

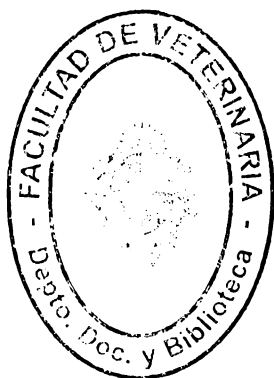
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

EFFECTO DE LOS ESTEROIDES SEXUALES SOBRE SUS RECEPTORES, EL RECEPTOR DE ACTH Y LA PROTEÍNA STAR EN LA GLÁNDULA ADRENAL DE OVINOS GONAECTOMIZADOS

por

Andrés LÓPEZ GAMBETTA



TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD ENSAYO EXPERIMENTAL

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2009**

SECRETARÍA DE VETERINARIA
CARRERAS DE VETERINARIA
MONTES DE ORO 1451
9100 Montevideo, Uruguay

TG 159
Efecto de los



FVI/28452

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de mesa:



Dr. Daniel Cavestany

Segundo miembro:



Dra. Elize van Lier

Tercer Miembro:



Dr. Alejandro Bielli

Cuarto miembro:



Dra. Ana Meikle


Fecha: 5 de noviembre del 2009

Autor:



Br. Andrés López

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con 11 (once) 

28.452

AGRADECIMIENTOS

A **mis padres y hermana** por el apoyo que siempre me han dado en todo momento de mi vida.

Elize van Lier, mi tutora, por ayudarme a poder culminar con esta carrera y ayudarme cuando la necesité con la tesis.

Beatriz Carracelas y Nelson Villegas, sin la ayuda de ellos el trabajo de campo no hubiese sido posible.

A **Ana Meikle** por poner a disposición el Laboratorio de Técnicas Nucleares para los análisis de las muestras.

A **Mariana Carriquiry**, por el tiempo dedicado a poner a punto la metodología en la glándula adrenal y el análisis de las muestras.

Y un especial agradecimiento para **Andrea Quintas**, quien siempre está a mi lado y me da ha dado soporte necesario para poder terminar facultad.

TABLA DE CONTENIDO

Aprobación de Tesis de Grado	II
Agradecimientos	III
Lista de Cuadros y Figuras	V
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
4.1 ESTRÉS	4
4.1.1 Concepto	4
4.1.2 Clasificación de estresores	10
4.1.3 Estrés y producción animal	11
4.2 ENDOCRINOLOGÍA	12
4.2.1 Definición	12
4.2.2 Hormonas	13
4.2.3 Clases químicas de hormonas	14
4.2.4 Regulación de síntesis y secreción	15
4.2.5 Receptores	15
4.2.6 Esteroides	17
4.2.6.1 Esteroidogénesis	17
4.2.6.2 Progesterona	21
4.2.6.3 Testosterona	22
4.2.6.4 Estradiol	22
4.2.6.5 Cortisol	23
4.3 EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL (HHA)	25
4.3.1 Glándula Adrenal	25
4.3.2 Glándula Hipófisis	27
4.3.3 Hipotálamo	28
4.3.4 Actividad del eje HHA	29
4.4 DIFERENCIAS SEXUALES EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS	30
4.4.1 Estrés en cameros	34
4.4.2 Estrés en ovejas	34
5. OBJETIVO	35
6. HIPOTESIS	35
7. MATERIALES Y MÉTODOS	35
7.1 Condiciones de trabajo	35
7.2 Animales	35
7.3 Diseño experimental	36
7.4 Análisis hormonales	37
7.5 PCR de transcripción reversa en tiempo real	37
7.6 Análisis estadístico	38
8. RESULTADOS	39
8.1 Testosterona	39
8.2 Estradiol	39
8.3 Peso adrenal absoluto y relativo	39
8.4 Abundancia relativa de transcritos MC2R, RE α , RA y StAR	39
9. DISCUSIÓN	42
10. CONCLUSIONES	44
11. BIBLIOGRAFIA	45

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

FIGURAS

Figura 1: Acción de una hormona esteroidea	16
Figura 2: La molécula de colesterol	18
Figura 3: La vía de la biosíntesis de esteroides adrenocorticales en mamíferos mayores	20
Figura 4: Representación esquemática de la unidad Hipotálamo-Hipófisis	28
Figura 5: Esquema del cronograma del experimento	36
Figura 6: Expresión relativa de los genes MC2R, AR, ER α y StAR en ovinos gonadectomizados con o sin reemplazo de esteroides sexuales	41

CUADROS

Cuadro 1: Peso vivo (Kg) y condición corporal promedios (\pm EEM) para los carneros y las ovejas antes del sacrificio	36
Cuadro 2: Primers usados para la cuantificación de ADNc de los genes de interés y los genes de control endógeno	38
Cuadro 3: Media (\pm EEM) de las concentraciones de testosterona (nmol/L) en carneros castrados tratados con CT 72 horas antes del sacrificio y media (\pm EEM) de las concentraciones de 17 β -estradiol (pmol/L) en ovejas ovariectomizadas tratadas con BE 72 horas antes del sacrificio	39
Cuadro 4: Medias (\pm EEM) de peso adrenal absoluto (mg) y peso adrenal relativo (mg de tejido adrenal/kg de peso corporal) en ovinos de acuerdo al sexo y reemplazo hormonal.	39
Cuadro 5: Media (\pm EEM) de los ciclos umbral para cada uno de los genes estudiados y los genes de control endógeno.	40
Cuadro 6: Valores de P	40
Cuadro 7: Correlaciones entre los transcritos estudiados entre sí y con las concentraciones de testosterona y 17 β -estradiol	41

1. RESUMEN

La activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal inducida por el estrés difiere entre los sexos en una variedad de especies. Estas diferencias parecen implicar todos los niveles del eje, y es comúnmente aceptado que los esteroides sexuales son en parte responsables de estas diferencias sexuales. El objetivo de esta tesis fue evaluar en qué medida el sexo y el ambiente esteroideo afecta la abundancia relativa de los transcritos (ARNm) de los receptores de estrógeno (RE α), andrógenos (RA), y de ACTH (MC2R), y de la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR) en la glándula adrenal de ovinos gonadectomizados con y sin reemplazo hormonal. Se utilizaron dieciséis ovinos de la raza Corriedale de diferente procedencia, de los cuales ocho eran ovejas adultas ovariectomizadas y ocho eran carneros orquiectomizados. Para cada sexo se formaron dos grupos (control y tratado con esteroides sexuales) tomando en cuenta el momento de gonadectomía y el peso vivo. Cuatro ovejas recibieron Benzoato de Estradiol im y cuatro carneros recibieron de Ciclopentilpropionato de Testosterona im. Se tomaron muestras de sangre mediante venipunción de la vena yugular, a diferentes horas, para corroborar la efectividad de los tratamientos hormonales y luego de la última muestra se sacrificaron a los animales para obtener las glándulas adrenales. Los tratamientos realizados con esteroides sexuales de reemplazo fueron efectivos en aumentar las concentraciones de estradiol en las ovejas y de testosterona en los carneros. El peso relativo de las glándulas adrenales fue mayor en ovejas ovariectomizadas que en carneros orquiectomizados ($P=0.0002$), y no fue afectado por los esteroides sexuales. Para la abundancia relativa del transcrito de RA el efecto del sexo tendió a ser significativo ($P=0.0844$), el efecto del reemplazo con esteroides no fue significativo, pero la interacción sexo*reemplazo con esteroides fue significativo ($P=0.0143$). Los efectos del sexo y del reemplazo con esteroides sobre los transcritos de MC2R y RE α no fueron significativos, pero su interacción sí lo fue ($P=0.0209$ y $P=0.0438$, respectivamente). La abundancia relativa del transcrito de StAR no fue diferente entre los distintos grupos. El estradiol y la testosterona modificaron la expresión de proteínas receptoras en la glándula adrenal de ovinos, sugiriendo la posibilidad de un rol regulativo en la secreción de cortisol. Se confirmó la expresión del receptor de estrógenos α en la glándula adrenal ovina, y posiblemente este sea el primer reporte de la expresión del receptor de andrógenos en la adrenal ovina.

2. SUMMARY

The stress-induced activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis differs between sexes of various species. These differences seem to be present at each level of the axis, and are generally accepted to be partly due to sex steroids. The aim of this thesis was to evaluate to what extent sex and steroid environment affect the relative abundance of the transcripts (ARNm) of oestrogen α (ER α), androgen (AR) and ACTH (MC2R) receptors, and of the steroid acute regulatory (StAR) protein in the adrenal glands of gonadectomised sheep with and without sex steroid replacement. Sixteen Corriedale sheep of different origin were used, of which eight were orchietomised rams and eight were ovariectomised ewes. Two groups within each sex were formed (control and treated with sex steroids) taking into account time of gonadectomy and live weight. Four ewes received Oestradiol Benzoate im and four rams received Testosterone Cyclopentilpropionate im. Blood samples were taken from the jugular vein, at different time points, to check the effectiveness of the hormone treatments and after the last samples the animals were slaughtered in order to obtain the adrenal glands. The sex steroid replacement treatments effectively increased the concentrations of oestradiol in the ewes and testosterone in the rams. The relative adrenal weight was higher in ovariectomised ewes than in orchietomised rams ($P=0.0002$), and was not affected by the sex steroids. The effect of sex on relative abundance of the AR transcript tended to be significant ($P=0.0844$), the effect of steroid replacement was not significant, but the interaction sex*steroid replacement was significant ($P=0.0143$). The effect of sex and of sex*steroid replacement on the transcripts of MC2R and ER α were not significant, but their interaction was ($P=0.0209$ and $P=0.0438$, respectively). The relative abundance of the StAR transcript was not different among groups. Oestradiol and testosterone affected the expression of the receptor proteins in the adrenal glands of sheep, which suggests a possible role for these steroids in the regulation of cortisol secretion. The expression of the oestrogen α receptor in the adrenal gland was confirmed, and this is possibly the first report of the expression of the androgen receptor in the sheep adrenal.

3. INTRODUCCIÓN

Debido a los importantes cambios que han ocurrido en los mercados tanto a nivel nacional como a nivel internacional de la lana y de la carne ovina en los últimos años es importante intentar comprender todo lo relacionado a la reproducción para lograr una optimización del sector ovino. Además de esto, la importante caída del stock ovino en las últimas décadas en Uruguay que ha pasado de más de veintitrés millones de animales en el año 1987 a aproximadamente diez millones de animales en el 2008 (DICOSE, 2008), lleva a que la reproducción tome una mayor importancia y por tanto el desempeño productivo de nuestro país. Por esto es importante comprender el funcionamiento fisiológico animal para lograr la optimización de la producción sin alterar el bienestar animal.

El bienestar animal adquiere día a día más relevancia a nivel mundial. Esto es consecuencia de que se ha verificado un incremento de las exigencias de los consumidores de los países de mayor poder adquisitivo por certificaciones de productos y procesos que contemplen estos aspectos (Congreso de bienestar animal: Nuevos Horizontes hacia el siglo XXI, 2007). El bienestar animal es una medida de la adaptación de los animales a su ambiente y el término involucra no solo “el estado de salud mental y físico de los animales en armonía con su ambiente” sino también a todas las prácticas de la cadena productiva, realizadas por criadores, invernadores, consignatarios, transportistas, frigoríficos, comercialización interna y externa. Hoy en día existen normas y estándares que tienden a asegurar el bienestar animal en diversos países, como son Unión Europea, EEUU, Nueva Zelanda, Australia, Canadá, Argentina y Uruguay. Las mismas parten de la base que el bienestar animal estaría regido por el cumplimiento de cinco libertades (Del Campo, 2006):

- Libre de hambre, sed y desnutrición
- Libre de dolor y enfermedades
- Libre de miedo y angustia
- Libre de tener incomodidad (molestias físicas, térmicas y estrés)
- Libre para manifestar su comportamiento natural

Una buena comprensión del estrés y de lo que provoca el estrés es importante para evaluar el bienestar animal. El estrés puede ser considerado como una alteración percibida o real de la homeostasis (Munck y col., 1991 citados por Van Lier, 2003a). Los animales pueden sufrir muchos factores estresantes (estresores) derivados de la interacción de los animales con los humanos, con otros animales y/o el ambiente. El estrés debido a las medidas de manejo afecta sistemas y funciones del organismo que redundan en baja tasa de procreo y señalada (Dobson y col., 2000, citados por Smith y Dobson, 2002). Los ovinos responden al estrés de forma diferente de acuerdo al sexo y esto se relaciona con los niveles de esteroides sexuales en sangre (Tilbrook y col., 1999; Turner y col., 2002; Van Lier y col., 2003a,b). Los efectos del estrés se median en diferentes sitios, en ambos sexos se ha demostrado que los productos del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal inhiben la función reproductiva. La adrenal es la clave en la respuesta al estrés y en esta tesis se evaluará el efecto del sexo sobre su función.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 ESTRÉS

4.1.1 Concepto

El ser vivo altamente desarrollado es un sistema abierto que tiene muchas relaciones con su ambiente. Los cambios en el ambiente provocan reacciones en este sistema, o lo afectan directamente, produciendo disturbios en sistema interno. Tales disturbios se guardan normalmente dentro de límites estrechos, debido a la puesta en acción de ajustes automáticos en el sistema, y de tal modo se previenen las oscilaciones amplias y las condiciones internas se mantienen bastante constantes. Las reacciones fisiológicas coordinadas que mantienen la mayor parte de los estados constantes en el cuerpo son tan complejas, y son tan peculiares al organismo vivo, que se ha sugerido (Cannon, 1926 citado por Cannon, 1929) una designación específica para estos estados, es la llamada homeostasis (Cannon, 1929). La homeostasis implica que las variables fisiológicas bajo control se mantengan en su punto de ajuste. Esta definición se refiere de una manera general al equilibrio que existe entre el animal y su alrededor (Korte y col., 2007).

Se han dado muchas definiciones de estrés a lo largo de los años, y se ha explicado, en referencia al concepto de Selye (1946, citado por Van Lier, 1998), de la siguiente manera: la exposición a factores ambientales nocivos (estresores) provocan una reacción inespecífica. Esta reacción (estrés) se caracteriza por un aumento de la actividad hipófisis-adrenal y facilita el retorno a la homeostasis (Dantzer y Mormède, 1983).

Las reacciones al estrés según Selye (1946, citado por Van Lier, 1998) comprenden una fase inicial llamada "reacción general de alarma", la cual ocurre independientemente de la naturaleza de los estímulos y que es caracterizada por un aumento en el tamaño de la glándula adrenal. A la reacción de alarma le continúa un período de resistencia, el "síndrome general de adaptación", durante el cual las adrenales retornan a su estado normal, siempre que el estímulo sea retirado o su intensidad reducida. Si por el contrario, el estímulo es sostenido o su intensidad es aumentada, los síntomas de la reacción de alarma retornan y puede resultar en agotamiento o incluso la muerte (enfermedad de adaptación). Selye definió el Síndrome de Adaptación General (GAS) como: "La suma de todas las reacciones sistémicas no específicas del cuerpo que resultan de una larga y continuada exposición al estrés".

El estrés puede ser considerado como una amenaza, real o percibida, a la homeostasis (Munck y col., 1984). El estrés también puede ser definido como una interrupción a la homeostasis (Rivier y Rivest, 1991). El estrés estimula una serie de respuestas adaptativas complejas y cuando éstas son inadecuadas, excesivas o prolongadas, sistemas fisiológicos, tales como la reproducción, se perturban (Tilbrook y col., 2000).

Moberg (2000) define el estrés como la respuesta biológica suscitada cuando un individuo percibe una amenaza a su homeostasis. La amenaza es el “estresor”. Cuando la respuesta al estrés realmente pone en peligro el bienestar del animal, el animal experimenta “dis-estrés” (Moberg, 2000). El estrés es parte de la vida y no es intrínsecamente malo. Todos los organismos han desarrollado mecanismos para hacer frente al estrés de su vida (Moberg, 2000). También Korte y col. (2007) dicen que no hay justificación para la asunción que la expresión de las respuestas al estrés compromete siempre la salud o el bienestar.

Los animales de campo son, al parecer, muy propensos a las desfavorables consecuencias del estrés, ya que la selección genética y la presión del ambiente han orientado su metabolismo hacia el anabolismo en lugar de mecanismos de defensa que son por esencia catabólica (Ludvigsen, 1955; Judge y col., 1966, citados por Dantzer y Mormède, 1983).

El estrés en animales de campo se puede definir como incapacidad de hacer frente al ambiente reflejado por la incapacidad de expresar su potencial genético como por ejemplo, la tasa de crecimiento, la resistencia a enfermedades, la producción de leche y la fertilidad (Dobson y col., 2000, citados por Smith y Dobson, 2002). Los efectos deletéreos del estrés están explícitos en esta definición al igual que la amplia gama de los sistemas del cuerpo que pueden ser afectados. Un estresor es un estímulo que interrumpe la homeostasis (Pacák y Palkovits, 2001). El proceso que contraría esta interrupción y que mantiene la homeostasis se llama alostasis, y puede activar una amplia gama de sistemas fisiológicos generales y específicos y mecanismos que hacen frente al estrés. La cantidad de trabajo realizado durante alostasis se llama la carga alostática y representa los costos del animal al responder al estímulo. Se compromete el bienestar animal si la carga alostática es grande o si el animal no puede enfrentar en última instancia el costo impuesto por la carga (Smith y Dobson, 2002). Los estados alterados del cerebro y de la periferia desempeñan un papel crucial en el concepto de alostasis. Ése es el porqué el concepto del alostasis es tan importante para el bienestar animal (Korte y col., 2007).

El bienestar animal es un tema en aumento de la opinión pública y en debate. Consecuentemente, muchos países están reconsiderando la manera que el bienestar animal se encaja en la legislación y las reglas para protección y el cuidado de animales. Esto requiere el acuerdo general de que el bienestar animal es “el concepto de alostasis”. En 1993 el consejo de bienestar de animales productivos del Reino Unido (Five Freedoms of the Farm Animal Welfare Council, 2006, citado por Korte y col., 2007) publicó “las cinco libertades” de bienestar animal, que describen principalmente condiciones de protección y cuidado, y fue pensado para ser una mejora sobre lo que fue recomendado originalmente por el comité de Brambell. Las “cinco libertades” formuladas y sus provisiones asociadas son: 1) Libres de hambre y de sed, por el acceso libre al agua dulce y una dieta para mantener salud completa; 2) Libre del malestar, proporcionando un ambiente conveniente incluyendo abrigo y una zona de descanso cómoda; 3) Libre de dolor, lesión y enfermedad por la prevención o por diagnóstico y tratamiento rápido; 4) Libre para expresar comportamiento normal para la especie proporcionando espacio suficiente, instalaciones apropiadas y la compañía de animales de la misma especie; y 5) Libre

de miedo y de angustia asegurando las condiciones que evitan el sufrimiento mental (Korte y col., 2007).

La libertad del dolor, de lesión o de la enfermedad es una utopía. Por ejemplo, el dolor es un mecanismo de defensa natural que ayuda a proteger organismos contra amenazas potenciales y sustancias peligrosas. El dolor, la náusea, la fiebre, el vomitar y la diarrea son productos de la selección natural. Aunque producen el sufrimiento, son los mecanismos de defensa que protegen los organismos (Williams y col., 1991, citado por Korte y col., 2007).

