in rabbit's ovary". Jap. J. Physiol. 16: 254- 266, 1966.
95. KAWAKAMI, M., TERASAWA, E., SETO, K. y WAKABAYASHI, K.: "E ffect of electrical stimulation of the medial preoptic area on hypothalamic multiple unit activity in relation



- to LH release". *Endocrinol. Jap.* 18: 13-28, 1971.
96. KEILOVA, H. y KEIL, B.: "Isolation and specificity of the cathepsin B". *FEBS letters* 4: 2950298, 1969.
97. KIES, M.W. y SCHWIMMER, S.: "Observations on proteinase in brain". *J. Biol. Chem.* 145: 685-691, 1942.
98. KITAY, J.I.: "Effects of pinealectomy on ovary growth in immature rats". *Endocrinology* 54: 114-116, 1954.
99. KLEIN, D.C.: "Circadian rhythms in indole metabolism in the rat pineal gland". En *The Neurosciences Third Study Programme*. F.O. Schmidt (ed.). MIT Press, Cambridge, Massachusetts. pp. 509-515, 1974.
100. KLEIN, D.C.: "The pineal gland: a model of neuroendocrine regulation". En *The Hypothalamus*. S. Reichlin, R.J. Baldessarini y J.B. Martin (eds.). Raven Press, New York, Vol. 56. pp. 303-327, 1978.
101. KLEIN, D.C. y WELLER, J.L.: "Indole metabolism in the pineal gland. a circadian rhythm in N-acetyltransferase activity". *Science* 177: 532-533, 1970.
102. KLEIN, D.C. y WELLER, J.L.: "The role of N-acetylserotonin in the regulation of melatonin production". En *International Congress Series*. Excerpta Medica, Amsterdam, 256: 52, 1972.
103. KLEIN, D.C. y YUWILER, A.: "Beta-adrenergic regulation of indole metabolism in the pineal gland". En *Frontiers*

in Catecholamine Research. E. Usdin y S. Snyder (eds.)  
Pergamon Press, London. pp. 321, 1973.

104. KLEIN, D.C., BERG, G.R. y WELLER, J.: "Melatonin synthesis: Adenosina 3'-5' monophosphate and norepinephrine stimulate N-acetyltransferase". Science 168: 979-980, 1970.
105. KORDON, C. y GOGAN, F.: "Donnés récentes sur les mécanismes de contrôle hypothalamique des fonctions gonadotropes". Ext. Arch. Anat. Hist. Emb. Nor. Exp. 51: 389 - 397, 1968.
106. KOVES, K. y HALÁSZ, B.: "Data on the location of the neural structures indispensable for the occurrence of ovarian compensatory hypertrophy". Neuroendocrinology 4: 1-11, 1969.
107. KRIEGER, D.T.: "Effect of enucleation and altered lighting regimens at various ages on the circadian periodicity of plasma corticosteroid levels in the rat". Endocrinology 93: 1077-1091, 1973.
108. KRIVOVY, W.A. y KROEGER, D.: "The preservation of bradykinin phenolthiathines "in vitro" ". Brit. J. Pharmacol. 22: 329-341, 1964.
109. LABHSATWAR, A.P.: "Influence of progesterone on pituitary content of LH and FSH in the female rat". Anat. Record. 160: 380-389, 1968.

110. LAJTHA, A.: "Observations of protein catabolism in brain".  
En Regional Neurochemistry. S.S. Kety y J. Elkes (eds)  
Pergamon Press, London. pp. 25-36, 1961.
111. LAJTHA, A.: "Protein metabolism of the nervous system".  
Int. Rev. Neurobiol. 6: 1-98, 1964.
112. LAWTON, I.C. y SCHWARTZ, N.B.: "Pituitary LH content in  
rats exposed to continuous illumination". Endocrinolo  
gy 77: 1140-1142, 1965.
113. LAWTON, I.C. y SAWYER, C.H.: "Role of amygdala in regula-  
ting LH secretion in the adult rat". Amer. J. Phy -  
siol. 218: 622-626, 1970.
114. LOVERDE, A.W. y LEHRER, G.M.: "Subcelular distribution of  
isocitrate dehydrogenases in neonatal and adult mouse  
brain". J. Neurochem. 20: 441-448, 1973.
115. LOWRY, O., ROSENBROUGN, N., FARR, L. y RANDALL, R.: "Pro-  
tein measurement with the Folin phenoltreagent". J.  
Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.
116. LUINE, V.N.m KHYLCHEVSKAYA, R.I. y MCEWEN, B.S. : "Oes -  
trogen effects on brain and pituitary enzyme activi-  
ties". J. Neurochem. 23: 925-934, 1974.
117. MANOCHA, S.L. y SHANTHA, T.R.: "Enzyme histochemistry of  
the nervous system". En The Structure and Function  
of Nervous Tissue. G. H. Bourne (ed.). Academic Press,  
New York, London. Vol. II Structure II and Physiolo-

- gy. pp. 137-240, 1969.
118. MARKS, N. y LAJTHA, A.: "Separation of acidic and neutral proteinase of brain". *Biochem. J.* 97: 74-83, 1965.
119. MARKS, N. y LAJTHA, A.: "Protein and polypeptide break - down". En *Handbook of Neurochemistry*. A. Lajtha (ed.) Plenum Press, New York. Vol 5A Metabolic Turnover in the Nervous System. pp. 49-139, 1971.
120. MARKS, N., DATTA, R.K. y LAJTHA, A.: "The relationship aminopeptidase and arylamidase to protein breakdown in the brain". En *Macromolecules and Nervous System*. Z. Lodin (ed.). Excerpta Medica. Amsterdam. 1968a.
121. MARKS, N., DATTA, R.K. y LAJTHA, A.: "Partial resolution of brain arylamidases and aminopeptidases". *J. Biol. Chem.* 243: 2882-2889, 1968b.
122. MARKS, N., GALOYAN, A., GRZYBAUM, A. y LAJTHA, A.: "Protein and peptide hydrolases of the rat hypothalamus and pituitary". *J. Neurochem.* 22: 735-739, 1974.
123. MARSHALL, F.H.A.: "On the change over in the estrous cycle in animal after transference across the equator, with further observation on the incidence of breeding seasons and the factors controlling sexual periodicity". *Proc. Roy. Soc. B.* 122: 413-422, 1937.
124. MARTINI, L., FRANCHINI, F. y MOTTA, M.: "Neural control of anterior pituitary functions: the pharmacology of

- puberty". En Recent Progress in Hormone Research. E. B. Astowood (ed.). Academic Press, New York. pp. 439-485, 1968a.
125. MARTINI, L., FRANSCHINI, F. y MOTTA, M.: "Comments on " long" and "short" feedback loops". En Endocrinology and Human Behaviour. R.P. Michael (ed.). Spronger, Berlin. pp. 175-187, 1968b.
126. MASON, C.A., SPARROW, N. y LINCON, D.W.: " Structural features of the retinohypothalamic projection in the rat during normal developement". Brain Res. 132: 141-148, 1977.
127. MATSUNGA, M., SAITO, N., KIRA, J., OGINO, K. y TAKAGASU, M.: "Acid angiotensinase as a lysosomal enzyme". Jap. Circu. J. 32: 137-150, 1968.
128. McCANN, S.M., DHARIVAL, A.P.S. y PORTER, J.C.: "Regulation of the adenohypophysis". Ann. Rev. Physiol. 30: 589-640, 1968.
129. McEWWN, B.S., ZIGMOND, R.E. y GERLACH, J.L.: "Sites of steroid binding and action in the brain". En The Structure and Function of Nervous Tissue. G.H. Bourne (ed.). Academic Press, New York, London. Vol. V Structure III and Physiology III. pp. 205-291, 1972.
130. McEWEN, B.S., KREY, L.C. y LUINE, V.N.: "Steroid hormone action in the neuroendocrine system: When in the genou

me involved?" En The Hypothalamus. S. Reichlin, R.J. Baldessarini y J.B. Martin (eds.). Raven Press, New York. pp. 255-268, 1978.