El estrés es un mecanismo fisiológico complicado que incorpora una gama de los procesos fisiológicos y de comportamiento que ocurren cuando hay una amenaza verdadera o percibida a la homeostasis. Mientras que está generalmente aceptado que estos procesos son adaptativos, diseñados para reestablecer la homeostasis y permitir el hacer frente, es también evidente que la activación inadecuada o excesiva y/o prolongada de los sistemas de estrés puede perturbar la función fisiológica y del comportamiento normal. Esto puede dar lugar a una gama de consecuencias adversas tales como depresión, condición deteriorada, enfermedad cardiovascular, función inmune deteriorada con vulnerabilidad creciente a enfermedades, crecimiento y función reproductiva alterada (Chamandari y col., 2005; Chrousos y col., 1998; Tilbrook y col., 2000; Tilbrook y col., 2002; Turner y col., 2002; Turner y col., 2005, citados por Tilbrook y Clarke, 2006). Los estresores son muchos y variados (p.e. el trauma psicológico, físico, quirúrgico, el ejercicio vigoroso y desnutrición) y activan varios sistemas fisiológicos, el más comúnmente estudiado es el eje de hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y el sistema simpático adrenal (Tilbrook y Clarke, 2006).

Mason (1968, 1975, citado por Moberg, 2000) demostró, que diferentes estresores dan respuestas biológicas muy diferentes. Tal vez el mayor problema en la medición de estrés son las variaciones individuales en respuesta al estrés. Incluso cuando se enfrentan con el mismo estrés, el sistema nervioso central de cada animal utilizará una combinación de respuestas al estrés para hacer frente al estresor (Moberg, 1985, citado por Moberg, 2000). Los sistemas de defensa frente a un estresor son influenciados por una variedad de factores. Estos factores pueden influir en como un animal percibe un estímulo y si considera o no el estímulo como una amenaza a su homeostasis. Además, estos son modificadores de la forma de organización de la defensa biológica del animal. Los cambios en la función biológica durante el estrés son los "costo biológico del estrés" (Moberg, 2000).

Moberg (1985, citado por Moberg, 2000) divide la respuesta al estrés animal en tres fases: el reconocimiento del estresor, la defensa biológica contra el estresor y las consecuencias de la respuesta al estrés. Es esta última etapa de la respuesta al estrés que determinará si un animal está sufriendo dis-estrés o simplemente una experiencia de un breve episodio en su vida que no tendrá ningún impacto significativo en su bienestar (Moberg, 2000).

El dis-estrés puede resultar tanto de un estrés agudo como crónico, los mecanismos fisiológicos utilizados son similares, diferenciándose por la duración del estresor (Moberg, 2000).

Un estrés agudo se considera usualmente como una exposición relativamente de corta duración a un único estresor, puede interferir en funciones biológicas principalmente por dos mecanismos: afectando eventos críticos o desviando recursos hacia otras funciones biológicas (Moberg, 2000).

El estrés crónico se produce al experimentar un estresor durante largo tiempo en forma continua, pero la mayoría de las situaciones de estrés crónico resultan de experimentar una serie de estresores agudos, que acumulan sus costos biológicos y llevan al animal hacia un estado prepatológico o patológico. (Moberg, 1985, citado por Moberg, 2000). El agotamiento de las reservas debido a la exposición repetida de un mismo estresor, puede generar un estado de dis-estrés, ya que se acumula suficiente costo biológico como para afectar otras funciones, e impide al animal recuperar sus reservas. Esta situación puede observarse también cuando aparece un segundo estresor a continuación del primero (actuando dos estresores agudos) (Moberg, 2000).

Una respuesta al estrés se inicia cuando al sistema nervioso central percibe una amenaza potencial para la homeostasis. Sólo la percepción de la amenaza es fundamental; si el estímulo en realidad es o no una amenaza importante no es fundamental. Una vez que el sistema nervioso central percibe una amenaza, se desarrolla una respuesta biológica que consiste en una combinación de las cuatro respuestas de defensa biológica: la respuesta del comportamiento, la respuesta del sistema nervioso autónomo, la respuesta neuroendócrina o la respuesta inmune (Moberg, 2000).

La primera respuesta biológicamente más económica es el comportamiento. Esta respuesta no es apropiada para todos los estresores, un animal también puede encontrarse en situaciones en las que sus opciones de comportamiento son limitadas o frustradas (Moberg, 2000).

La segunda línea de defensa animal durante el estrés es el sistema nervioso autónomo. Este sistema fue la base de la propuesta de Cannon (1929) "huir o luchar" en respuesta al estrés. Durante el estrés, el sistema nervioso autónomo afecta a un número diverso de sistemas biológicos, incluyendo el sistema cardiovascular, el sistema gastrointestinal, las glándulas exócrinas y la médula adrenal. Sin embargo, como la respuesta autonómica afecta sistemas biológicos muy específicos y los efectos biológicos son de relativamente corta duración, podría afirmarse que la activación por parte del estrés del sistema nervioso autónomo no tiene un impacto significativo en el bienestar animal a largo plazo (Moberg, 2000).

Las hormonas secretadas en el sistema neuroendócrino, hipotálamo-hipófisis tienen un amplio y prolongado efecto en el cuerpo. Prácticamente todas las funciones biológicas que se ven afectadas por el estrés, incluyéndose la inmune, reproducción, metabolismo y comportamiento, están reguladas por las hormonas hipofisarias. Sabemos que la secreción de estas hormonas hipofisarias se ven alterada, ya sea directa o indirectamente, durante el estrés (Matteri y col., 2000).

La respuesta al estrés es una cascada de acontecimientos biológicos, la naturaleza de lo que puede pasar varía entre animales. La forma para diferenciar el dis-estrés de una no-amenaza son los costos biológicos del estrés. Los animales

tienen mecanismos para hacer frente a corto plazo al estrés. Si el estrés es mínimo, el costo biológico es mínimo, porque las reservas de los recursos biológicos son suficientes para hacer frente al estrés y cumplir con los costos biológicos de estrés. En caso de que el costo biológico se cubra por las reservas, no tiene repercusión alguna en otras funciones biológicas. Cuando no hay suficientes reservas biológicas para cubrir el costo biológico del estrés, los recursos tendrán que obtenerse de otras funciones biológicas en detrimento de éstas (Moberg, 2000).

Para la mayoría de los estresores los costos biológicos son insignificantes debido a que los estresores son de corta duración. Durante el estrés prolongado o cuando el estrés es grave, el costo biológico es significativo y el trabajo del estrés se convierte en una carga significativa para el cuerpo. Es durante este estrés que el animal entra en las próximas etapas del estrés: prepatológica y patológica (Moberg, 2000).

La etapa prepatológica se produce cuando se altera la función biológica de forma que el animal se encuentra en peligro de desarrollar patologías. El cambio en la función biológica que ocurre durante un estrés puede suprimir la respuesta inmune, volviendo a los animales susceptibles a los agentes patógenos que puedan estar presentes en el ambiente. Si los animales no resisten a estos agentes patógenos y se enferman, entran en el estado patológico. Cuanto más tiempo un animal esta estresado más tiempo el animal se encuentra en un estado prepatológico y mayor es la oportunidad de desarrollar una patología (Moberg, 2000).

La exposición previa a un estresor puede, o bien disminuir la sensibilidad al mismo estresor (tolerancia) o a otro estresor (tolerancia cruzada) que se presenta más tarde. En algunos casos, se observa una mayor reactividad (sensibilización). Estos fenómenos son fundamentales para la supervivencia de la especie (Dantzer y Mormède, 1983).

Los animales pueden sufrir muchos factores estresantes (estresores) derivados de la interacción de los animales con los humanos, animales y el ambiente. El impacto del estresor no es siempre igual sobre los animales, ya que algunos tienen la capacidad de adaptarse mejor y pueden aprender a reconocer la situación como no agresiva. Y por tanto la respuesta varía de animal a animal (Van Lier, 2003a).

Debido a la activación del sistema simpático-adrenal y así como también del eje HHA, se produce una cascada de eventos hormonales. Las catecolaminas son secretadas en cuestión de segundos desde la médula adrenal y la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y arginina vasopresina (AVP), son liberadas desde el hipotálamo. Por otro lado la CRH y AVP estimulan la hipófisis a secretar adrenocorticotropina (ACTH); esto conduce a la estimulación de la secreción de glucocorticoides (GC) por la corteza adrenal. Los GC pueden permitir, estimular, suprimir y preparar efectos sobre diferentes sistemas sobre el organismo; todo esto esta dirigido a mantener la homeostasis (Sapolsky y col., 2000). A través de la clásica regulación de retroalimentación negativa por los GC la secreción de CRH, AVP y ACTH es suprimida y la actividad de estos sistemas son vueltos a niveles basales (Van Lier, 2003a).

Diferentes estresores activan diferentes vías (Rivier y Rivest, 1991) y/o diferentes estresores pueden activar la misma vía de forma diferente (Turner y col., 2002). Los cambios en las funciones biológicas durante el estrés resultan en alteraciones de los recursos biológicos sobre las actividades ocurridas antes del estresor y son los “costos biológicos del estrés” (Moberg, 2000). En general la respuesta endócrina está directamente enfocada a inhibir las funciones como crecimiento y reproducción y prioriza el mantenimiento y supervivencia (Van Lier, 2003a).

Los animales presentan reacciones integradas a la estimulación del ambiente. Estas reacciones se expresan en los cambios hormonales y de comportamiento. Amplia evidencia indica que las hormonas pueden afectar el comportamiento y que el comportamiento específico que adopta el individuo es crítico para la calidad y la intensidad de las respuestas hormonales (Dantzer y Mormède, 1983). Sobre todo, la naturaleza adaptable de la actitud adoptada sólo puede deducirse de sus concomitantes neuroendócrinos, es decir, para hacer frente los intentos tienen éxito sólo en la medida en que pueden mejorar la respuesta fisiológica o somática a los estresores. Sin embargo, en la práctica, rara vez se producen estrés por sí solo y sólo una vez, y la estimulación continua crónica o la estimulación repetida intermitente incluso es más frecuente que la estimulación aguda (Dantzer y Mormède, 1983).

La cantidad de estrés psicológico a un animal determina la experiencia de cuanto responde el eje hipófisis-adrenal. En particular, la percepción y el comportamiento subsiguiente al estresor son fundamentales para la naturaleza y la intensidad de la respuesta hormonal. Animales que presentan una mayor concentración plasmática de corticosteroides que la normal se encuentran en un estado de estrés y las condiciones que provocan tales cambios hormonales se describen como estresores (Dantzer y Mormède, 1983).

La relación entre las reacciones hormonales y las respuestas de comportamiento puede asumir tres modos diferentes: 1) un “estado particular del cerebro” puede activar y coordinar las respuestas endócrinas y de comportamiento, 2) las hormonas pueden afectar el comportamiento y 3) el estado endócrino puede ser modificado si el individuo realiza comportamientos específicos (Leshner, 1978, citado por Dantzer y Mormède, 1983). Algunos resultados obtenidos en animales de laboratorio han demostrado la existencia de una relación entre los niveles circulantes de corticosteroides y la forma y la intensidad de determinadas clases de respuestas de comportamiento (Leshner, 1978, citado por Dantzer y Mormède, 1983). Los resultados permiten especular que la forma en que los animales reaccionan a la estimulación del ambiente puede verse afectada por la manipulación de los principales factores que influyen en el relacionamiento hormona-comportamiento, es decir, los factores genéticos y experiencia previa (Dantzer y Mormède, 1983).

Las experiencias previas son otro factor que se considera que tienen profunda influencia en el comportamiento y las respuestas neuroendócrinas (Dantzer y Mormède, 1983). Las diferentes categorías de experiencia tienen consecuencias variables sobre la reacción orgánica, en función de sus cualidades intrínsecas (es decir, el tipo de experiencia, su intensidad y duración) y en el período durante el que

se hayan recibido. Los efectos más drásticos se observan cuando la experiencia es recibida durante los primeros periodos de la vida, ya sea prenatal o postnatal, que corresponden a las etapas críticas de maduración neuronal y endócrino (Fox, 1970; Balaban, 1975, citados por Dantzer y Mormède, 1983).

La noción de las condiciones que son estresantes se ha desarrollado según el grado de actividad secretora de la glándula adrenal. El grado de aumento en cortisol o de corticosterona en plasma, o, con menor frecuencia, concentraciones crecientes en plasma del epinefrina y norepinefrina, se mira como indicativo de las condiciones estresantes (es decir, mayores concentraciones interpretadas como más estresantes) (Minton, 1994). La secreción de los glucocorticoides (GCs) es una respuesta endócrina clásica al estrés (Sapolsky y col., 2000). Los GCs también se podrían llamar hormona anti-estrés, porque su función primaria es protectora y adaptativa. A su vez estas hormonas pueden tener efectos perjudiciales, puede haber un precio que se pagará por la naturaleza adaptativa de la respuesta al estrés (Korte y col., 2007).

Los aumentos en la circulación de los glucocorticoides adrenales (cortisol y corticosterona) han sido durante mucho tiempo sinónimo de estrés. Sin embargo, la secreción de prolactina y de hormona de crecimiento ha demostrado ser igual de sensible al estrés. Del mismo modo, la hormona estimulante de tiroides y las gonadotropinas (hormona luteinizante y hormona folículo estimulante) son, ya sea directa o indirectamente, moduladas por el estrés (Matteri y col, 2000).

Está generalmente aceptado que la secreción de los glucocorticoides que acompañan la exposición a los estresores tiene un impacto negativo en funciones del sistema inmune. No todos los estresores que activan el eje HHA reducen las funciones de células inmunes. Estos resultados y los datos de Irwin y col. (1987, 1988, 1990, citado por Minton, 1994), indican que estresores sociales activan el sistema nervioso simpático, especialmente la médula adrenal, y que pueden desempeñar un papel dominante en la modulación de funciones inmunes en respuesta al estrés. En el ganado estas reacciones tienen probablemente significación adaptativa (Minton, 1994). El sistema nervioso central juega un papel directo en la regulación del sistema inmunológico durante el estrés, y también el sistema inmunológico en sí mismo es uno de los principales sistemas de defensa en respuesta a un estresor (Dunn, 1988, citado por Moberg, 2000).

4.1.2 Clasificación de estresores

En los mamíferos no roedores podemos dividir los estresores en:

- a) Físicos (p.e. el transporte, la esquila, el alojamiento, estimulación eléctrica y ejercicio).
- b) Metabólicos (p.e. hipoglucemia insulina-inducida).
- c) Inmunológicos (p.e. infección y administración de citoquinas o de endotoxinas).
- d) Cardiovasculares (p.e. administración del nitropruside).
- e) Psicológicos (p.e. aislamiento, las interacciones sociales y las interacciones del humano-animal).

Todos se han estudiado en distintas épocas en pos de establecer cómo el estrés puede afectar la reproducción (Tilbrook y col., 2000).

Como ya fue mencionado, en términos de la duración, los estresores pueden ser divididos en dos categorías: agudo (puntual, intermitente, y de exposición limitada en el tiempo) o crónico (exposición continua). Muchos estresores difieren en su intensidad. Las respuestas adaptativas que se generan frente a un estresor agudo incluyen respuestas fisiológicas y comportamentales que son esenciales para restablecer el balance homeostático. Durante un estrés agudo, las respuestas fisiológicas son importantes en redirigir la utilización de la energía a varios órganos, e inhibir o estimular selectivamente varios sistemas de órganos o sus componentes, para movilizar reservas de energía y prepararse para una exposición a cambios adicionales impredecibles. De este modo, bajo la exposición a estresores metabólicos, ciertos tejidos tienden a reducir su consumo de energía, mientras que otros especialmente aquellos que son importantes para la actividad locomotora, reciben suficiente nutrientes para funcionar adecuadamente. El sistema nervioso central también tiene prioridad durante la respuesta a estrés metabólico y recibe en forma preferencial cantidades suficientes de nutrientes desde la circulación (Pacák y Palkovits, 2001). Con respecto a los estresores crónicos, existen dificultades para identificar animales que los experimentan. Una de las razones es que se tiende a tratar el estrés como un estado constante e invariable, en lugar de esto debería considerarse el estrés a largo plazo como una sucesión de repetidos estresores agudos; este estado se ha denominado estrés crónico intermitente (Ladewig, 2000, citado por Carbone y de Larrobla, 2005). Otra razón es que un organismo sujeto a un estrés crónico intermitente cambia sus respuestas frente al estresor durante la exposición. Las respuestas pueden disminuir debido a la adaptación a nivel cognitivo (respuestas comportamentales; acostumbramiento), ser suprimidas o retornar a niveles normales (secreción basal de cortisol), o incrementarse por procesos de sensibilización (p.e. respuesta en cortisol frente a un nuevo estresor). Puede asumirse que la exposición repetida a un estresor leve y de corta duración probablemente resulte más en una disminución gradual de la respuesta al estrés, que la exposición repetida a un estrés severo. La misma situación estresante puede afectar en forma diferente a especies distintas o animales de la misma especie, ya que el efecto del estresor depende de la experiencia subjetiva del animal frente a la situación (Ladewig, 2000, citado por Carbone y de Larrobla, 2005).

4.1.3 Estrés y producción animal

Un ambiente en el cual se reducen al mínimo los estresores sería favorable para la producción eficiente de los productos derivados de animales domésticos de campo y para ayudar a asegurar probablemente el bienestar de estas especies. (Minton, 1994). El estrés ambiental es relevante por las características de producción, tales como la producción de leche, el aumento de peso o la fertilidad (Dobson y Smith, 1998).

Las tensiones o situaciones de estrés pueden suscitarse por la presencia de otros animales, del hombre o simplemente por la interacción con el ambiente (Carbone y de Larrobla, 2005). El estrés induce a cuatro categorías de problemas de importancia económica en cría animal (Van Lier, 2003a):

- a) Interferencia con la producción y reproducción animal.
- b) Aumento de la sensibilidad a enfermedades infecciosas y síntomas sicosomáticos.
- c) Alteración de comportamiento.
- d) Shock.

La consideración del efecto del estrés en la producción como indicador de estrés/bienestar puede conducir a una apreciación más realista del verdadero costo de la carga alostática que tienen sobre los animales y el hombre (Smith y Dobson, 2002).

4.2 ENDOCRINOLOGÍA

4.2.1 Definición

Las células de los organismos pluricelulares necesitan comunicarse entre sí con el fin de regular y coordinar su desarrollo y diferenciación, y controlar su crecimiento y división (García Sacristán, 1998). El control natural de muchas reacciones químicas que mantienen y regulan la homeostasis corporal es de naturaleza neuronal y/o humoral. El sistema de control hormonal envía información a través de mensajeros químicos, desde células sensoras a células efectoras, utilizando el sistema vascular. La acción del sistema de control humoral es más lenta, interviniendo en procesos como el crecimiento y reproducción (Ungerfeld, 2001). La endocrinología tiene la capacidad de correlacionar anatomía, fisiología, genética y bioquímica (McDonald, 1991).

La homeostasis y la actividad metabólica están coordinadas por las comunicaciones que facilitan los sistemas nervioso y endócrino. El sistema endócrino es un elemento fundamental en la adaptación de los organismos a los cambios tanto del medio interno como del ambiente que los rodea. Este sistema está compuesto en los animales superiores de una serie de estructuras anatómicas:

- a) Glándulas endócrinas o glándulas de secreción interna, ya que no poseen conductos para secretar sus productos, como son la adenohipófisis, tiroides, adrenales, paratiroides y gónadas.
- b) Estructuras temporales con acción endócrinas, como la placenta, folículos ováricos y cuerpo lúteo.
- c) Partes del sistema nervioso que comprenden núcleos hipotalámicos, partes del sistema nervioso central y neurohipófisis.
- d) Conjunto celulares con acciones endócrinas, como células peptidérgicas del tracto gastrointestinal, islotes de Langerhans y otras en tejidos hepáticos y endoteliales.
- e) Otros órganos como corazón, timo, riñones, etc.

Las células de estas estructuras endócrinas sintetizan unas sustancias denominadas hormonas (García Sacristan, 1998).

El sistema endócrino se puede alterar por el estrés de tres maneras distintas. En primer lugar, una hormona puede ser parte de una respuesta estímulo-específica, por ejemplo las hormonas implicadas en la regulación del fluido corporal se pueden liberar en respuesta a hemorragia, o las que están implicadas en el catabolismo cuando hay subnutrición. Estas respuestas son una parte importante de la alostasis pero como son específicas a un estímulo ellas no se pueden utilizar como indicadores generales del estrés. En segundo lugar, algunos sistemas hormonales demuestran respuestas generalizadas a los estímulos (p.e. sistema nervioso simpático (SNS), y eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA)). La amplitud de la respuesta hormonal puede estar correlacionado con la severidad del estímulo y cualquier cambio indica que el estímulo fue lo suficiente severo como para que el cuerpo respondiera. Algunos estímulos activan un sistema más que otro (Komesaroff y col., 1994, citado por Smith y Dobson, 2002). Esto puede ser debido al papel estímulo-específico de estos sistemas hormonales que se superponen a sus papeles generales. En tercer lugar, una hormona puede tener un papel dominante en la función normal del cuerpo (ej. reproducción) y el estrés puede alterar perjudicialmente la señal hormonal y prevenir la función normal. Es decir, la carga alostática para mantener homeostasis es suficientemente severa que otras funciones normales no pueden ser mantenidas. La interrupción de estos sistemas hormonales puede indicar que se excedió el umbral de severidad del estímulo (Smith y Dobson, 2002).

4.2.2 Hormonas

El sistema endócrino utiliza mensajeros específicos (llamados hormonas) para regular importantes funciones corporales (Ungerfeld, 2001). Hormona es una palabra griega que significa "poner en movimiento o estimular" y se utilizó por primera vez por Bayliss y Starling en 1902 (McDonald, 1991). Estas hormonas actúan a nivel celular y el origen puede ser externo o interno a la célula diana a la cual pueden llegar por cualquier vía llevando un mensaje de iniciar, detener o regular un proceso celular. Estos mensajeros químicos se unen a proteínas específicas, receptores, para desarrollar más tarde su acción en la célula diana y provocar la respuesta biológica. Es posible distinguir cuatro tipos de efectos producidos por las hormonas como son el cinético, metabólico, relacionado con el crecimiento y efecto de comportamiento. Las hormonas no producen efectos finales de forma directa, sino que activan procesos intermedios que pueden ser distintos, dependiendo de la célula o tejidos (García Sacristan, 1998).

A las hormonas las podemos clasificar de diversas formas, según su estructura química (polipeptídicas, esteroides y compuestos derivados de aminoácidos y ácidos grasos), según las acciones primarias que producen (hormonas que actúan sobre la maquinaria genética de las células diana y hormonas que no pueden entrar a la célula por su poca liposolubilidad teniendo que interaccionar con proteínas de membrana), se las puede clasificar según su origen (hipofisarias, tiroideas, adrenales, etc.) y también dependiendo de su radio de acción (autócrinas, parácrinas y endócrinas) (García Sacristán, 1998).

Las principales funciones de las hormonas se centran en cinco aspectos (García Sacristán, 1998):

- 1) Homeostasis de líquidos tisulares.
- 2) Regulación del metabolismo.
- 3) Integración y coordinación de los mecanismos del crecimiento.
- 4) Regulación de la reproducción y lactación.
- 5) Respuesta ante situaciones de peligro.

El grado de cumplimiento de sus funciones depende básicamente de la concentración de hormonas circulantes; el número de receptores en las células diana; la producción de segundos mensajeros; la magnitud de la respuesta en la célula diana; y los mecanismos apropiados de regulación.

4.2.3 Clases químicas de hormonas

Las hormonas pueden clasificarse según su estructura química la que a su vez determina el tipo de secreción, transporte y receptor (García Sacristán, 1998).

Desde el punto de vista de su estructura química se puede dividir en cuatro grupos. El primer grupo lo constituyen las hormonas polipeptídicas que varían en estructura y que representan a las hormonas producidas por el hipotálamo, la neurohipófisis, la adenohipófisis, la paratiroides y los islotes de Langerhans. Son moléculas grandes (peso molecular 10000 Dalton o más) y solubles en agua (no atraviesan las membranas celulares), por lo que se acumulan en las células y se liberan a la sangre en forma intermitente de acuerdo a su requerimiento. Los esteroides constituyen el segundo grupo e incluyen todas las hormonas gonadales y corticoadrenales. Esta clase de hormonas son de bajo peso molecular (peso molecular 300 Dalton). Su carácter lipofílico permite que atraviesen las membranas celulares libremente y no se almacenan dentro de la célula. El tercer grupo incluye a las catecolaminas y las yodotironinas. Estas hormonas son derivadas de la tirosina. Las catecolaminas son secretadas por la médula adrenal y las yodotironinas producidas por la glándula tiroides. El cuarto grupo consiste en varios ácidos grasos únicos que tienen propiedades tipo hormona, las prostaglandinas (McDonald, 1991).

Las hormonas proteicas o polipeptídicas constituyen un grupo específico de moléculas reguladoras con diversas funciones. Estas hormonas están constituidas por un rango que va desde los tres aminoácidos (Hormona Liberadora de Tirotrópica) hasta los 199 aminoácidos (Prolactina). Las hormonas peptídicas son almacenadas en gránulos secretores. Al estimular la célula endócrina, se libera el contenido de los gránulos secretores mediante un proceso de exocitosis al líquido extracelular y a continuación, a los capilares adyacentes (García Sacristán, 1998).

Las hormonas esteroideas (Cortisol, Aldosterona, Andrógenos, Estrógenos, Progesterona) son sintetizadas a partir de colesterol por una serie de reacciones enzimáticas (García Sacristán, 1998).

El modelo de transporte de las hormonas tiene muchas variaciones. Las hormonas pueden encontrarse en el torrente circulatorio libres o unidas a

transportadores proteicos. En general las hormonas proteicas y las peptídicas, así como las catecolaminas, por su carácter hidrosoluble circulan de forma libre. Al contrario de las hormonas esteroideas y las tiroideas que se unen a proteínas transportadoras. La cantidad de hormona libre y unida a proteína se encuentra en equilibrio, pero es solamente la hormona libre la que tiene acciones fisiológicas. Existen varios tipos de transportadores de esteroides como la transcortina o globulina ligadora de cortisol (CBG); el estradiol y la testosterona se unen a la globulina ligadora de hormonas sexuales (SHBG).

4.2.4 Regulación de síntesis y secreción

La secreción de hormonas está relacionada con el papel que desempeñan en el mantenimiento de la homeostasis. El mecanismo de regulación dominante es el de retroalimentación negativa. Ocasionalmente se observa una retroalimentación positiva. El grado en que las hormonas van a cumplir su objetivo va a depender de la concentración de las hormonas circulante, el número de receptores en las células diana, la producción de segundos mensajeros, la magnitud de la respuesta en la célula diana y los mecanismos apropiados de regulación (García Sacristán, 1998).

La regulación de la secreción de hormonas depende de varios mecanismos. Una de las formas es por control humoral, como la concentración de un constituyente sanguíneo. También se regula a través del gasto de una hormona por concentración de otra hormona, como en el caso de la adenohipófisis, este es un "mecanismo de retroalimentación" y es un medio automático de corrección del gasto hormonal de una glándula a un nivel deseado por una retroalimentación sensora de niveles de otra hormona. Otra forma de control es a través de la regulación sistema nervioso periférico del gasto hormonal. Otro método supone la conexión hipotalámica como forma de mediar el control nervioso (ejemplo fotoperíodo). El sistema endócrino sirve como importante mecanismo de control, que a su vez es controlado por diferentes vías (McDonald, 1991).

4.2.5 Receptores

Un receptor hormonal es una estructura molecular única en el interior o exterior de la célula con una afinidad alta y específica por una hormona en particular. Tras la unión al receptor se puede transmitir el mensaje. Dicho mensaje dará lugar a una respuesta celular específica, que generalmente implica la activación o inactivación de enzimas en las células diana.

Los receptores presentan así dos grandes funciones:

- a) Reconocimiento de la hormona específica.
- b) Traducción de la señal hormonal en una respuesta celular específica.

El número y tipo de receptores de una célula diana no son fijos. La formación y degradación de receptores es un proceso dinámico (Broers, 1996).

Las hormonas esteroideas y las peptídicas tienen mecanismos de acción diferentes (McDonald, 1991). La capacidad de las hormonas peptídicas para provocar un efecto en la célula diana apropiada viene dada por la presencia de receptores en la superficie de esa célula que tiene unión específica con la hormona. El proceso de internalización y degradación llamado endocitosis mediada por receptores, es un proceso complejo. La información necesaria para provocar una respuesta celular no reside en la hormona, pero sí en el receptor; y que la función de la hormona es proporcionar una configuración determinada al receptor que provoca la traducción de la señal (García Sacristán, 1998). Las hormonas esteroideas entran libremente en la célula, se combinan con receptores ubicados en el citoplasma y en el núcleo; forman el complejo hormona-receptor inicial, el cual requiere un proceso de activación o transformación en el núcleo para después asociarse a moléculas de ADN específicas. Luego se induce o reprime la transcripción del principal mensaje del gen por parte de la ARN polimerasa (García Sacristán, 1998) (Fig. 1).

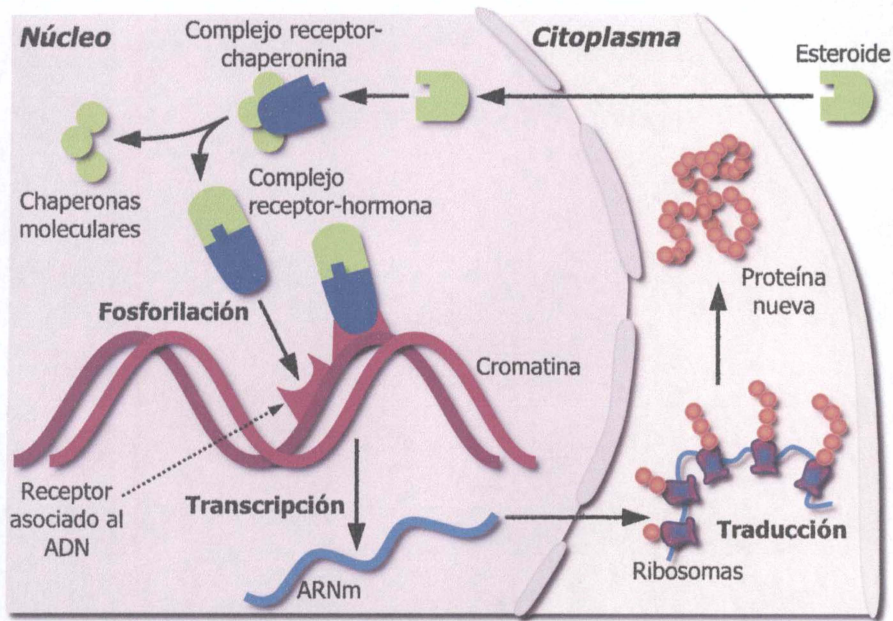


Figura 1: Acción de una hormona esteroidea, activando un receptor intracelular con posterior transcripción génica y síntesis proteica. Adaptado de Cummings (2001).

Las hormonas peptídicas son moléculas grandes, ejercen su acción sobre la superficie de las células blanco. Una célula blanco es capaz de responder porque posee un sitio receptor sumamente específico (McDonald, 1991). Estructuralmente, los receptores de membrana son grandes proteínas que emergen de la membrana celular. Dentro de estos receptores se conocen dos grupos: a) El primero consta de tres clases de receptores en la superficie celular, dependiendo de los mecanismos de transducción empleados (canales iónicos operados por receptor que actúan principalmente en la transmisión sináptica, receptores acoplados a proteínas G y receptores catalíticos); la mayoría de ellos son proteínas transmembrana. b) El segundo grupo de receptores se caracteriza por el proceso de internalización del complejo ligando-receptor (García Sacristán, 1998).

La reacción hormona-receptor no sólo proporciona especificidad, sino que también es el determinante inicial de la velocidad de acción de la hormona. Las moléculas de los receptores se sintetizan, se trasladan a las zonas de asociación con las moléculas hormonales y se degradan continuamente. Algunas hormonas disminuyen el número de sus propios receptores o ejercen sobre ellos una desensibilización limitando así su acción sobre la célula. Otras hormonas reclutan sus propios receptores, ampliando así su acción sobre la célula (García Sacristán, 1998).

Los receptores se encuentran sobre la superficie de la célula para las hormonas peptídicas, en la cromatina nuclear para las hormonas tiroideas y en el citoplasma y el núcleo para las hormonas esteroideas (McDonald, 1991).

Las hormonas peptídicas que no atraviesan la membrana necesitan establecer un complejo sistema que permita, desde la célula receptora, reconocer el mensaje químico en la cara externa de la membrana, y transmitir la información a las estructuras efectoras en forma de una o más señales intracelulares (García Sacristán, 1998).

Las hormonas esteroideas que entran libremente en la célula, se combinan con receptores que se encuentran en el citoplasma y el núcleo. Estos receptores son grandes moléculas proteicas. Los receptores de los esteroideos deben poseer una serie de características para poder desarrollar su función, 1) alta afinidad y especificidad por los ligandos; 2) capacidad limitada de unión; y 3) alto grado de especificidad tisular. El proceso que tiene lugar se realiza en dos fases: inicialmente el esteroide interacciona con un receptor soluble para formar un complejo capaz de unirse más tarde específicamente en el núcleo (García Sacristán, 1998).

4.2.6 Esteroides

4.2.6.1 Esteroidogénesis

Las hormonas esteroideas constituyen una muy importante clase de compuestos y están presentes en la mayoría de las especies (Stocco y Clark, 1996). Las hormonas esteroideas son sintetizadas en las adrenales, gonadas, placenta y sistema nervioso central (Stocco, 2000). Las hormonas que se sintetizan en la glándula adrenal, llamados glucocorticoides y mineralocorticoides, son importantes para el mantenimiento del metabolismo de los carbohidratos, para la gestión del estrés, y el balance salino. Los esteroideos sexuales masculinos, los andrógenos, que son responsables del mantenimiento de la función reproductora y de las características sexuales secundarias, son también un miembro importante de esta familia y se sintetizan en el testículo. Mientras que los esteroideos sexuales femeninos, los estrógenos y progestágenos, se sintetizan en el ovario y la placenta y la función es inducir a las características sexuales secundarias y también son esenciales para la reproducción. Una clase adicional de esteroideos, conocido como el neuroactivos o esteroideos neuronales, se sintetizan por el sistema nervioso central (SNC) y parece que tienen una función especializada en este tejido (Stocco y Clark, 1996).

Así, las hormonas esteroideas se pueden distinguir por sus diversas acciones fisiológicas en el cuerpo. Sin embargo, independientemente de los tejidos de origen, las hormonas esteroideas son todas sintetizadas de un sustrato común, el colesterol; por lo que todas ellas son estructuralmente similares (Stocco y Clark, 1996) (Fig. 2).

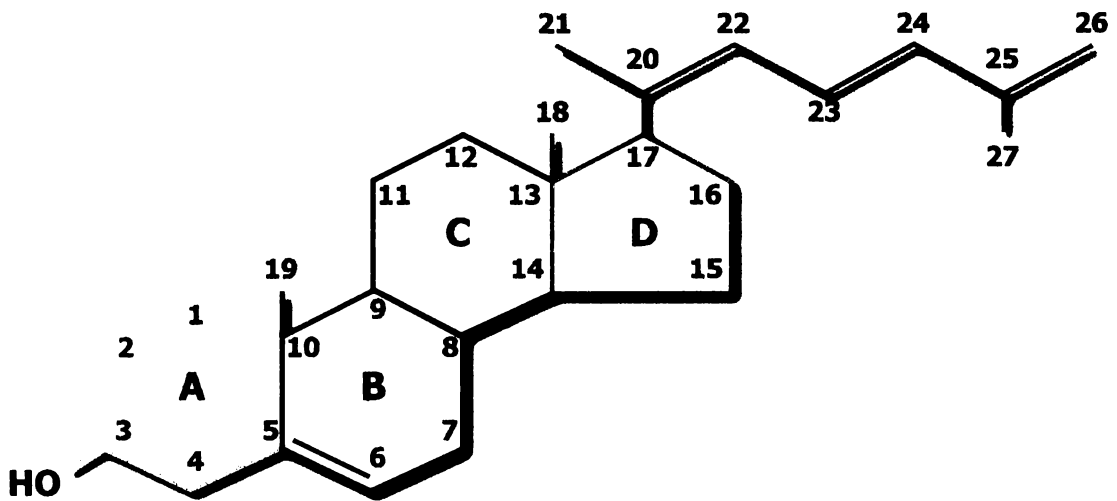


Figura 2: La molécula de colesterol es un sistema de tres anillos de seis carbonos (A, B y C) y un anillo de cinco carbonos (D). Una cadena de ocho carbonos y grupos metilos se unen a los carbonos 17, 10 y 13, respectivamente. Adaptado de Van Lier (1998).

Para identificar las hormonas esteroideas, podemos examinar la cantidad de carbonos por molécula, encontramos que los que contienen 18 carbonos son estrógenos, los que contienen 19 carbonos son andrógenos y los que contienen 21 carbonos son progestágenos y corticoides adrenales. Estos últimos tienen una cadena de 2 carbonos unida al carbono 17. Los estrógenos se diferencian del resto por tener un anillo fenólico (Ungerfeld, 2001).

La esteroidogénesis es el proceso en el que células especializadas en tejidos específicos sintetizan hormonas esteroideas (Stocco, 2001). La biosíntesis de las hormonas esteroideas en respuesta a la hormona trófica y otros estímulos esteroidogénicos comienza con la escisión enzimática de la cadena lateral del colesterol (Stocco y Clark, 1996). El colesterol es una molécula de 27 carbonos compuesta por tres anillos de seis carbonos y un anillo de cinco carbonos, con una cadena lateral de ocho carbonos (Van Lier, 1998). Las fuentes de colesterol para la esteroidogénesis pueden ser: síntesis *de novo* a partir de acetato, colesterol almacenado en vacuolas lipídicas en forma esterificada dentro de la célula, o transportada por sangre desde el hígado, unido a lipoproteínas de baja densidad (LBD) (García Sacristán, 1998). Con el fin de iniciar y sostener la esteroidogénesis, un suministro constante de sustratos de colesterol debe ser de fácil acceso dentro de la célula para el transporte al sitio de escisión en el interior de la membrana mitocondrial donde reside el sistema de escisión de la cadena lateral del colesterol (CSCC). Una vez secuestrada en las células esteroidogénicas, el transporte de colesterol en respuesta a la estimulación de hormona trófica se puede pensar que se produzcan en dos procesos separados. La primera parte del proceso es la movilización del colesterol de las reservas celulares hacia la membrana mitocondrial exterior, mientras que la segunda parte consiste en la transferencia de colesterol desde la membrana mitocondrial exterior hacia la interna (Liscum y col., 1989,

citados por Stocco y Clark, 1996). El transporte del colesterol a través de este espacio acuoso entre la membrana externa e interna de la mitocondria es el paso limitante en la esteroidogénesis (Stocco y Clark, 1996).