131. McGEER, E.G. y McGEER, P.L.: "Circadian rhythm in tyrosine hydroxylase". Science 153: 73-74, 1966.
132. McILWAIN, H. y BACHELARD, H.S.: "Piruvate metabolism and oxidative phosphorylation". En Biochemistry and the Central Nervous System. M. McIlwain y H.S. Bachelard (eds.). Churchill, Livingstone, Edinburgh, London. pp. 125-150, 1971.
133. MENNIS, S. y GORSKI, R.: " Effects of ovarian steroids on plasma LH in normal and persistent estrous adult female rats". Endocrinology 96: 486-491, 1975.
- 134, MESS, B. y MARTINI, L.: "The central nervous system and secretion of anterior pituitary trophic hormones". En Recent Advances in Endocrinology. 8th ed. V.H. T. James (ed.). Churchill, London. pp. 1-49, 1968.
135. MESS, B., ZANISI, M. y TIMA, L.: "Site of production of releasing and inhibiting factors". En The Hypothalamus. L. Martini, M. Motta y F. Franschini(eds.). Academic Press, New York. pp. 259-276, 1970.
- 136, METRIONE, R.M., NEVES, A.G. y FRUTON, J.S.: "Purification and properties of dipeptidyl transferase (Cathepsin C) ". Biochemistry 5: 1597-1694, 1966.

137. MOGUILEVSKY, J.A.: "Oxidative activity of different hypothalamic areas during sexual cycle in rats". *Acta Physiol. Latin. Am.* 15: 423-424, 1965.
138. MOGUILEVSKY, J.A.: "Effects of gonadotrophins on the oxidative metabolism of hypothalamus". En *Influence of Hormones on the Nervous System. Proc. Int. Soc. Psychoneuroendocrinology. Brooklyn 1970. Karger, Basel.* pp. 366-377, 1971.
139. MOGUILEVSKY, J.A. y MALINOW, M.R.: "Endogenous oxygen uptake of the hypothalamus in female rats". *Am. J. Physiol.* 206: 855-857, 1964.
140. MOGUILEVSKY, J.A., SCHIAFFINI, O. y FOGLIA, V.: "Effect of castration on the oxygen uptake of different parts of hypothalamus". *Life Sci.* 5: 447-452, 1966.
141. MONTILLA, P., BELLIDO, M.C., DORADO, M.L., MUÑOZ, R. y MUÑOZ, M.C.: "Efecto de la lesión del complejo amigdalino sobre la actividad L-leucinaminopeptidasa (LAP) hipotalámica en la rata macho castrada". *Rev. Fac. Med. Sevilla* 31: 347-356, 1974.
142. MOORE, R.Y. y EICHLER, V.V.: "Central neural mechanism in diurnal rhythm regulation and neuroendocrine responses to light". *Psychoneuroendocrinology* 1: 265-279, 1976.
143. MOORE, R.Y. y KLEIN, D.C.: "Visual pathways and the cen-

- tran neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity". Brain Res. 71: 17-33, 1974.
144. MOORE, R.Y. y LENN, N.J.: "A retinohypothalamic projection in the rat". J. Comp. Neurol. 164: 1-14, 1972.
145. MOTTA, M., FRASCHINI, F., GIULIANI, G. y MARTINI, L.: "The central nervous system, estrogen and puberty". Endocrinology 83: 1101-1107, 1968.
146. MOTTA, M., FRASCHINI, F. y MARTINI, L.: " "Short" feedback mechanism in the control of anterior pituitary function" En Frontiers in Neuroendocrinology. W.F. Ganong y L. Martini (eds.). Oxford, University Press, New York. pp. 215-253, 1969.
147. MOTTA, M., PIVA, F. y MARTINI, L.: "The hypothalamus as center of endocrine feedback mechanism". En The Hypothalamus. L. Martini, M. Motta y F. Fraschini (eds.) Academic Press, New York. pp. 463-489, 1970.
148. MOTTA, M., PIVA, F. y MARTINI, L.: "New finding on the central control of gonadotrophin secretion". J. Reprod. Fert. Suppl. 20: 27-42, 1973.
149. NACHLAS, M.M., GOLDSTEIN, T.P. y SELOQMAN, A.M.: "A evaluation of aminopeptidase specificity with seven chromogenic substrates". Arch. Biochem. Biophys. 97: 223-231, 1962.