Posterior a la escisión enzimática de la cadena lateral de colesterol se forma el primer esteroide de síntesis en todos los tejidos esteroidogénicos, pregnenolona (C21). Esta reacción es catalizada por el citocromo P450, enzima de escisión de la cadena lateral (P450 scc), que es parte del sistema de escisión de la cadena lateral del colesterol (CSCC) y que se encuentra en la matriz del lado interno de la membrana mitocondrial (Simpson y col., 1996; Churchill, 1979, citados por Stocco y Clark, 1996). La conversión del colesterol a pregnenolona es el primer paso enzimático en la esteroidogénesis y se activa hormonalmente. El tipo de hormona sintetizada depende de la presencia de enzimas específicas (García Sacristan, 1998). La pregnenolona puede ser metabolizada tanto por 3 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa/ Δ 4 Δ 5 isomerasa (3 β HSD) o P450 17 α -hidroxilasa/17-20 liasa (P450c17). Estos dos complejos de enzimas tienen la capacidad para actuar en más de un sustrato (Van Lier, 2003a). Una vez formada la pregnenolona puede ser metabolizada en la mitocondria a progesterona por una forma mitocondrial de la enzima 3 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3 β HSD), o puede salir de la mitocondria y someterse a posterior metabolismo por esteroide-deshidrogenasas y citocromo P450 esteroide-hidroxilasas microsomales dependiendo el producto esteroideo final de la naturaleza del tejido (Stocco y Clark, 1996).

Luego de remover la cadena lateral del colesterol por la enzima P450scc, la esteroidogénesis en el retículo endoplásmico adrenal puede ser dividida en 2 caminos diferentes de acuerdo al momento en que cambia de lugar el doble enlace del segundo anillo al primero (Δ 4) (Takemori y Kominami, 1984, citados por Engelbrecht y Swart, 2000). En el camino Δ 5, la pregnenolona es convertida en 17 α -hidroxipregnenolona (17OHP5) y dihidroepiandrosterona (DHEA) por la enzima P450c17. La DHEA es convertida a DHEA-sulfato y sirve de origen para andrógenos adrenales. El segundo camino, o Δ 4, comienza por la acción de la 3 β -HSD, que cataliza la conversión de los esteroides Δ 5 a los correspondientes esteroides Δ 4, progesterona, 17 α -hidroxiprogesterona (17OHP4) y androstenediona (A4) (Sasano y col., 2000, citados por Engelbrecht y Swart, 2000). La progesterona, el esteroide adrenal intermedio más importante fisiológicamente, sirve como sustrato para la P450 21-hidroxilasa (P450c21), así como para la P450c17. La hidroxilación en el carbono 21 de progesterona genera desoxicorticosterona, el precursor de los mineralocorticoides en mamíferos que se sintetizan por la acción de la P450 aldosterona sintetasa (P450aldo). Asimismo, la hidroxilación del carbono 17 seguida por hidroxilación del carbono 21, determina el precursor de glucocorticoides, desoxicortisol (Takemori y Kominami, 1984, citado por Engelbrecht y Swart, 2000). El desoxicortisol es transformado en la mitocondria a cortisol por la enzima P450 11 β -hidroxilasa (P450c11). Aparentemente el orden de acción de las 3 enzimas mencionadas, 3 β HSD, P450c17 y P450c21, definiría el camino que siguen los metabolitos durante la esteroidogénesis adrenal. La producción de esteroides es regulada en gran parte por los niveles relativos y presencia de enzimas esteroidogénicas expresadas a nivel celular en una forma específica para cada tejido (Conley y Bird, 1997) (Fig. 3).

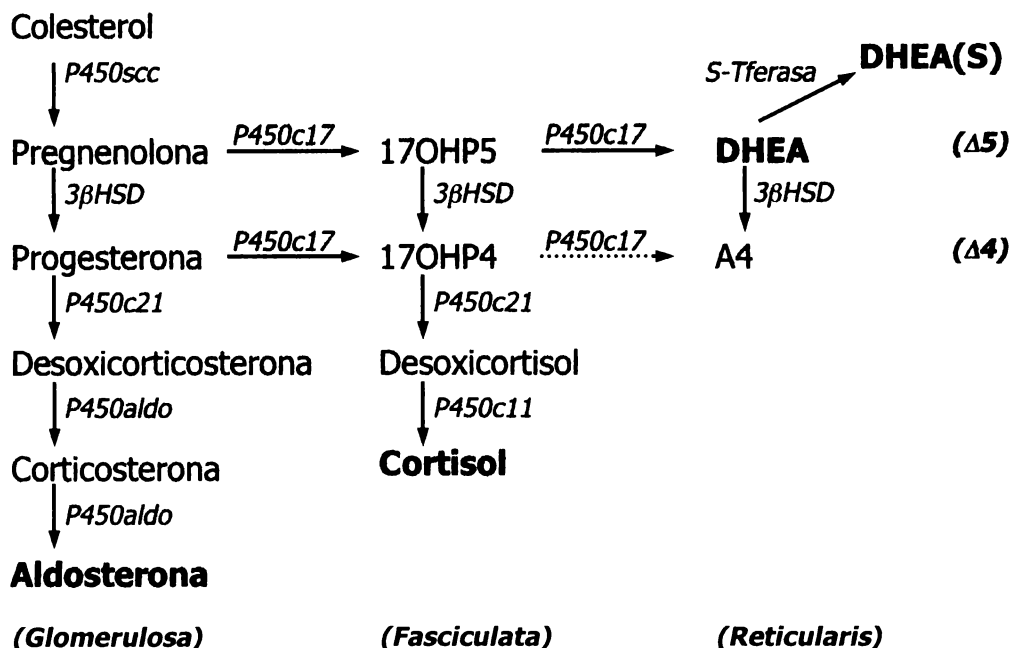


Figura 3: La vía de la biosíntesis de esteroides adrenocorticales en mamíferos mayores (no roedores). La flecha discontinua indica una reacción enzimática disponible solamente en cerdos, pero no en humanos o rumiantes. P450: familia del citocromo P450; P450scc: cortadora de la cadena lateral del colesterol; 3 β HSD: 3 β hidroxí-esteroide deshidrogenasa/ $\Delta 4$ - $\Delta 5$ isomerasa; P450c17: P450 17 α -hidroxilasa/17-20 liasa; P450c21: P450 21-hidroxilasa; P450c11: P450 11 β -hidroxilasa; P450aldo: P450 aldosterona sintetasa; S-Tferasa: Sulfotransferasa. Adaptado de Conley y Bird (1997).

Sólo en el retículo endoplasmático liso de las zonas fascicular y reticular se encuentra la enzima P450c17, que produce la 17- α -hidroxilación de la pregnenolona y la progesterona. La mayor parte de la 17-OHP4 formada sigue la vía de síntesis de los glucocorticoides (Fig. 3). La otra vía de producción de glucocorticoides da origen a la corticosterona, no siendo necesaria la 17- α -hidroxilación. A partir de la 17-OHP5 y por acción de la liasa C17-C20, se origina la dehidroepiandrosterona de 19 carbonos, que por isomerización se transforma en un andrógeno más potente, la androstendiona. A partir de ésta, y por reducción, se puede formar testosterona. Se puede producir la aromatización de la testosterona para producir estrógenos. En la zona glomerular no se encuentra la P450c17. La pregnenolona, luego de pasar a progesterona es hidroxilada en C21 y C11. Esta es la única zona con 18- α -hidroxilasa; por tanto es la única capaz de generar aldosterona (García Sacristán, 1998).

La proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR) es un elemento clave en el paso limitante en la biosíntesis de las hormonas esteroideas, ya que regula la entrega de colesterol a la enzima P450scc situada en la membrana mitocondrial interna. Evidencia reciente sugiere que StAR puede actuar como una proteína de transferencia de esteroides (Cherradi y col., 2001). La StAR se ha detectado en todos los tejidos esteroidogénicos a excepción del cerebro y de la placenta. Esta proteína StAR es sintetizada en el citosol e importada y procesada por la mitocondria. La proteína StAR ha demostrado ser un elemento clave y crucial

para la regulación aguda de la biosíntesis de hormonas esteroideas (Stocco y Clark, 1996).

La estimulación de la ACTH de la transcripción del ARNm de la StAR es un factor limitante en este estímulo secundario a ACTH en el nivel de la proteína de la StAR (Ariyoshi y col., 1998). Parece ser claro que la StAR es responsable de la muy regulada transferencia de colesterol de la membrana mitocondrial externa a la membrana mitocondrial interna. Esta transferencia de colesterol puede producirse como resultado del contacto físico entre las membranas o puede ocurrir como resultado de la formación de un complejo proteico entre las membranas mitocondriales exterior e interior que pueden formar un núcleo hidrofóbico a través de la cual el colesterol puede pasar. La conclusión de que la importación de proteínas mitocondriales para la biogénesis mitocondrial general no induce la esteroidogénesis y la expresión de StAR puede aumentar directamente la producción de esteroides, podría sugerir una especificidad entre la importación de StAR y el transporte de colesterol. Por lo tanto, la continua síntesis y procesamiento de precursores de proteínas StAR adicionales sería necesaria para permitir el continuo transporte de colesterol a la membrana interior. (Stocco y Clark, 1996).

La StAR tiene claramente una función indispensable en la regulación aguda de la síntesis de esteroides. Si bien el mecanismo de acción de la proteína StAR es todavía desconocido, parece claro que la transferencia de colesterol requiere que interactúen, al menos transitoriamente, con componentes tales como las proteínas, lípidos y/o en otros factores fuera de la membrana mitocondrial externa y producir alteraciones que resulten en la transferencia de colesterol (Stocco, 2000).

4.2.6.2 Progesterona

La progesterona (hormona de la preñez) es la principal secreción del cuerpo lúteo. En especies como los primates, ovinos y equinos la progesterona también es secretada por la unidad feto-placentaria en cantidades suficientes como para no ser necesaria la presencia del cuerpo lúteo a partir de la mitad de la gestación (Ungerfeld, 2001).

Es una hormona producida además que por el cuerpo lúteo, por la placenta y por la corteza adrenal. La progesterona favorece el metabolismo en general. Los efectos sobre los órganos reproductores son varios, como por ejemplo modifica el endometrio uterino de fase proliferativa, en la fase secretora hay una mayor ramificación y tortuosidad de las glándulas uterinas, las cuales secretan la leche uterina. La progesterona es necesaria para el mantenimiento de la gestación y su ausencia lleva al aborto. Estimula el desarrollo de los lóbulos alveolares de la glándula mamaria. Los efectos de la progesterona en los tejidos se hacen evidentes cuando éstos han estado previamente expuestos a los estrógenos, los que incrementan el número de receptores para esta hormona (García Sacristán, 1998).

4.2.6.3 Testosterona

La testosterona es secretada en los testículos por las células de Leydig del intersticio testicular y también es secretada por la corteza adrenal en pequeñas cantidades. Los andrógenos son esteroides y derivados del núcleo del androstano de 19 carbonos. El hígado cataboliza activamente la testosterona que por oxidación se transforman en androstenediona (García Sacristán, 1998).

La hormona luteinizante (LH) es la principal hormona hipofisaria implicada en el control de la síntesis de testosterona. Parte de la testosterona alcanza el tubo seminífero, donde ayuda a mantener la espermatogénesis. Una importante cantidad de la testosterona sintetizada en las gónadas es liberada en sangre junto con pequeñas cantidades de esteroides intermediarios originados en el camino de colesterol a testosterona (androstenediona y DHEA). Los andrógenos son esenciales para el desarrollo y mantenimiento del comportamiento y los caracteres sexuales masculinos. Los andrógenos administrados a animales incrementan la acumulación de proteínas en el músculo esqueléticos a través de un efecto anabólico en el metabolismo proteico (Ungerfeld, 2001).

Los andrógenos también determinan comportamientos, como que los perros levanten la pata antes de orinar, o la agresividad de los machos en algunas especies. Algunos andrógenos también actúan como feromonas sexuales; p.e. la 5 α -androsterona contribuye al olor particular en el cerdo (Ungerfeld, 2001).

4.2.6.4 Estradiol

En las hembras no preñadas los estrógenos son secretados por folículos antrales, mientras que en las preñadas son secretados fundamentalmente por la unidad feto-placentaria. De acuerdo a una relación de volumen, los estrógenos son biológicamente más potentes que los otros esteroides. Las células tecales de los folículos en crecimiento sintetizan básicamente andrógenos a partir del colesterol. Esta conversión es regulada por la LH. Las células granulosas del folículo en crecimiento tienen las enzimas necesarias para aromatizar los andrógenos a estrógenos. La mayoría de los andrógenos sintetizados en la célula tecal son convertidos a estrógenos por las células de la granulosa, lo que es regulado por la hormona folículo estimulante (FSH). En el folículo preovulatorio las células de la granulosa adquieren receptores para LH, y durante el pico preovulatorio de LH la granulosa es convertida en células sintetizadoras de progesterona (Ungerfeld, 2001).

Las glándulas adrenales producen estrógenos pero, bajo condiciones normales, en cantidades insuficientes para reemplazar la producción ovárica normal de estrógenos (McDonald, 1991; Van Lier, 2003a).

El estradiol actúa en numerosos órganos, además de los órganos reproductores. El efecto que tiene sobre los órganos reproductores es el desarrollo del tracto genital en la pubertad y los caracteres secundarios. La estructura del oviducto y útero son estrógeno-dependientes. Regulan la foliculogénesis colaborando con la FSH. Los estrógenos también tienen efecto sobre otros órganos, como son los causantes de la conducta sexual de la hembra durante el estro. Cesa

el crecimiento en los animales púberes. Los estrógenos incrementan la síntesis de las proteínas plasmáticas en el hígado. Los estrógenos modifican la secreción de gonadotropinas hipofisarias mediante mecanismo de retroalimentación (García Sacristán, 1998). Además, muchas respuestas tisulares importantes son estimuladas por estrógenos (Ungerfeld, 2001):

- a) promueve el crecimiento de las glándulas endometriales
- b) estimulan el crecimiento de los ductos de la glándula mamaria
- c) estimulan la actividad secretoria en el oviducto
- d) estimulan la receptividad sexual
- e) frenan el crecimiento de los huesos largos
- f) promueven el anabolismo proteico
- g) tienen actividad epitelio-trófica
- h) regulan la secreción gonadotrófica
- i) estimulan el inicio de la secreción de prostaglandina

4.2.6.5 Cortisol

La corteza de la glándula adrenal sintetiza y secreta glucocorticoides y mineralocorticoides. El cortisol es el glucocorticoide más importante en las especies domésticas (Ungerfeld, 2001). Los corticoides al ser lipófilos atraviesan fácilmente las membranas, por tanto no hay reserva de hormona almacenada. La velocidad de síntesis regula la hormona disponible (García Sacristán, 1998).

Los corticosteroides circulan como moléculas libres o se ligan a proteínas plasmáticas, únicamente las moléculas libres son biológicamente activas y se absorben en las células. El 90% del cortisol plasmático está ligado a dos proteínas plasmáticas, como son la albúmina y transcortina (o también llamada globulina ligadora de corticosteroide). La vida media del cortisol plasmático es de 2 horas. La degradación metabólica de las hormonas adrenocorticales libres se lleva a cabo principalmente en las células hepáticas y en pequeño grado en los riñones. Las moléculas conjugadas son solubles en agua y se excretan en la orina (75%) o en las heces (25%) (McDonald, 1991).

El cortisol y la corticosterona son los glucocorticoides principales de la corteza adrenal. El cortisol predomina en el hombre, caballo, cerdo, rumiante, perro y gato. La proporción de cortisol a corticosterona en la sangre venosa adrenal de ovejas es de 15-20:1. La producción de glucocorticoides por la corteza adrenal es mínima sin estimulación de la ACTH de la adenohipófisis (García Sacristán, 1998).

Los efectos de los glucocorticoides son sobre el metabolismo de carbohidratos, proteínas, de grasa, sistema endócrino, sistema músculo esquelético, sistema hematopoyético, susceptibilidad a la infección, efectos anti-inflamatorios e inmunosupresivos, sistema cardiovascular, parto, cambio conductuales y otros efectos (García Sacristán, 1998).

Los glucocorticoides tienen actividad sistémica. Intervienen en el metabolismo de la mayoría de las células del organismo. Regulan procesos que permiten que los animales se adapten a un ambiente cambiante; colaboran con la homeostasis. Los glucocorticoides aseguran el aporte de glucosa al sistema nervioso central, aún a

costa del catabolismo. La gama de efectos es tan amplia como son los tejidos del organismo. Esto se debe a que al estimular la síntesis de proteínas específicas, cada tejido responde con la actividad que le es propia. Tienen acciones tan complejas que hacen difícil su clasificación. Pueden ser anabólicas, catabólicas, reguladoras, inhibidoras, estimulantes o facilitadoras, según el tejido implicado (García Sacristán, 1998).

Estos efectos variados de la hormona causan los cambios fisiológicos principales de la respuesta al estrés. En la escala de segundos a algunos minutos, éstos incluyen: 1) desviación de la energía a ejercitar el músculo (bajo la forma de movilización de la energía almacenada, inhibición del almacenamiento de energía subsiguiente, y gluconeogénesis); 2) entrega aumentada del sustrato al músculo vía tono cardiovascular aumentado; 3) estímulo de la función inmune; 4) inhibición de la fisiología y del comportamiento reproductivos (bajo la forma de declinaciones rápidas en comportamiento proceptivo y receptivo en ambos sexos y la pérdida de erecciones en machos); 5) alimentación y apetito disminuidos; 6) aumento de consciencia y el aumento de la perfusión cerebral y las tasas de utilización de glucosa cerebral local (Sapolsky y col., 2000).

Los GC desarrollan dos clases de las acciones: la de modulación, en la cual se altera la respuesta de un organismo al estresor; y las preparatorias, en la que se altera la respuesta del organismo a un nuevo estresor o ayuda adaptarse a un estresor crónico (Sapolsky y col., 2000).

A su vez en las acciones de modulación se observan dos clases de acciones: las acciones permisivas, las cuales son ejercidas por los GC presentes antes del estresor y preparan los mecanismos de defensa por los cuales un organismo responde al estrés; y las acciones represivas, la cual es atribuible a la subida de la concentración de GC inducida por el estrés, y tienen un inicio alrededor de una hora después del inicio del estresor. Estas acciones relativamente retrasadas de los GC contienen las reacciones activadas por el estrés de la defensa y evitan que lleguen más allá. La acción estimulante de los GCs es también atribuible a la subida inducida por el estrés de concentraciones de GC, con un inicio de cerca de 1 hora o más después del inicio del estresor. Las acciones permisivas y estimulantes ambas exaltan la primera onda de la respuesta al estresor y ayudan a mediar la respuesta al estrés (Sapolsky y col., 2000).