150. NAGEL, W., WILLIG, F. y SCHMIDT, F.H.: "Über die Aminosäurearylamidase-(sog leucinaminopeptidase-) Aktivität im menschlichen Serum". Klin. Wschr. 42: 447-449, 1964.
151. NAIK, D.V.: "Immuno histochemical localization of LH-RF during different phases of estrus cycle of rat, with reference to the preoptic and arcuate neurons and the ependymal cells". Cell. tissue Res. 173: 143-166, 1976.
152. NISHINO, H., KIYOMI, K. y BROOCKS, C.M.: "The role of supraquiasmatic nuclei of the hypothalamus in the production of circadian rhythm". Brain Res. 112: 45-59, 1976.
153. OJA, S.S. y OJA, H.: "Cerebral proteinases in the growing rat". J. Neurochem. 17: 901-912, 1970.
154. OJEDA, S.R. y RAMIREZ, V. D.: "Automatic control of LH and FSH secretion by short feedback circuit in immature rats". Endocrinology 84: 786-797, 1969.
155. PALLADIN, A.V.: "Distribution of enzymes among various subcellular units of the brain". En Regional Neurochemistry. S.S. Kety y J. Elkes (eds.). Pergamon Press, London, pp. 8-18, 1961.
156. PALLADIN, A.V., POLYAKOVA, N.M. y LISHKO, V.K.: "Purification of brain proteinase". J. Neurochem. 10: 187-194, 1963.
157. PARLOW, A.F.: "Bioassay of pituitary luteinizing hormone by depletion of ovarian ascorbic acid". En Human Pi -

- tuitary Gonadotrophins. A. Albert (ed.). Thomas, Springfield, Illinois. pp. 300-310, 1961.
158. PAVEL, S. y PETRESCU, S.: "Inhibition of gonadotrofin by a highly purified pineal peptide and by synthetic arginine vasotocin". Nature(Lond.) 212: 1054, 1966.
159. PINCUS, G.: "A diurnal rhythm in the excretion of urinary ketosteroids by young men". J. Clin. Endocrinol. Metab. 3: 195-199, 1943.
160. POPE, A. y ANFINSEN, C.B.: "Histochemical distribution of peptidase activity in the central nervous system of the rat". J. Biol. Chem. 173: 305-311, 1948.
161. POUMEAU-DELILLE G.: "Techniques biologiques on endocrinologie experimentale chez le rat". Masson y Cie, Paris. 1953.
162. PRICE, V.E., MEISTER, A., GILBERT, J.B. y GREENSTEIN, J. P.: "Separation of dehydropeptidases and analogous L and D-peptidases". J. Biol. Chem. 181: 535-547, 1947.
163. PUNN, J.Y. y LOMBROZO, L.: "Microelectrophoresis of brain and pineal proteins in polyacrylamide gel". Analyt. Biochem. 9: 9-20, 1964.
164. QUAY, W.B.: "Circadian rhythm in rat pineal serotonin and its modifications by estrous cycle and photoperiod". Gen. Comp. Endocrinol. 3: 473-479, 1963.
165. RALPH, C.L., HULL, D., LYNCH, H.J. y HEDLUND, L.: "A me-

- latonin rhythm persists in rat pineals in darkness".  
Endocrinology 89: 1361-1366, 1971.
166. REITER, R. J.: "Pineal and associated neuroendocrine rhythms". *Psychoneuroendocrinology* 1: 255-263, 1976.
167. REITER, R.J.: "Photoperiod pineal and reproduction". En *The Pineal- 1977. Annual Research Reviews*. D.H. Horrobin(ed.). Eden Press, Great Britain. pp. 71-79, 1977.
168. RETHELYI, M. y HALÁSZ, B.: "Origin of the nerve ending in the surface zone of the median eminence of the rat hypothalamus". *Exp. Brain. Res.* 11: 145-158, 1970.
169. RIEKKINEN, P.J. y CLAUSEN, J.: "Proteinase activity of myelin". *Brain Res.* 15: 413-430, 1969.
170. ROMERO, J.A. y AXELROD, J.: "Pineal  $\beta$ -adrenergic receptor: diurnal variation in sensitivity". *Science* 184: 1091-1092, 1974.
171. ROMERO, J.A. y AXELROD, J.: "Pineal beta-adrenergic receptor: Regulation of sensitivity". En *Pre- and Post-synaptic receptors*. E. Usdin y W. E. Bunney (eds.). Marcel Dekker, INC. New York. pp. 265-282, 1975.
172. ROSNER, J.M., DENARU, J.H., CASTROOVAZQUEZ, A., NAGLE, C. A., NEUSPILLER, N.R., BEDES, G.D., PEDROZA, E., MARTIN, J.L. y GOMEZ, E.: "Oestrogen uptake by the central nervous system". En *Hormones and Antagonists*. P.D. Hubinont, S.M. Hendeles y P. Preumont (eds.). Karger,