Las acciones preparatorias no afectan la respuesta inmediata a un estresor sino modulan la respuesta del organismo a un estresor subsiguiente. Esta acción puede ser la de mediar o reprimir (Sapolsky y col., 2000).

Altos niveles continuos de glucocorticoides, por cualquier causa, suprimen la reacción inflamatoria. Esto puede o no ser útil, dependiendo si se presenta o no una infección. También la liberación masiva causa que los mecanismos de defensa se depriman y por consiguiente, son más susceptibles a infecciones (García Sacristán, 1998). Exceso del corticosteroide puede ser perjudicial así que la concentración es controlada vía el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) por los mecanismos de niveles múltiples de regeneración (Dallman M, 1992, citado por Smith y Dobson, 2002).

Los glucocorticoides están implicados en la supresión de su propia liberación a través de un mecanismo rápido (segundos a minutos), retrasado (de minutos a hora), y lentos (horas a días). Estos sistemas de retroalimentación negativa inhiben la liberación de ACTH y funcionan primariamente a nivel del hipotálamo e hipófisis, aunque otros sitios del cerebro tales como el hipocampo también han sido implicados (McCormick y col., 1998).

Las acciones del cortisol son mediadas por dos tipos de receptores intracelulares: receptores de corticosteroides tipo I y el tipo II; también designado como mineralocorticoides (MR) y receptores de glucocorticoides (GR), respectivamente (McCormick y col., 1998).

4.3 EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL (HHA)

4.3.1 Glándula Adrenal

La glándula adrenal es una estructura bilateral que se encuentra localizado craneomedialmente a los riñones (Naaman Repérant y Durand, 1997, citados por Van Lier, 2003a). En esta glándula encontramos dos tejidos endócrinos, el más externo o también llamado corteza, el cual deriva de tejido mesodérmico, contiene células que sintetizan las hormonas esteroides llamadas corticosteroides; y una parte interna o médula, que deriva del tejido ectodérmico de la cresta neural y contiene las células cromafines que sintetizan las catecolaminas (McDonald, 1991). Durante la embriogénesis, la adrenal primordial es formada como una condensación de epitelio celómico en el extremo craneal del riñón. Esta adrenal primordial consiste en derivados mesodermales de células fetales adrenales, que más tarde se convierten en células productoras de esteroides. Dentro de la adrenal de los adultos, la cortical y las células cromafines están unidas en una glándula. (Ehrhart-Bornstein y col., 1998).

Ultraestructuralmente, las células cromafines se caracterizan por su alta densidad de vesículas que contienen catecolaminas, mientras que las células adrenocorticales se pueden reconocer por sus mitocondrias típicas con crestas tubulovesiculares y retículo endoplasmático liso amplio. Las células corticales y cromafines contactan directamente entre sí sin separación de tejido conjuntivo o intersticio (Ehrhart-Bornstein y col., 1998).

Las hormonas secretadas por las glándulas adrenales regulan procesos metabólicos que permiten a los animales adaptarse a un ambiente que cambia de manera constante (McDonald, 1991). Claramente la glándula es capaz de responder a demandas fisiológicas con la flexibilidad infinita y la sutileza de una manera que depende de las interacciones de los numerosos tipos de células, cada una contribuyendo con sus propias señales a cada sistema y en diversas formas de responder a las señales de las células a su alrededor. Además de la regulación de la esteroidogénesis adrenal a través de la hipófisis, los mecanismos intradrenales juegan un rol en el desarrollo, diferenciación, procesos fisiológicos y fisiopatológicos de los procesos de la glándula adrenal. (Ehrhart-Bornstein y col., 1998).

En la mayoría de los mamíferos la corteza adrenal se compone de tres zonas, que varían tanto en sus rasgos morfológicos y en las hormonas esteroideas que ellos producen (Ehrhart-Bornstein y col., 1998). La corteza constituye aproximadamente el 90 % de la masa glandular y se puede dividir en tres zonas, glomerular (ZG) (externa), fascicular (ZF) (media) y reticular (ZR) (interna). Más de 50 esteroides diferentes se sintetizan y se liberan en la corteza adrenal. Estos esteroides son de tres clases, glucocorticoides (efecto en la homeostasis de glucosa), mineralocorticoides (efecto sobre la homeostasis de Na^+ y K^+) y hormonas esteroideas sexuales (especialmente andrógenos). La zona glomerular es necesaria para la regeneración de las células en las zonas reticular y fascicular (McDonald, 1991). La corteza adrenal está continuamente en regeneración. Las células proliferan y crecen centripetamente hasta la unión con la medula. Los dos tejidos endocrinos están íntimamente relacionados (Ehrhart-Bornstein y col., 1998).

La producción de aldosterona en la ZG está regulada principalmente por la angiotensina II y marginalmente por adrenocorticotropina (ACTH) (Lebel y Grose, 1976, Young y col., 2003, citados por Pattison y col., 2007). La secreción de cortisol en la ZF se produce principalmente en respuesta a ACTH, en lugar de la angiotensina II (Bird y col., 1998; y Lebel y Grose, 1976, Young y col., 2003, citados por Pattison y col., 2007). En la ZR, la ACTH estimula producción DHEA en forma sulfatada (DHEAS; revisado en Hyatt y col., 1983, citados por Pattison y col., 2007; Conley y Bird, 1997). Otros factores, sin embargo, son también implicados en la regulación de la producción de esteroides C19 por la ZR, que disminuye de manera constante con la edad avanzada (revisado en Conley y col., 2004, citado por Pattison y col., 2007).

Los mineralocorticoides (aldosterona) son sintetizados y liberados por las células en la zona glomerular de la corteza adrenal. La acción de la aldosterona tiene como fin un incremento en la absorción de Na^+ y agua, y excreción de K^+ y de H^+ . La aldosterona actúa sobre las células epiteliales, los túbulos colectores de los riñones, los ductos salivales, las glándulas sudoríparas, el estómago y el colon para la absorción de Na^+ . La síntesis y la liberación de la aldosterona se regula por dos sistemas principales, uno es por el sistema renina-angiotensina-aldosterona y otro es hipotálamo-hipófisis-corteza adrenal (McDonald, 1991).

Los glucocorticoides y los esteroides sexuales se sintetizan también en la zona fasciculada y en la zona reticular. Los corticoides endógenos, como el cortisol y la corticosterona, tienen una actividad predominante glucocorticoide, en tanto que la desoxicorticosterona y la aldosterona tienen una actividad sobre todo mineralocorticoide. El cortisol es el glucocorticoide más potente secretado por la corteza adrenal, mientras que la aldosterona es el mineralocorticoide más potente (McDonald, 1991).

El control integrado de la función adrenocortical implica la interacción de la corteza-médula, el suministro vascular de la glándula, las entradas neurales, el sistema inmune, los factores de crecimiento, y el sistema intraglandular renina-angiotensina y CRH-ACTH. Así como directamente la regulación de la función adrenocortical, estos sistemas se influyen mutuamente y forman complejos circuitos intra-adrenales de regulación (Ehrhart-Bornstein y col., 1998).

Es evidente que la corteza adrenal recibe innervación directa, al menos en parte, derivados del nervio esplácnico. Los neurotransmisores identificados en nervios suministran a la corteza para que tengan una variedad de acciones, con efectos directos sobre el crecimiento y la esteroidogénesis, para la modulación de las acciones de estímulos humorales en la corteza adrenal. Esta innervación también tiene un papel en la regulación vascular. Al parecer, la innervación adrenocortical tiene un papel en el ajuste fino de la función de la corteza adrenal (Ehrhart-Bornstein y col., 1998).

La médula adrenal ocupa la porción interna de la glándula adrenal y representa aproximadamente el 10 % de ésta (García Sacristán, 1998). Las células cromafines sintetizan y almacenan noradrenalina y adrenalina en gránulos citosólicos. Estas células medulares o cromafines son parte del sistema endócrino y también una rama importante del sistema nervioso simpático. En ella se produce las catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina), se sintetizan a partir de los aminoácidos fenilalanina o tirosina en las células cromafines de la médula adrenal y en neuronas adrenérgicas y dopaminérgicas. La descarga simpática de emergencia de catecolaminas puede ocurrir bajo una cantidad de condiciones y también por cambios conductuales. Las catecolaminas tienen efectos sobre el metabolismo y los músculos lisos (McDonald, 1991).

4.3.2 Glándula Hipófisis

La glándula hipófisis, también llamada pituitaria, se localiza en la base del cerebro, puede funcionar como una extensión anatómica y funcional del sistema nervioso central (Fig. 4). Por consiguiente, la adenohipófisis y el hipotálamo forman parte de un sistema de revelo de información integrado y funcional que une los sistemas nervioso y endócrino. La función es regular otras glándulas endócrinas del cuerpo y se conectan a otras glándulas endócrinas por medio de la corriente sanguínea (McDonald, 1991). La hipófisis está formada por tres estructuras anatómicas distintas: la neurohipófisis, el lóbulo intermedio y la adenohipófisis. Los lóbulos anteriores y posteriores de la hipófisis tienen un origen embrionario diferente (García Sacristán, 1998). Se encuentran muy irrigadas, hay una estrecha relación anatómica entre las células endócrinas y la red de capilares (McDonald, 1991).

La adenohipófisis refiere al lobus glandularis, esta formada por varias partes: la pars distalis, la pars tuberalis y pars intermedia. La adenohipófisis secreta seis hormonas principales: hormona del crecimiento (GH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH), hormona adrenocorticotropa (ACTH) y la hormona prolactina (PRL) (García Sacristán, 1998).

Las secreciones endócrinas de la adenohipófisis están reguladas por hormonas peptídicas producidas en núcleos del hipotálamo ventral y alcanzan la adenohipófisis a través de los vasos portales. Parece haber hormonas liberadoras hipotalámicas separadas que regulan la tasa de secreción de cada hormona trófica secretada por la adenohipófisis. La hormona producida por las glándulas endócrinas ejerce un control de retroalimentación negativa sobre las neuronas neurosecretoras

del hipotálamo que sintetizan la hormona liberadora correspondiente, y en menor grado sobre la adenohipófisis (McDonald, 1991).

La neurohipófisis es la hipófisis posterior y está formada por una gran extensión de axones que provienen de los núcleos superiores hipotalámicos. Las dos neurohormonas neurohipofisarias más importantes son la vasopresina (ADH) y la oxitocina, son sintetizadas en el cuerpo celular de los núcleos y descienden a lo largo de los axones para ser almacenadas en gránulos secretores y son liberadas por exocitosis en respuesta a estímulos nerviosos. La neurohipófisis sólo es funcionalmente un lugar de almacenamiento y liberación de estas hormonas hipotalámicas (García Sacristán, 1998).

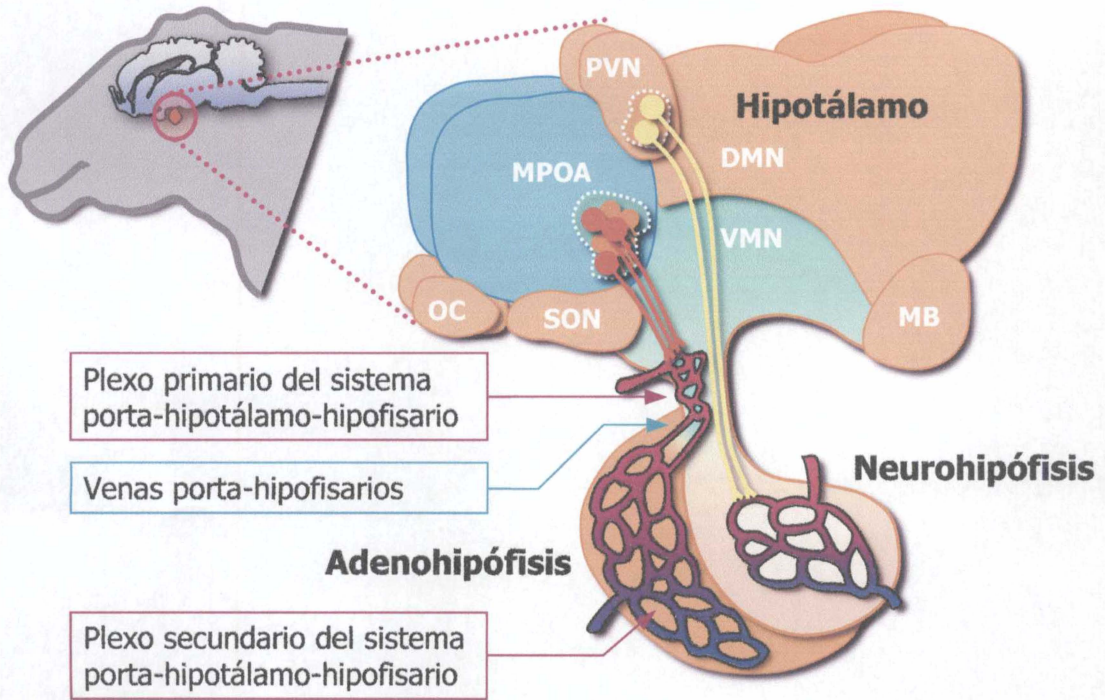


Figura 4: Representación esquemática de la unidad Hipotálamo-Hipófisis. Núcleos hipotalámicos: PVN = Núcleo Paraventricular, MPOA = Área Preóptica Media, DMN = Núcleo Dorsomedial, VMN = Núcleo Ventromedial, MB = Cuerpos Mamilares, OC = Quiasma Óptico, SON = Núcleo Supraóptico. Adaptado de Senger (2004).

4.3.3 Hipotálamo

El hipotálamo es una estructura en forma de cono que forma parte del cerebro, proyectándose hacia su zona ventral y terminando en el tallo infundibular de la hipófisis. Cada mitad del hipotálamo contiene neuronas con características nerviosas y endócrinas comunes, lo que hace que se estudien agrupadas en "núcleos" (núcleos anterior o craneal, arqueado, área lateral, eminencia media, paraventricular, supraóptico y área ventromedial) (García Sacristán, 1998) (Fig. 4).

La porción craneal del hipotálamo es el lugar de síntesis de las neurohormonas hipofisarias (oxitocina y ADH). Estas neurohormonas peptídicas, producidas en los somas neuronales del hipotálamo, alcanzan la neurohipófisis a través de los axones de dichas neuronas, en donde se almacenan hasta su posterior liberación a la sangre. Las hormonas hipotálamicas son: hormona liberadora de tirotropina (TRH), hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), hormona liberadora de corticotropina (CRH), Arginina vasopresina (AVP), hormona liberadora de hormona del crecimiento (GRH), hormona inhibidora de hormona del crecimiento (GIH), hormona liberadora de PRL (PRH), hormona inhibidora de PRL (PIH) (García Sacristán, 1998).

El hipotálamo y la hipófisis forman una unidad fisiológica muy importante para la síntesis de hormonas peptídicas. El hipotálamo es probablemente el principal intermediario entre el sistema nervioso central y los principales controles endócrinos hipofisarios (García Sacristán, 1998).

4.3.4 Actividad del eje HHA

La respuesta endócrina al estrés ocurre en diferentes ondas. La primera onda, ocurre dentro de los primeros segundos, implica: 1) secreción aumentada de catecolaminas (epinefrina y norepinefrina) del sistema nervioso simpático; 2) liberación hipotalámica de CRH en la circulación portal y, quizás 10 segundos más tarde, la secreción aumentada de ACTH hipofisaria; 3) liberación hipotalámica disminuida de GnRH y, poco después de eso, disminuye la secreción de gonadotropinas hipofisarias; y 4) secreción hipofisaria de PRL y (en primates) de la GH, y secreción pancreática del glucagón. En el caso de una hemorragia, esta primera onda también incluye la secreción masiva de arginina vasopresina (AVP) de la neurohipófisis y de renina del riñón (en contraste con la respuesta moderada de AVP después de otros estresores). Una segunda, una onda más lenta implica a las hormonas esteroideas. Sobre el curso de minutos, se estimula la secreción de GC y la disminución en la secreción de esteroides gonadales (Sapolsky y col., 2000). Por lo tanto, las situaciones estresantes activan el eje HHA y, con ello causan un aumento de cortisol plasmático (Alam y Dobson 1986; Dobson, 1988, citados por Dobson y Smith, 1998). Esto es esencial para la homeostasis (Dobson y Smith, 1998).

La liberación de glucocorticoides se regula a través del eje HHA, con CRH-AVP y ACTH como los respectivos secretagogos (Ehrhart-Bornstein y col., 1998). La hormona principal que regula la síntesis y la secreción de glucocorticoides adrenales es la ACTH. En ovejas, ganado bovino, y los cerdos, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina vasopresina (AVP) participan en la regulación de la secreción de ACTH, y los dos péptidos parecen obrar recíprocamente para realzar esa secreción. En ganado bovino y cerdos, la CRH es el péptido más potente, mientras que AVP es el más potente en ovejas (Minton, 1994).

Los glucocorticoides y las catecolaminas actúan extensamente para aliviar los efectos del estrés. Los sistemas activados por el estrés pueden influenciar la reproducción a nivel del hipotálamo, de la glándula hipófisis o de las gónadas. Sin embargo, el impacto principal se piensa que podría estar dentro del cerebro o en la

glándula hipófisis (Moberg, 1987; Brann y Mahesh, 1991, citados por Tilbrook y col., 2000; Rivier y Rivest, 1991). La medida de las concentraciones de las gonadotropinas en plasma proporciona una buena indicación de los efectos en estos niveles más altos, puesto que la secreción pulsátil de la LH es un reflejo de la secreción de GnRH del hipotálamo (Clarke y Cummins, 1982; Tilbrook y Clarke, 1995, citados por Tilbrook y col., 2000). La secreción y las acciones de GnRH son influenciadas por las acciones de retroalimentación de los esteroides gonadales y de la inhibina. Así, el estrés puede afectar la secreción de las gonadotropinas a través de los mecanismos que modifican la síntesis o la secreción de GnRH, la sensibilidad de las gonadotropinas a las acciones de GnRH, o a las acciones de retroalimentación de las hormonas gonadales (Tilbrook y col., 2000).

El sistema inmune influye en la actividad del eje HHA estimulando la secreción de CRH y ACTH. Las citoquinas producidas por las células inmunitarias que regularmente se infiltran en la adrenal o por sí mismas en las células adrenales pueden influir directamente en la función adrenocortical. El sistema inmunitario y el sistema endócrino del eje HHA tienen un papel crucial en la compleja respuesta adaptativa al desafío de la homeostasis, ya sea por el estrés o enfermedad (Ehrhart-Bornstein y col., 1998).

Los factores psicológicos son tan efectivos como los hechos físicos en el aumento de actividad del eje HHA si las concentraciones plasmáticas de corticosteroides se utilizan como índice de sensibilidad a los estímulos ambientales. Componentes psicológicos de la estimulación del ambiente también pueden afectar la actividad HHA en los contextos sociales. Reacciones hormonales y respuestas de comportamiento no se producen de forma independiente. De hecho, están íntimamente interrelacionados (Leshner, 1978, citado por Dantzer y Mormède, 1983).