- Basel. pp. 30-42, 1972.
173. ROWAN, W.: "Reaction of light to bird migration and development changes". *Nature* 115: 494-495, 1925.
174. SAWYER, C.H.: "Functions of the amygdala related to the feedback actions of gonadal steroid hormones". En *Neurobiology of the Amigdala*. B.E. Eleftheriou (ed.) Plenum Press, New York. pp. 745-762, 1972.
175. SCHALLY, A.V., ARIMURA, A., BABA, Y., NAIR, R.M.G., MATSUO, H., REDDING, T.W., DEBELJUK, L. y WHITE, W.F.: "Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43: 393-399, 1971.
176. SCHIAFFINI, O. y MARIN, B.: "Effect of ovariectomy on the hypothalamus and the limbic system of the rat". *Neuroendocrinology* 7: 302-307, 1971.
177. SCHIAFFINI, O., MOGUILEVSKY, J.A., GARCIA ARGIZ, C.A. y LIBERTUN, C.: "Effect of castration on the succinate oxidation and succinic dehydrogenase in rat hypothalamus". *Acta Physiol. Latino Am.* 18: 351-354, 1968.
178. SCHOOT, P. van der.: "An evaluation of the acute effects of electrochemical stimulation of limbic structures on ovulation in cycle female rat". En *Integrative Hypothalamic Activity. Progress in Brain Research*. D. F. Swaab y J.P. Schadé (eds.) Elsevier, Amsterdam,

Oxford, New York. pp. 363-370, 1974.

179. SCHWARTZ, N.B. y BARTOSIK, D.: "Changes in pituitary LH content during the rat estrous cycle". *Endocrinology* 71: 756-762, 1962.
180. SCHWARTZ, N.B. y McCORMACK, C.E.: "Reproduction: gonadal function and its regulation". *Ann. Rev. Physiol.* 34: 425-472, 1972.
181. SHIBUYA, H., TORU, M. y WATANABE, S.: "A circadian rhythm of tryptophan hydroxylase in the rat pineals". *Brain Res.* 138: 364-368, 1978.
182. SORRENTINO, S. y BENSON, B.: "Effects of blinding and pinealectomy on the reproductive organs of adult male and female rats". *Gen. Comp. Endocrinol.* 15: 242-246, 1970.
183. SMITH, A.R.: "Conditions influencing the serotonin and tryptophan metabolism in the epiphysis cerebri of the rabbit; a fluorescence histochemical and electrophoretic study". *Med. Thesis. Univ. of Amsterdam. Nooy, Purmerend.* 1972.
184. SMITH, A.R., JONGKIND, J.F. y KAPPERS, J.A.: "Distribution and quantification of serotonin-containing and autofluorescent cells in the rabbit pineal organ". *Gen. Comp. Endocrinol.* 18: 364-372, 1972.
185. SMITH, S.W. y LAWTON, I.E.: "Involvement of the amigdala

in the ovarian compensatory hypertrophy response". Neuroendocrinology 9: 228-234, 1972.

186. SNYDER, S.H., ZWEIG, M., AXELROD, J. y FISCHER, J.E.: "Control of the circadian rhythm in serotonin content of the pineal gland". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53: 301-303, 1965.
187. STEELMAN, S.L. y POHLEY, F.P.: "Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotrophin". Endocrinology 53: 604-616, 1953.
188. STETSON, M.H. y WATSON-EHITMYRE, M.: "Nucleus supraquiasmaticus: the biological clock in the hamster". Science 191: 197-199, 1976.
189. SUNDBERG, D.K. y KNIGGE, K.M.: "Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) production and degradation by rat medial basal hypothalami in vitro". Brain Res. 139: 89-99, 1978.
190. SWANSON, L.W. y COWAN, W.M.: "The efferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus". J. Comp. Neurol. 160: 1-12, 1975.
191. SWANSON, L.W.: "An autoradiographic study of the efferent connections of the preoptic region in the rat". J. Comp. Neurol. 167: 227-256.
192. SZE-CHUH CHENG, : "The tricarboxylic acid cycle". En Hand

book of Neurochemistry. A. Lajtha (ed.). Plenum Press, New York, London. Vol. V Metabolic Turnover in the Nervous System. pp. 283-315, 1971.