Los distintos genotipos no responden de manera similar a los diferentes ambientes, debido a las interacciones genético-ambiente (Siegel, 1979, citado por Dantzer y Mormède, 1983). Las experiencias previas son otro factor que se considera que tienen profunda influencia en el comportamiento y las respuestas neuroendócrinas (Dantzer y Mormède, 1983).

4.4 DIFERENCIAS SEXUALES EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS

Las hormonas relacionadas al estrés pueden influir en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG), en el hipotálamo (afectando la secreción de GnRH) y la hipófisis (afectando la secreción de gonadotropinas), y con efectos directos sobre las gónadas de menor importancia (Tilbrook y col., 2000). Esta interacción entre el eje HHA y el eje de HHG no se dirige de en una sola dirección. Hay varios autores que afirman que así como el eje HHA afecta el eje HHG frente a un estrés, el eje HHG también tiene un efecto sobre el eje HHA (Kitay, 1961; Nowak y col., 1995; Viau y Meaney, 1991; Xiao y col., 1994; Handa y col., 1994). Hay evidencia que las gónadas afectan la manera que el eje de HHA responde al estrés. Los caminos reguladores de la modulación esteroidea gonadal en la actividad del eje HHA no están del todo claros (Yukhananov y Handa, 1997).

Tanto en seres humanos, como en los animales, la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) presenta dimorfismo sexual (Ogilvie y Rivier, 1997). La activación del eje HHA inducido por el estrés difiere entre los sexos en un número de especies y es comúnmente aceptado que los esteroides sexuales son en gran parte responsables de estas diferencias debido al sexo (Handa y col., 1994; Young, 1995; Patchev y Almeida, 1998). Estas diferencias existen en una variedad de especies y parece implicar todos los niveles del eje. De modo general, se cree que el eje HHA de hembras muestra actividad aumentada en comparación con el de machos. La presencia de estrógenos puede facilitar la respuesta del eje HHA, mientras que los andrógenos generalmente parecen ser inhibitorios. Hay, sin embargo, muchos informes en los cuales estas relaciones simples no parecen sostenerse (Broadbear y col., 2004a).

Los esteroides sexuales tienen efectos organizativos durante el desarrollo fetal y neonatal (presente durante el período perinatal pudiendo organizar los substratos neuronales, dando por resultado alteraciones de por vida en la función endócrina) y también tienen efectos activacionales en el eje de HHA en el adulto (efectos directos o indirectos en la circulación de los niveles de estas hormonas, que se pueden eliminar por gonadectomización o imitar por regímenes esteroides de reemplazo) (Ogilvie y Rivier, 1997; McCormick y col., 1998). Por ejemplo en ratas, la secreción de corticosterona es influenciada por el estatus gonadal. El estado hormonal sexual de un organismo modula el eje HHA. Mucha evidencia acumulada en ratas indica que los estrógenos tienen efectos estimulantes, y el andrógeno tiene efectos inhibitorios en la función de HHA. Por ejemplo, hay diferencias sexuales en los diferentes niveles del eje de HHA, tales como incremento en los niveles basales y de estrés de ACTH y corticosterona mayor en hembras que en los machos, y niveles más altos del globulina transportadora de corticosteroides (CBG), CRH, ARN mensajero de CRH en el Núcleo Paraventricular del hipotálamo de hembras que en machos. Las diferencias del sexo en el eje HHA están presentes en los recién nacidos, y las hormonas gonadales modulan la función del eje HHA tanto en recién nacidos como en los adultos (McCormick y col., 1998).

Los esteroides gonadales afectan la actividad del eje HHA en su nivel basal y en condiciones de estrés en ratas (Kitay, 1996; Viau y Meaney, 1991) y en primates (Xiao y col., 1994). Sin embargo, la regulación a través de la modulación de los esteroides gonadales de la actividad del eje HHA es aún desconocida (Yukhananov y Handa, 1997). Los andrógenos y los estrógenos pueden actuar en cada nivel del eje HHA, afectando síntesis glucocorticoides, así como CRH, de AVP, ACTH y la secreción de glucocorticoides (Canny y col., 1999). En ratas los estrógenos estimulan actividad del eje de HHA (Viau y Meaney, 1991; Burgess y Handa, 1992; Uhart y col., 2006) y, en respuesta al estrés las ratas hembras han demostrado consistentemente mayores aumentos en las ACTH y la corticosterona comparados con los machos (Kitay, 1961; Handa y col., 1994; Uhart y col., 2006). Es plausible que los esteroides sexuales pueden también influenciar la regulación opioide de la activación del eje de HHA (Uhart y col., 2006). En la rata, las diferencias ligadas al sexo en la actividad secretora de las glándulas adrenales se mantiene mediante la circulación de hormonas gonadales, que actúan no sólo en el nivel de hipotálamo-hipófisis, sino también directamente en las células adrenocorticales (Nowak y col., 1995).

En los ovinos, diversos tipos de estrés agudo en carneros y ovejas intactos y gonadectomizados dieron lugar a diferencias sexuales en las respuestas del cortisol que eran dependientes del estresor, pero que no fueron afectadas por el estatus gonadal (Turner y col., 2002). Sin embargo, se han encontrado diferencias entre ovinos machos y hembras a todos los niveles del eje HHA y algunas de estas diferencias son claramente influenciadas por la presencia y la ausencia de las gónadas. A pesar de que generalmente se ha encontrado que los roedores hembras exhiben la mayor respuesta del eje de HHA al estrés, se ha encontrado en ovejas que la dirección de la diferencia del sexo es influenciada por el tipo de estresor. Algunos estudios en ovinos mostraron diferencias de sexo en la actividad del eje HHA en respuesta al estrés por aislamiento y sujeción en animales gonadectomizados (Turner y col., 2002), mientras que en otros no se observaron diferencias (Tilbrook y col., 1999; Rivalland y col., 2006, citados por Rivalland y col., 2007). Resultados publicados por Turner y col. (2002) muestran que el sexo que tenga la mayor respuesta en cortisol depende del estresor impuesto y sugieren que estas diferencias por sexo tienden a ser en el nivel de la unidad hipotálamo-hipofisaria en lugar de en la glándula adrenal.

Existen diferencias relacionadas al sexo en: los niveles de receptores tipo I y II de glucocorticoides en el hipocampo y el hipotálamo (Turner y Weaver 1985; Carey y col., 1995; MacLusky y col., 1996, citados por Canny y col., 1999); la expresión de la CRH y de la AVP en el hipotálamo (Vamvakopoulos y Chrousos 1993; Paulmyer-Lacroix y col. 1996; Viau y Meaney 1996, citados por Canny y col., 1999); la secreción de ACTH de la hipófisis anterior (Gallucci y col., 1993, citados por Canny y col., 1999); y el tamaño y el potencial esteroidogénico de las glándulas adrenales (Gaskin y Kitay, 1970; Roelfsma y col., 1993, citados por Canny y col., 1999; Kitay, 1961; EL-Migdadi y col., 1995). Se piensa que las diferencias observadas entre los machos y las hembras reflejan los efectos diferenciales de los esteroides sexuales en el eje de HHA, pues la actividad de muchas proteínas que regulen el eje es regulada directamente por los esteroides y los receptores de los esteroides sexuales están presentes en muchos niveles del eje (Herbison, 1995; Bethea y col., 1996; Madigou y col., 1996, citados por Canny y col., 1999; Hirst y col., 1992). Particularmente, los estrógenos parecen tener una acción estimulante en el eje de HHA, y por lo tanto el eje de la hembra exhibe reactividad generalmente mayor que el del macho (Young y Crew, 1995, citados por Canny y col., 1999; Handa y col., 1994). Aunque está claro que el eje de HHA de los ovinos se puede regular por los factores relacionados al sexo, pocas comparaciones formales se han hecho entre los machos y las hembras de esta especie (Canny y col., 1999).

Canny y col. (1999), trabajando con tejidos de ovinos, sugieren que las diferencias del sexo existen a nivel de la glándula adrenal pero no de la glándula hipófisis. Ellos observaron que las células adrenocorticales de las hembras tenían un mayor potencial esteroidogénico y que este aumento parece ocurrir a nivel post-receptor. En el caso específico de las ovejas, el contenido del ARNm de CRH en el núcleo paraventricular no se alteró durante la gestación, lactancia o con tratamientos con estradiol o progesterona (Broad y col., 1995, citados por Canny y col., 1999). La secreción *in vitro* de ACTH en respuesta a CRH, a AVP o a su combinación no fue afectada por el sexo o el estatus gonadal de los animales de los cuales fueron derivados las adenohipófisis (Canny y col., 1999). A nivel de la glándula adrenal, la

diferencia más llamativa observada *in vitro* era que la producción del cortisol en respuesta a la ACTH era mayor en las hembras. La corteza adrenal de la hembra produce más glucocorticoides que la del macho, un efecto que ha sido atribuido al estímulo de la glándula adrenal por el estradiol (Coyne y Kitay, 1969, citados por Canny y col., 1999; Kitay, 1961; Handa y col., 1994). En cambio, no parece en las ovejas que el estradiol sea el único regulador de la sensibilidad adrenocortical. Aunque la producción basal del cortisol era más grande por las células derivadas de ovinos machos intactos (Canny y col., 1999).

Se ha observado que la expresión o la actividad de varias enzimas esteroidogénicas en la adrenal es mayor en hembras que en machos, o que es estimulada por los estrógenos e inhibida por los andrógenos (Belanger y col., 1991; Gallant y col., 1991; Issacson y col., 1993, citados por Canny y col., 1999; Perry y Stalvey, 1992; El-Migdadi y col., 1995; Nowak y col., 1995). Otros investigadores han demostrado varios efectos de tratamiento de esteroides sexuales en la actividad del eje de HHA en las ovejas (Komesaroff y col., 1998; Keller-Wood 2000, citados por Broadbear y col., 2004b). Estas observaciones indican que las diferencias relacionadas al sexo son significativas y existen en el eje de HHA de ovejas (Broadbear y col., 2004b).

Si bien Turner y col. (2002) no encontraron diferencias sexuales en la secreción de cortisol post-ACTH, trabajos nacionales han demostrado lo contrario (Van Lier y col., 2003b, Carbone y de Larrobla, 2005). Estimulando directamente la corteza adrenal de ovinos machos y hembras, enteros y gonadectomizados, con ACTH exógena se observaron diferencias sexuales, con las hembras enteras secretando más cortisol que los machos enteros, siendo las respuestas de los animales gonadectomizados intermedias (Van Lier y col., 2003b). Usando carneros gonadectomizados (con y sin reemplazo de testosterona) y ovejas gonadectomizadas (con y sin reemplazo de estradiol), Carbone y de Larrobla (2005) observaron diferencias sexuales en la secreción de cortisol post-ACTH aún en los animales sin reemplazo hormonal. Esto indicaría que parte de las diferencias sexuales se mantiene en animales gonadectomizados, aunque no siempre es observado (Turner y col., 2002; Van Lier y col., 2003b). Como la gonadectomización logra eliminar o disminuir las diferencias sexuales en la secreción de cortisol en respuesta ACTH, es probable que los esteroides gonadales sean responsables, por lo menos en parte, de estas diferencias, y que puedan tener una acción directa en la corteza adrenal (Van Lier, 2003b).

Los efectos de las hormonas esteroideas en los tejidos blanco se ejercen a través de la unión a un receptor específico (Van Lier, 2003c). La presencia de receptores para las hormonas sexuales en las células adrenocorticales está bien documentada en ratas, aunque muchos reportes son de larga data. Se han encontrado receptores a andrógenos (RA) (Calandra y col., 1980) y a estrógenos (RE) (Cutler y col., 1978; Calandra y col., 1980; Hirst y col., 1992) en roedores. En ovinos también se ha demostrado la presencia de RE en la glándula adrenal (Van Lier y col., 2003c). La presencia de receptores de esteroides en un tejido implica efectos genómicos del esteroide en el mismo. Pero aún sin la presencia de los clásicos receptores intracelulares, hay evidencia que los esteroides pueden tener efectos no genómicos agudos en un tejido. Por lo tanto, los efectos de los estrógenos y andrógenos sobre la actividad de la esteroidogénesis adrenocortical

pueden ser tanto no genómico y/o ser debido a síntesis *de novo* de proteínas (Nowak y col., 1995).

4.4.1 Estrés en carneros

La reproducción en machos es esencialmente diferente a la reproducción en las hembras, en éstos la producción de gametos es un proceso continuo desde que comienza la pubertad. La espermatogénesis raramente se detiene, aunque los ovinos son reproductores estacionales (Lincoln y col., 1980, citados por Carbone y de Larrobla, 2005). La calidad y cantidad de espermatozoides son afectadas por la estación (Amir y col., 1965; Bielli y col., 1997, citado por Carbone y de Larrobla, 2005) pero los carneros retienen su capacidad de fertilización durante toda la estación no-reproductiva. Esto puede reflejar un mecanismo de ahorro de energía ya que la probabilidad de encontrar ovejas ciclando en la estación no-reproductiva es muy baja. Durante la estación reproductiva en los carneros, la supresión por andrógenos del eje HHA es probablemente máxima permitiendo al animal el escape de cualquier efecto detrimental del estrés en su estado reproductivo. Los machos presentarían una exitosa protección contra el estrés durante la estación reproductiva, ya que la competencia entre machos es un aspecto muy importante de la reproducción en animales que viven en grupos. Cada macho compite por perpetuar sus propios genes en la población. En esta línea de pensamiento, se puede esperar que la estrategia de los machos sea la conservación de la energía durante el invierno o durante un estrés, sin bloquear totalmente el proceso de manera de poder reproducirse siempre que una oportunidad se presente. (Van Lier, 2003a).

4.4.2 Estrés en ovejas

La reproducción en las hembras está regida por varios fenómenos de todo o nada. La oveja ovula o no ovula, concibe o no concibe, y mantiene o no mantiene su gestación. Esto hace a su fisiología reproductiva particularmente vulnerable, en comparación con el carnero. El costo de reproducción es alto para la oveja si se toma en cuenta la inversión en gestación, lactancia y cría del cordero. Evitar estos costos en situaciones adversas (falla en la concepción o pérdida embionaria temprana) puede ser una estrategia acertada en cuanto se posterga la reproducción para un momento más propicio. El estrés interfiere en la ovulación de muchas especies (Van Lier, 2003a).

5. OBJETIVO

El objetivo de esta tesis fue evaluar en qué medida el sexo y el ambiente esteroideo afecta la abundancia relativa de los transcritos (mRNA) de los receptores de estrógeno (RE α), andrógenos (RA), y de ACTH (MC2R), y la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR) en la glándula adrenal de ovinos gonadectomizados, con y sin reemplazo hormonal.

6. HIPOTESIS

Las diferencias sexuales en la secreción de cortisol en el ovino son parcialmente debidas a los efectos de los esteroides sexuales sobre la regulación de la corteza adrenal.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Condiciones de trabajo

El trabajo de campo fue realizado en la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía Salto (EEFAS), en el mes de mayo del año 2007. Los ovinos con los cuales se realizaron la experimentación se encontraban hasta la tarde previa al comienzo del estudio en campo natural con libre acceso al agua. La toma de muestras de sangre se realizaba dentro de un galpón, el cual presentaba un corral. Luego de realizado los muestreos los animales se los colocaban nuevamente en el campo natural con libre acceso al agua.

7.2 Animales

Se utilizaron dieciséis ovinos de la raza Corriedale de diferente procedencia, de los cuales ocho eran ovejas adultas ovariectomizadas y ocho eran carneros orquiectomizados. El peso vivo (PV, Kg) y la condición corporal (CC en escala 1-5) se muestran en el cuadro 1. Los carneros fueron orquiectomizados con más de 5 meses previo al comienzo del experimento y de las ovejas dos fueron ovariectomizadas en el año 2005 y seis ovejas entre 3 y 7 semanas previas al comienzo del experimento. En cada caso la gonadectomización se realizó bajo efecto de xilacina 2% (0.5 mL im) y con infiltración de anestésico local (lidocaina al 2%, 5 mL sc). Para obtener las glándulas adrenales fue necesario el sacrificio de los animales, para lo que se les realizó anestesia profunda con tiopental sódico vía iv y luego se procedió al desangrado mediante el degüello. Toda la experimentación animal fue realizada de acuerdo a las recomendaciones de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República y el protocolo de experimentación fue aprobado por la CHEA (N° 7101/07).

Cuadro 1: Peso vivo (Kg) y condición corporal promedios (\pm EEM) para los carneros y las ovejas antes del sacrificio.

Grupo	Peso Vivo (\pm EEM)	Condición Corporal (\pm EEM)
Carneros	70.6 (\pm 2.8)	3.6 (\pm 0.19)
Ovejas	41.5 (\pm 2.3)	3.2 (\pm 0.20)

7.3 Diseño experimental

Para cada sexo se formaron dos grupos (control y tratado con esteroides sexuales) tomando en cuenta el momento de gonadectomía y el peso vivo. Cuatro ovejas recibieron 0.1 mL de Benzoato de Estradiol (BE) im (5 mg/mL en vehículo oleoso, Laboratorio Dispert S.A., Montevideo, Uruguay) y cuatro carneros recibieron 1 mL de Ciclopentilpropionato de Testosterona (CT) im (100 mg/mL en vehículo oleoso, Laboratorio Dispert S.A., Montevideo, Uruguay). Se tomaron muestras de sangre mediante venipunción de la vena yugular, inmediatamente previo a la aplicación de los tratamientos (hora 0) y a las 12, 24, 48 y 72 h para corroborar la efectividad de los tratamientos hormonales. Luego de la última muestra se sacrificaron a los animales para obtener las glándulas adrenales (Fig. 5). La sangre fue centrifugada dentro de la hora de colectada (en tubos heparinizados) y se guardó el plasma a -20° C hasta su análisis por radioinmunoanálisis (RIA) (estradiol en hembras y testosterona en machos). El sacrificio de los animales se realizó administrando tiopental sódico vía iv en bolo y degüello. Primero se realizó el sacrificio de los machos y 24 h después el sacrificio de las hembras. Se pesaron las glándulas adrenales y una mitad fue fijada e incluida en parafina. La otra mitad fue congelada en nitrógeno líquido y luego almacenada a -80° C para RT-PCR en tiempo real de ARNm de receptores de Estrógenos ($RE\alpha$), de Andrógenos (RA), de ACTH (MC2R) y la proteína StAR.

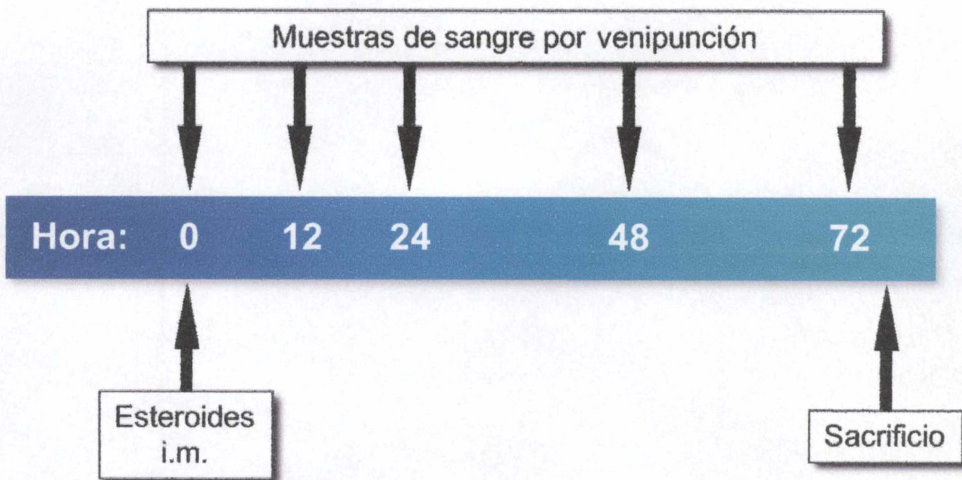


Figura 5: Esquema del cronograma del experimento. Se tomaron 5 muestras de sangre para controlar los niveles de estradiol (hembras) y testosterona (machos) en sangre. Inmediatamente después de la muestra de la hora 0, cuatro ovejas recibieron 0.5 mg de BE im y cuatro carneros recibieron 100 mg de CT im.

7.4 Análisis hormonales

Los análisis hormonales se realizaron en el Laboratorio de Técnicas Nucleares (Facultad de Veterinaria). La concentración de testosterona se determinó utilizando un estimador radioinmune previamente validado para ovinos (Pérez y col., 1997) (Coat-A-count radioimmunoassay kits, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). Los coeficientes de variación (CV) intra-ensayo para dos muestras control (bajo 3.98 nmol/L y alto 24.1 nmol/L) corridos en duplicado al principio y final de cada ensayo, fueron 9.9% y 6.1%, respectivamente. Los CV inter-ensayo correspondientes fueron 12.9 y 5.7%, respectivamente. El límite analítico del RIA para testosterona fue 0.4 nmol/L. Para la determinación de estradiol se extrajo la fase liposoluble de las muestras con éter luego se determinaron las concentraciones de la hormona por RIA en fase líquida previamente descrito (Meikle y col., 1997). Todas las muestras fueron analizadas en una misma corrida de RIA. Los CV intra-ensayo para dos muestras de control (bajo 14.4 pmol/L and medio 45.3 pmol/L) fueron 23.6% y 6.2%, respectivamente. El límite analítico de detección del RIA para estradiol fue 2.6 pmol/L.

7.5 PCR de Transcripción Reversa en Tiempo Real

Para la determinación de los transcritos de RE α , RA, MC2R y StAR por RT-PCR en tiempo real, se procedió a la extracción total del ARN usando TRIZOL (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA), precipitado con LiCl para remover inhibidores de la síntesis de cDNA y tratado con ADNasa para remover ADN contaminante (Naderi y col., 2004). La concentración de ARN se determinó por absorbancia a 260 nm, la pureza de todos los aislados de ARN fue evaluado a partir de la tasa de absorbancia 260/280 y la integridad por electroforesis (gel de agarosa 1%). Todas las muestras presentaban tasas de $A_{260/280}$ entre 1.8 y 2.0.

Para cada muestra se sintetizó ADNc por la reacción de transcripción reversa (RT) usando SuperScript III First-Strand Síntesis System Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) con primers no específicos y 1 μ g de ARN total como modelo. Primers para amplificar específicamente ADNc de MC2R, RE α , y StAR, fueron obtenidos de la literatura, así como de los genes housekeeping HPRT y PRL19 (Chen et al., 2006; Jaquierey et al., 2006; Myers et al., 2005, Schams et al., 2003). Las secuencias de los primers se muestran en Cuadro 2. Primers para RA ovino fueron diseñados a partir de ARNm de RA ovino, número de acceso de secuencia AF105713.1. El dúo de primers fue diseñado usando software Primer Express 3.0 de Applied Biosystems.

La cuantificación de los transcritos fue determinada en RT-PCR en tiempo real (real-time qRT-PCR; Rotor-GeneTM 6000; Corbett Life Sciences, Sydney, Australia) usando SYBR green (Quantimix; Biotools, Madrid, España) y primers diseñados específicamente para los genes de interés (RE α , RA, MC2-R y StAR) y para los genes de control interno (PRL19 y HPRT) (Cuadro 2). Se desarrolló una curva de titulación para cada primer a partir de la cuantificación de 0.75, 1.5, 25, 100 y 200 ng de ARN transcripto para determinar la eficiencia de amplificación. Una muestra calibradora (un pool de seis animales pertenecientes al experimento) y agua se utilizaron como control positivo y negativo, respectivamente. Para cada gen para cada animal se determinó el número de ciclos requeridos para alcanzar el umbral (C_T). Para estandarizar las medidas de cuantificación de expresión génica debido a

diferencias en la cantidad de células extraídas de cada muestra de tejido, en la calidad del ARN, y en la eficiencia de la RT, los datos de expresión de ARNm de cada gen de interés fueron normalizados respecto a los genes usados como controles internos ($\Delta C_T = [C_T (\text{genes de interés}) - C_T (\text{gen control})]$ de los que se usó la media geométrica), y fueron expresados entonces en relación a la muestra de control positivo ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T - \Delta C_T [\text{control positivo}]$, cuantificación relativa; Livak y Schmittgen, 2001).

Cuadro 2: Primers usados para la cuantificación de ADNc de los genes de interés y los genes de control endógeno.

Gen ¹	No. de acceso ²	Dirección	Secuencia del primer	Largo (bp)	Fuente
HPRT	XM_580802	Sentido	TGGAGAAGGTGTTTATTTCCTCATG	105	Carriquiry y col., 2008
		Antisentido	CACAGAGGGCCACAATGTGA		
PRL19	AY158223	Sentido	CCCCAATGAGACCAATGAAATC	119	Chen y col., 2006
		Antisentido	CAGCCCATCTTTGATCAGCTT		
RE α	AY033393	Sentido	AGGGAAGCTCCTATTTGCTCC	234	Schams y col., 2003
		Antisentido	CGGTGGATGTGGTCCTTCTCT		
RA	AF105713.1	Sentido	AAAGAGCCGCTGAAGGAAAAC	100	Este estudio
		Antisentido	CGGAGACGACAAGATGGACAA		
MC2R	NM_001009442	Sentido	ATGAAACACATTCTCAATCTG	1023	Myers y col., 2005
		Antisentido	AACGTTTTCCAAAATCTTGATC		
StAR	AF290202	Sentido	AAGGTCCTGCAGAAGATT	1152	Jaquierey y col., 2006
		Antisentido	CGCCTCTGCAGCCAACCTC		

¹HPRT = hipoxantina fosforibosiltransferasa (gen de control endógeno); PRL19 = proteína ribosomal L19 (gen de control endógeno); RE α = receptor de estrógenos α ; RA = receptor de andrógenos; MC2R = receptor de melanocortina 2 (receptor de ACTH); StAR = steroid acute regulatory protein.

²Secuencias de GeneBank.

7.6 Análisis estadístico

Los análisis fueron realizados usando el programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU). Se realizó un análisis de varianza de los datos de tejido usando el procedimiento MIXED. Los dos efectos principales que se estudiaron fueron *sexo* (macho o hembra) y *estatus endócrino* (con o sin reemplazo de esteroide sexual). Las variables analizadas fueron las abundancias relativas de ARNm de MC2R, RE α , RA y StAR (adrenal), y peso relativo de las glándulas adrenales. Los coeficientes de correlación usados para describir las relaciones entre las expresiones de los genes y con las hormonas, fueron estimados usando el procedimiento CORR. El nivel de significancia considerado fue $P < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Testosterona

La testosterona no fue detectada en ninguna de las muestras de los carneros castrados no tratados. El reemplazo esteroideo con Ciclopentilpropionato de Testosterona (TC) incrementó efectivamente los niveles de testosterona en todos los carneros castrados (Cuadro 3).

8.2 Estradiol

El estradiol fue bajo, pero detectable, en todas las ovejas ovariectomizadas. La administración de Benzoato de Estradiol (BE) aumentó los niveles de 17 β -estradiol en el plasma de todas las ovejas (Cuadro 3).

Cuadro 3: Media (\pm EEM) de las concentraciones de testosterona (nmol/L) en carneros castrados tratados con CT (TX+CT) en las 72 horas antes del sacrificio, y media (\pm EEM) de las concentraciones de 17 β -estradiol (pmol/L) en ovejas ovariectomizadas tratadas con BE (OVX+BE) en las 72 horas antes del sacrificio.

Grupo	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
TX+CT (Testosterona, nmol/L)	0.4	18.6 (\pm 1.9)	23.8 (\pm 0.4)	24.9 (\pm 1.7)	22.8 (\pm 2.4)
OVX+BE (Estradiol, pmol/L)	13.3 (\pm 1.3)	275 (\pm 72)	288 (\pm 43)	252 (\pm 25)	118 (\pm 26)

8.3 Peso adrenal absoluto y relativo

El peso adrenal absoluto no fue diferente entre los sexos ($P = 0.3811$), el reemplazo de esteroides no tuvo ningún efecto ($P = 0.6962$), y la interacción del sexo y reemplazos de esteroides no fue significativa ($P = 0.6494$) (Cuadro 4). El peso adrenal relativo fue diferente entre los sexos ($P = 0.0002$), pero los reemplazos con esteroides no tuvo ningún efecto ($P = 0.8916$), y la interacción del sexo y reemplazos con esteroides no fue significativa ($P = 0.6465$) (Cuadro 4).

Cuadro 4: Media (\pm EEM) de peso adrenal absoluto (mg) y peso adrenal relativo (mg de tejido adrenal/kg de peso corporal) en ovinos de acuerdo al sexo y reemplazo hormonal.

	Ovejas sin BE	Ovejas con BE	Carneros sin CT	Carneros con CT
Peso adrenal absoluto	3576 (\pm 370)	3256 (\pm 370)	3740 (\pm 370)	3764 (\pm 370)
Peso adrenal relativo	79.5 (\pm 4.76) a	78.0 (\pm 4.76) a	52.1 (\pm 4.76) b	55.0 (\pm 4.76) b

Letras diferentes (a,b) indican diferencias significativas dentro de la fila ($P < 0.05$).

8.4 Abundancia relativa de transcritos MC2R, RE α , RA y StAR

Las curvas de titulación de cada uno de los genes fueron paralelas y la eficiencia de la transcripción estaba dentro de los límites normales para todos los

genes probados. El ciclo umbral para la transcripción del gen StAR fue menor al de todos los otros genes, lo que indica una transcripción relativamente más abundante (Cuadro 5).

Cuadro 5: Media (\pm EEM) de los ciclos umbral (C_T) para cada uno de los genes estudiados y los genes de control endógeno.

Gen	RE α	RA	MC2R	StAR	RPL19	HPRT
C_T	16.41 (\pm 0.108)	16.13 (\pm 0.144)	14.53 (\pm 0.142)	11.37 (\pm 0.113)	13.76 (\pm 0.081)	17.96 (\pm 0.054)

El cuadro 6 muestra los valores de P de los efectos principales y su interacción para cada uno de los genes transcritos, así como para las comparaciones de los distintos grupos. Para la abundancia relativa del transcrito de RA el efecto de sexo tendió a ser significativo, el efecto de reemplazo con esteroides no fue significativo, sin embargo, la interacción sexo*reemplazo con esteroides sí lo fue. Los efectos de sexo y de reemplazo con esteroides sobre los transcritos de MC2R y RE α no fueron significativos, pero su interacción sí lo fue. La abundancia relativa del transcrito de StAR no fue diferente entre los distintos grupos. Las abundancias relativas de ARNm de los genes estudiados se muestran en la figura 6.

Cuadro 6: Valores de P para los efectos principales, su interacción y las comparaciones de grupos, para cada uno de los transcritos de los genes estudiados.

Efectos	RE α	RA	MC2R	StAR
Sexo	0.2042	0.0844	0.1172	0.3900
Reemplazo con Esteroides	0.9312	0.7799	0.5832	0.2782
Sexo*Reemplazo con Esteroides	0.0438	0.0143	0.0209	0.6764
OVX – OVX+BE	0.1174	0.0881	0.1560	0.2910
OVX – TX	0.4961	0.4774	0.4864	0.7472
OVX – TX+CT	0.4282	0.1758	0.1622	0.8729
OVX+BE – TX	0.2783	0.2420	0.4013	0.1493
OVX+BE – TX+CT	0.0288	0.0063	0.0104	0.3697
TX – TX+CT	0.1419	0.0446	0.0416	0.6232

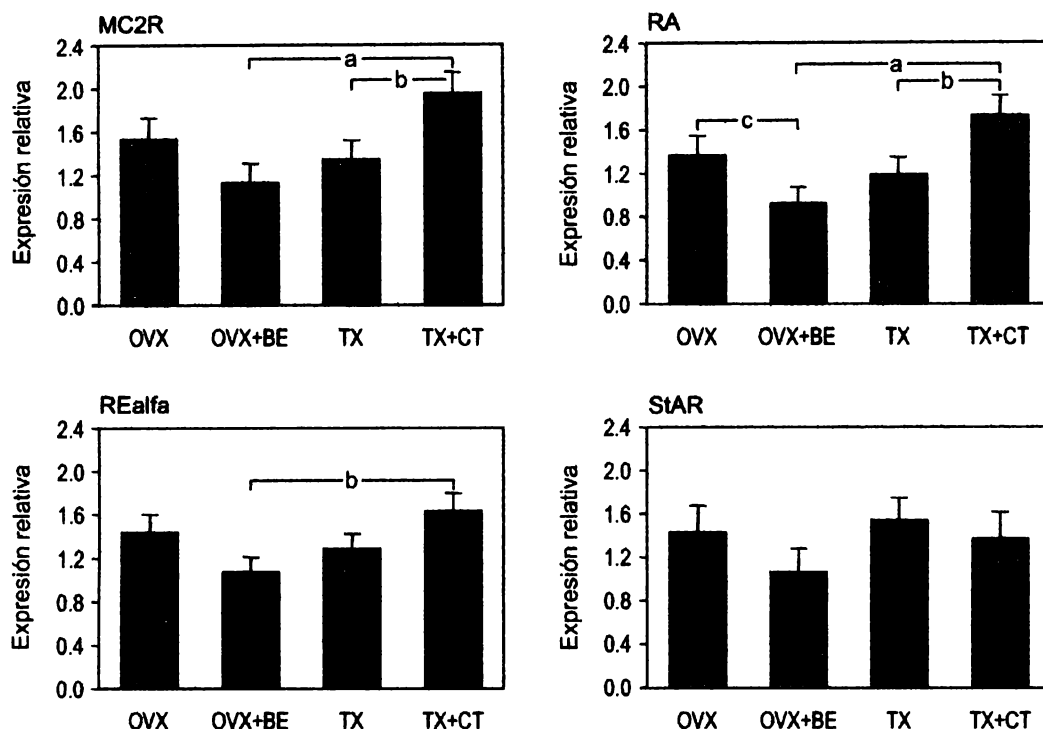


Figura 6: Expresión relativa de los genes MC2R, RA, RE α y StAR en ovinos gonadectomizados con o sin reemplazo de esteroides sexuales (OVX = ovejas ovariectomizadas; OVX+BE = ovejas ovariectomizadas con BE; TX = carneros castrados; TX+CT = carneros castrados con CT). Las barras con letras son diferentes (a = P<0.01; b = P<0.05), o tienden a ser diferentes (c = P<0.09).

Entre los transcritos de MC2R, RA y RE α hubo correlación alta, positiva y significativa (Cuadro 7). El transcrito de StAR también se correlacionó con los transcritos de los receptores, aunque en menor medida. En los machos, la testosterona se correlacionó alta y positivamente con la abundancia relativa de los transcritos de MC2R y RA, mientras que en las hembras el estradiol sólo se correlacionó alta y negativamente con el transcrito de RA.

Cuadro 7: Correlaciones entre los transcritos estudiados entre sí y con las concentraciones de testosterona (encarneros) y 17 β -estradiol (en ovejas).

Correlación ¹	R	Valor P	Correlación ²	r	Valor p
MC2R – RA	0.947	<0.0001	Testosterona – MC2R ³	0.750	0.0522
			Testosterona – RA ³	0.747	0.0538
RE α – MC2R	0.795	0.0007	Testosterona – RE α ³	0.641	0.1208
RE α – RA	0.791	0.0008	Testosterona – StAR ³	-0.037	0.9367
			Estradiol – RA ⁴	-0.780	0.0384
StAR – RE α	0.596	0.0244	Estradiol – MC2R ⁴	-0.542	0.2090
StAR – RA	0.579	0.0302	Estradiol – StAR ⁴	-0.644	0.1185
StAR – MC2R	0.523	0.0548	Estradiol – RE α ⁴	-0.502	0.2505

¹Entre transcritos de genes. ²Entre niveles de hormonas y transcritos de genes. ³Solo carneros. ⁴Solo ovejas.

9. DISCUSIÓN

Los reemplazos hormonales incrementaron los niveles hormonales en ambos sexos. El tratamiento con BE resultó en concentraciones farmacológicas de estradiol en las ovejas ovariectomizadas, aunque los niveles fueron inferiores a los obtenidos por Carbone y de Larrobla (2005), dado que la dosis de BE en este experimento fue ajustado debido a los resultados obtenidos por esos autores. El tratamiento con CT resultó en incrementos fisiológicos en las concentraciones de testosterona en los carneros orquiectomizados. Sin embargo, las concentraciones de testosterona luego del tratamiento im con CT fueron constantes en sangre, mientras que la forma natural de su secreción es pulsátil.

El peso absoluto de las glándulas adrenales no presentó diferencias sexuales y confirma lo observado por Van Lier y col. (2003c). Sin embargo, cuando se relaciona el peso de las adrenales con el peso vivo del animal, las hembras tiene mayor masa adrenal por unidad de peso vivo que los machos. La gonadectomía no parece afectar el peso adrenal absoluto y relativo (Canny y col., 1999; y Van Lier y col., 2003c), lo que se confirmaría en nuestro trabajo dado que la administración de BE o CT no los modificó. Por lo tanto, las diferencias sexuales en el peso absoluto de las glándulas adrenales no parecería estar influenciado de los esteroides gonadales.

Los primers utilizados para el RT-PCR en tiempo real fueron efectivos en lograr la transcripción del ARN mensajero de los genes estudiados. La proteína StAR tuvo mayor abundancia del transcripto (menor ciclo umbral) lo cual era de esperar dado que esta proteína se expresa específicamente en tejidos esteroideogénicos. La proteína StAR interviene en el transporte del colesterol a la membrana interna de la mitocondria, donde sufre la primera reacción enzimática de la esteroideogénesis. Este paso ha sido marcado como paso limitante en la esteroideogénesis (Stocco y Clark, 1996). Dado que la corteza de la glándula adrenal es el tejido blanco de la ACTH por excelencia, fue de esperar que el transcripto de MC2R (receptor de ACTH) también fuera más abundante que los transcriptos de RE α y RA. No obstante su menor abundancia relativa, en comparación con los transcriptos de StAR y MC2R, este estudio confirma hallazgos anteriores sobre la expresión de RE α en la glándula adrenal de ovinos (Van Lier y col., 2003c), y agrega además la presencia de RA con un primer desarrollado en nuestro laboratorio a partir de una secuencia de ARNm de RA ovino del GeneBank. La presencia de RA ha sido descrito en la glándula adrenal de rata (Calandra y col., 1980) y de mono (Hirst y col., 1992), pero no hemos encontrado reportes en ovinos.