193. TAUBERT, H.D., HEIL, H. y KUHL, H.: "Untersuchungen über die Wirkung von Athinylöstradiol auf die L-cystin-amino-peptidase-Aktivität im Hypothalamus der weiblichen Ratte". En Endokrinologie der Entwicklung un Reifung. 16 Symposium Deutsch. Gesellsch, Edokr. Springer, Berlin. pp. 288-289, 1970.
194. TERASAWA, E. y SAWYER, C.H.: "Changes in electrical activity in the rat hypothalamus related to stimulation of adenohipophyseal function". Endocrinology 85: 143-149, 1969.
195. THIBAUT, C., COUROT, M., MARTINET, L., MAULEON, P., du MESNIL du BUISSON, F., ORTOVANT, R., PELLETIER, J. y SIGNORET, J.: " Regulation of breeding season and estrous cycles by lighth and external stimuli in some mammals". J. Anim. Sci. suppl. 25: 119-142, 1966.
196. TUREK, F.W., ALVIS, J.D. y MENAKER, M.: "Pituitary responsiveness to LRF in castrate male hamsters exposed to different photoperiodic conditions". Neuroendocrinology 24: 140-146, 1977.
197. UZMAN, L.L., RUMLEY, M.K. y Van den NOORT, S.: "The substrate specificity of mouse brain peptidase activity".

- J. Neurochem. 6: 299-310, 1961.
198. UZMAN, LL., Van den NOORT, S. y RUMLEY, M.K.: "Properties and classification of some brain peptidases". J. Neurochem. 9: 241-252.
199. VAUGHAN, M.K., BENSON, B. y NORRIS, J.J.: "Inhibition of compensatory ovarian hypertrophy in mice by 5-hydroxytryptamine and melatonin". J. Endocrinol. 47: 397-398, 1970.
200. VELASCO, M.E. y TALEISNIK, S.: "Release of gonadotrophins induced by amigdaloid stimulation in the rat". Endocrinology 84: 132-139, 1969a.
201. VELASCO, M.E. y TALEISNIK, S.: "Effect of hippocampal stimulation on the release of gonadotrophin". Endocrinology 85: 1154-1159, 1969b.
202. WAELSCH, H. y LAJTHA, A.: "Protein metabolism in the nervous system". Physiol. Revs. 41: 709-736, 1961.
203. WENISCH, H.J.: "Retinohypothalamic projection in the mouse: electron microscopic and iontophoretic investigations of hypothalamic and optic centers". Cell. Tiss. Res. 167: 547-561, 1976.
204. WHEATON, J.E., KRULICH, L. y McCAAN, S.M.: "Differential effects of hypothalamic deafferentation upon luteinizing hormone-releasing hormone in the median eminence and organum vasculosum of the lamina terminalis".



Endocrinology 97: 1597-1600, 1975.

205. WILLIAMS-ASHMAN, H.G. y REDDI, A.H.: "Actions of vertebrate sex hormones". Ann. Rev. Physiol. 33: 31-82, 1971.
206. WOLFSON, S.H. y WILLIAMS-ASHMAN, H.G.: "Serum TPN-specific enzymes in liver disease". Proc. Soc. Expl. Biol. Med. 96: 231-234, 1957.
207. WURTMAN, R.J.: "Effects of light and visual stimuli on endocrine function". En Neuroendocrinology. L. Martini y W.F. Ganong (eds.). Academic Press, New York, London. pp. 19-59, 1967.
208. WURTMAN, R.J.: "Pineal hormones". En Handbook of Neurochemistry. A. Lajtha (ed.). Plenum Press, New York. Vol 4 Control Mechanism in the Nervous System. pp. 451-461, 1971.
209. WURTMAN, R.J., AXELROD, J. y KELLY, D.E.: The Pineal. Academic Press, New York. 1968.
210. YALOW, R.S. y BERSON, S.A.: "Effect of X-rays on trace-labeled  $I^{131}$  - insulina and its relevance to biologic studies with  $I^{131}$ - labeled proteins". Radiology 66: 106-111, 1956.