En términos generales, los animales gonadectomizados (GDX) no presentaron diferencias en la expresión de MC2R, RE α , RA y StAR. Hay varios reportes que mencionan que la gonadectomización elimina las diferencias sexuales en secreción de cortisol en roedores (Perry y Stalvey, 1992; El Migdadi y col., 1995; Nowak y col., 1995). En ovinos esto no parece ser constante, ya que hay estudios que no encuentran diferencias en la secreción de cortisol entre ovinos enteros y GDX (Canny y col., 1999; Tilbrook y col., 1999; Turner y col., 2002; Van Lier y col., 2003b), mientras en otros estudios mostraron diferencias en secreción de cortisol entre ovejas y carneros GDX (Broadbear y col., 2005; Carbone y de Larrobla, 2005). A pesar de estos resultados contradictorios, la administración de esteroides sexuales

en nuestro experimento, logró diferenciar la abundancia relativa de los transcriptos de MC2R, RE α y AR; mientras los animales GDX (grupos OVX y TX) no presentaron diferencias. Estos resultados sugieren que existen diferencias sexuales en la regulación de la corteza adrenal que serían debidas en parte a la presencia de los esteroides sexuales y apoya los resultados obtenidos por Van Lier y col. (2003c).

La hipótesis con la que trabajamos fue que las diferencias sexuales en la secreción de cortisol en el ovino son parcialmente debidas a los efectos de los esteroides sexuales sobre la regulación de la corteza adrenal. En este sentido la literatura indica un rol de estimulación para el estradiol y uno de inhibición para la testosterona en diferentes especies (Kitay, 1961; Viau y Meaney, 1991; Burgués y Handa, 1992; Xiao y col., 1994, Uhart y col., 2006). Por lo tanto esperábamos una mayor expresión de los transcriptos estudiados en las ovejas tratadas con BE. Sin embargo, el BE tendió a disminuir la expresión del transcripto de RA en ovejas, mientras que el CT incrementó los transcriptos de RA y MC2R en los carneros. Van Lier y col. (2003c) no encontraron diferencias en el transcripto de RE α (medido por hibridación en solución) en la adrenal de ovinos enteros y GDX, mientras habían encontrado diferencias en la concentración de RE (medido por ensayo de unión) entre machos y hembras, y entre animales enteros y GDX. En ese estudio las ovejas GDX tuvieron mayores concentraciones de RE que las ovejas enteras (en fase folicular y luteal). No está claro por qué en el mencionado estudio no se observaron diferencias en ARNm de RE α , y en el presente estudio sí las encontramos entre ovejas OVX+BE y carneros TX+CT. Una posibilidad podría ser una mayor sensibilidad de la técnica de RT-PCR comparada con la hibridación en solución.

Nuestros resultados en combinación con lo observado por Van Lier y col. (2003c) hacen pensar que el aumento de secreción de cortisol inducido por ACTH exógena que se observó luego de la administración de BE (Carbone y de Larrobla, 2005) estaría dado por una desinhibición (más que por una estimulación), mientras que el CT actuaría reforzando una inhibición. En este proceso de inhibición o desinhibición parecería que la proteína StAR no estaría participando. Como ya fue mencionado arriba, el rol de la proteína StAR es clave para un aumento rápido de la síntesis de los esteroides, y la falta de diferencias en la abundancia relativa de este transcripto entre los grupos estudiados estaría indicando que las diferencias sexuales observadas en la secreción de cortisol no serían debidos a la disponibilidad de colesterol para su síntesis.

Por otro lado, las diferencias sexuales encontradas en la secreción de cortisol (Van Lier y col., 2003b; Carbone y de Larrobla, 2005) no podrían ser explicados por una diferente sensibilidad a ACTH, dado que los machos con CT en este estudio presentaron una mayor expresión de MC2R que las hembras con BE. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que no se puede equiparar la expresión de la proteína de un receptor con la concentración del mismo en el tejido, por lo que no se podría aún descartar la explicación de las diferencias observadas en la secreción de cortisol por diferencias en la sensibilidad a ACTH (Van Lier y col., 2003b; Carbone y de Larrobla, 2005).

A su vez, la alta y mediana correlación positiva de la expresión de los transcriptos entre sí también sugiere un rol importante de los esteroides sexuales en la regulación de la adrenal. El CT tuvo una correlación positiva y alta con AR y

MC2R; y el BE tuvo una correlación negativa y alta con RA. Este contraste entre una correlación positiva de CT con RA y una negativa de BE con RA refuerza el concepto de regulación de la corteza adrenal en sentido opuesto por testosterona y estradiol.

10. CONCLUSIONES

1. Los tratamientos con esteroides sexuales de reemplazo fueron efectivos en aumentar las concentraciones de estradiol y testosterona. Sin embargo, la dosis de BE fue farmacológica y en futuros estudios debería ser reducida.
2. El peso relativo de las glándulas adrenales es mayor en ovejas GDX que en carneros GDX, y no parecería estar influenciada por los esteroides sexuales.
3. Los transcritos más abundantes en la glándula adrenal correspondieron a la proteína StAR y el receptor de ACTH, que son proteínas específicas del tejido adrenal.
4. Se confirmó la expresión del receptor de estrógenos α en la glándula adrenal ovina, y posiblemente este sea el primer reporte de la expresión del receptor de andrógenos en la adrenal ovina.
5. El estradiol y la testosterona modificaron la expresión de proteínas receptoras en la glándula adrenal de ovinos, sugiriendo la posibilidad de un rol regulativo en la secreción de cortisol.
 - Si bien no está claro aún cómo operan los esteroides sexuales en la regulación de la secreción de cortisol, la expresión de la proteína StAR no parecería ser el punto de regulación.
 - El punto de regulación tampoco parecería ser la concentración del receptor de ACTH, aun que se deberían hacer estudios de medición directa de esta proteína para poder descartarlo definitivamente como punto de regulación.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Ariyoshi, N, Kim, Y, Artemenko, I, Bhattacharyya, K, Jefcoate, C. (1998). Characterization of the Rat *Star* Gene That Encodes the Predominant 3.5-Kilobase Pair mRNA. ACTH Stimulation of adrenal steroids in vivo precedes elevation of STAR mRNA and protein. *The Journal of Biological Chemistry*; 273:7610-7619.
2. Broadbear, J, Hutton, L, Clarke, I, Canny, B. (2004a). Sex differences in the pituitary-adrenal response following acute antidepressant treatment in sheep. *Psychopharmacology*; 171:450-457
3. Broadbear, J, Nguyen, T, Clarke, I, Canny, B. (2004b). Antidepressants, sex steroids and pituitary-adrenal response in sheep. *Psychopharmacology*; 175:247-255.
4. Broadbear, J.H, Pierce, B.N, Clarke, I.J, Canny, B.J. (2005). Role of sex and sex steroids in mediating pituitary-adrenal responses to acute buspirone treatment in sheep. *Journal Neuroendocrinology*; 17:804-810.
5. Broers, P, ed. (1996). *Compendium de Reproducción Animal*. 2° ed. España. Intervet. 257 p.
6. Burgess, L.H, Handa, R.J. (1992). Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology*; 131:1261-1269.
7. Calandra, R.S, Lüthy, I, Finocchiaro, L, Cheb Terrab, R. (1980). Influence of sex and gonadectomy on sex steroid receptors in rat adrenal gland. *Journal of Steroid Biochemistry*; 13: 1331-1335.
8. Cannon, W. (1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews*; 9:399-431.
9. Canny, B, O'farrell, K, Clarke, I, Tilbrook, A. (1999). The influence of sex and gonadectomy on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis of the sheep. *Journal of Endocrinology*; 162:215-225.
10. Carbone, A, De Larrobla, A. (2005). *Modulación de la secreción de cortisol por los esteroides sexuales en ovinos*. Tesis de Grado. Montevideo. UdelaR Facultad de Agronomía. 77 p.
11. Chen, Y, Green, J.A, Antoniou, E, Ealy, A.D, Mathialagan, N, Walker, A.M, Avalle, M.P, Rosenfeld, C.S, Hearne, L.B, Roberts, R.M. (2006). Effect of interferon-tau administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. *Endocrinology*; 147:2127-2137.
12. Cherradi, A, Capponi, A, Gaillard, R, Pralong, F. (2001). Decreased Expression of Steroidogenic Acute Regulatory Protein: A Novel Mechanism Participating in

the Leptin-Induced Inhibition of Glucocorticoid Biosynthesis. *Endocrinology*; 142:3302-3308.

13. Conley, A, Bird, I. (1997). The Role of Cytochrome P450 17 α -Hydroxylase and 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Integration of Gonadal and Adrenal Steroidogenesis via the Δ 5 and Δ 4 Pathways of Steroidogenesis in Mammals. *Biology of Reproduction*; 56:789-799.
14. Cutler, G.B, Barnes, K.M, Sauer, M.A, Loriaux, D.L. (1978). Estrogen receptor in rat adrenal gland. *Endocrinology*; 102:252-257.
15. Dantzer, R, Mormède, P. (1983). Stress in Farm Animals: A Need for Reevaluation. *Journal of Animal Science*; 57:6-18
16. Dawood, T, Williams, M, Fullerton, M, Myles, K, Schuijers, J, Funder, J, Sudhir, K, Komesaroff, P. (2005). Glucocorticoid responses to stress in castrate and testosterone-replaced rams. *Regulatory Peptides*; 125:47-53.
17. Del Campo, M. (2006). ¿Bienestar Animal un Tema de Moda? *Revista INIA*; 9:7-12.
18. Dieudonné, M, Sammari, A, Dos Santos, E, Leneveu, M, Giudicelli, Y, Pecquery, R. (2006). Sex steroids and leptin regulate 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase I and P450 aromatase expressions in human preadipocytes: Sex specificities. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*; 99:189-196.
19. Dobson, H, Smith, R. (1998). Stress and Subfertility. *Reproduction in Domestic Animals*; 33:107-111.
20. Ehrhart-Bornstein, M, Hinson, J, Bornstein, S, Scherbaum, W, Vinso, G. (1998). Intraadrenal Interactions in the Regulation of Adrenocortical Steroidogenesis. *Endocrine Reviews*; 19:101-143.
21. El-Migdadi, F, Gallant, S, Brownie, A.C. (1995). Sex differences in cytochromes oxidase and P-45011 β in the rat adrenal cortex. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 112:185-194.
22. Engelbrecht, Y, Swart, P. (2000). Adrenal function in Angora goats: A comparative study of adrenal steroidogenesis in Angora goats and Merino sheep. *Journal of Animal Science*; 78:1036-1046.
23. Finken, M, Andrews, R, Andrew, R, Walter, R. (1999). Cortisol Metabolism in Healthy Young Adults: Sexual Dimorphism in Activities of A-Ring Reductases, but not 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*; 84:3316-21
24. Garcia Sacristan, A. (1998). *Fisiología veterinaria*. 2ª. ed. Madrid, McGraw-Hill, Interamericana, 1074 p.

25. Handa, R.J, Burgess, L.H, Kerr, J.E, O'keefe, J.A. (1994). Gonadal steroid hormona receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Hormones and Behavior*; 28:464-476.
26. Hirst, J.J, West, N.B, Brenner, R.M, Novy, M.J. (1992). Steroid hormone receptors in the adrenal glands of fetal and adult Rhesus Monkeys. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 75:308-314.
27. Jaquiery, A.L, Oliver, M.H, Bloomfield, F.H, Connor, K.L, Challis, J.R.G, Harding, J.E. (2006). Fetal exposure to excess glucocorticoid is unlikely to explain the effects of periconceptual undernutrition in sheep. *Journal of Physiologic*; 572:109-118.
28. Kitay, J.I. (1961). Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. *Endocrinology*; 68:818-824.
29. Korte, S, Olivier, B, Koolhaas, J. (2007). A new animal welfare concept based on allostasis. *Physiology and Behavior*; 08070: 1-7.
30. Livak, K.J, Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*; 25:402-408.
31. Matteri, R.L, Carroll, J.A, Dyer, C.J. (2000). Neuroendocrine Responses to Stress. En: Moberg, G. and Mench, J (ed). *The biology of Animals Stress; Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. Nueva York. CABI Publishing, p 43-76.
32. McDonald, L. (1991). *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. 4^a ed. México, McGraw-Hill, Interamericana, 551 p.
33. McCormick, C, Furey, B, Chil, M, Donohue, S. (1998). Neonatal sex hormones have 'organizational' effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of male rats. *Developmental Brain Research*; 105:295-307.
34. Meikle, A, Tasende, C, Rodríguez, M, Garófalo, E. (1997). Effects of estradiol and progesterona on the reproductive tract ando on uterine sex esteroid receptors in female lambs. *Theriogenology*; 48:1105-1113.
35. Myers, D.A, Hyatt, K, Mlynarczyk, M, Bird, I.M, Ducsay, C.A. (2005). Long-term hypoxia represses the expression of key genes regulating cortisol biosynthesis in the near-term ovine fetus. *American Journal of Physiology, Regulatory Integrative Comparative Physiology*; 289:1707-1714.
36. Ministerio de Ganaderia Agricultura y Pesca. DICOSE. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DICOSE/Informe2008/DJ2008_Total.pdf Fecha de consulta: 28 de septiembre de 2009.
37. Minton, J. (1994). Function of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and the Sympathetic Nervous System in Models of Acute Stress in Domestic Farm Animals. *Journal of Animal Science*. 72:1891-1898.

38. Moberg, G. (2000). Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare. En: Moberg, G. and Mench, J (ed). The biology of Animals Stress; Basic Principles and Implications for Animal Welfare. Nueva York. CABI Publishing, p 1-21.
39. Munk, A, Guyre, P.M, Holbrook, N.J. (1984). Physiological functions of glucocorticoides in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine reviews* 5:25-44.
40. Naderi, A, Ahmed, A.A, Barbosa-Morais, N.L, Aparicio, S, Brenton, J.D, Caldas, C. (2004). Expression microarray reproducibility is improved by optimising purification steps in RNA amplification and labelling. *BMC Genomics*; 5:9.
41. Nowak, K, Neri, G, Nussdorfer, G, Malendowicz, L. (1995). Effects of sex hormones on the steroidogenic activity of dispersed adrenocortical cells of the rat adrenal cortex. *Life Sciences*; 57:833-837.
42. Ogilvie, K, Rivier, C. (1997). Gender difference in hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to alcohol in the rat: activational role of gonadal steroids. *Brain Research*; 766:19-28.
43. Pacák, K, Palkovits, M. (2001). Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for stress-Related Disorders. *Endocrine Reviews*; 22:502-548.
44. Patchev, V.K, Almeida, O.F.X. (1998). Gender specificity in the neural regulation of the response to stress. New leads from classical paradigms. *Molecular Neurobiology*; 16:63-77.
45. Pattison, C, Saltzman, W, Abbott, D, Hogan, B, Nguyen, A, Husen, B, Einspanier, A, Conley, A, Bird, I. (2007). Gender and gonadal status differences in zona reticularis expression in marmoset monkey adrenals: Cytochrome b5 localization with respect to cytochrome P450 17,20-lyase activity. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 265-266:93-101.
46. Pérez, R, López, A, Castrillejo, A, Bielli, A, Laborde, D, Gastel, T, Tagle, R, Queirolo, D, Franco, J, Forsberg, M, Rodríguez-Martínez, H. (1997). Reproductive seasonality of Corriedale rams under extensive rearing conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*; 38:109-117.
47. Perry, J.E, Stalvey, J.R.D. (1992). Gonadal steroids modulate adrenal fasciculata 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase activity in mice. *Biology of Reproduction*; 46:73-82.
48. Rivalland, E, Clarke, I, Turner, A, Pompolo, S, Tilbrook, A. (2007). Isolation and restraint stress results in differential activation of corticotrophin-releasing hormone and arginine vasopressin neurons in sheep. *Neuroscience*; 145:1048-58.

49. Rivier, C, Rivest, S. (1991). Effect of stress on the Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis: Peripheral and central Mechanisms. *Biology of Reproduction*; 45:523-532.
50. Sapolsky, R, Romero, M, Munck, A. (2000). How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocrine Reviews*; 21:55-89.
51. Schams, D, Kohlenberg, S, Amselgruber, W, Berisha, B, Pfaffl, M.W, Sinowatz, F. (2003). Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *Journal of Endocrinology*; 177:305-317.
52. Senger, P.L. (2004). Regulation of reproduction: Nerves, hormones and target tissues. En: Senger, P.L. *Pathways to pregnancy*. Current Conceptions, Inc., Pullman, Washington, USA; 78-99.
53. Smith, R, Dobson, H. (2002). Hormonal interactions within the hypothalamus and pituitary with respect to stress and reproduction in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*; 23:75-85.
54. Stocco, D, Clark, B. (1996). Regulation of the Acute Production of Steroids in Steroidogenic Cells. *Endocrine Reviews*; 17:221-244.
55. Stocco, D. (2000). The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *Journal of Endocrinology*; 164:24.
56. Stocco, D. (2001). StAR Protein and the Regulation of Steroid Hormone Biosynthesis. *Physiology*. 63: 193-213.
57. Tilbrook, A, Canny, S, Serapiglia, M, Amobres, T, Clarke, I. (1999). Suppression of the secretion of luteinizing hormone due to isolation/restraint stress in gonadectomized rams and ewes is influenced by sex steroids. *Journal of Endocrinology*; 160:461-481.
58. Tilbrook, A, Turner, A, Clarke, I. (2000). Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Reviews of Reproduction*; 5:105-113.
59. Tilbrook, A, Turner, A, Clarke, I. (2002). Stress and Reproduction: Central Mechanisms and Sex Differences in Non-rodent Species. *Stress*; 5:83-100.
60. Tilbrook, A, Clarke, I. (2006). Neuroendocrine mechanisms of innate states of attenuated responsiveness of the hypothalamo-pituitary adrenal axis to stress. *Frontiers in Neuroendocrinology*; 27:285-307.
61. Turner, A, Canny, B, Hobbs, R, Bond, J, Clarke, I. (2002). Influence of sex and gonadal status of sheep on cortisol secretion in response to ACTH and on cortisol and LH secretion in response to stress: importance of different stressors. *Journal of Endocrinology*; 173:113-122.

62. Uhart, M, Chong, R, Oswald, L, Lin, P, Wand, G. (2006). Gender differences in hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis reactivity. *Psychoneuroendocrinology*; 31:642-652.
63. Ungerfeld, R. (2001). *Fisiología de la reproducción*. Montevideo, Facultad de Veterinaria, UdelaR [126] p.
64. Van Lier, E. (1998). Some aspects on the effect of stress on sheep reproduction. Licentiate Thesis. Department of Clinical Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. Report N° 14, 37 p.
65. Van Lier, E. (2003a). Sex Differences in response to adrenocorticopin (ACTH) administratation in sheep. Doctoral Thesis. Department of Clinical Chemistry Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. Report N° 157, 49 p.
66. Van Lier, E, Meikle, A, Akerberg, S, Forsberg, M, Sahlin, L. (2003c). Sex differences in oestrogen receptor levels in adrenal glands of sheep during the breeding season. *Domestic Animal Endocrinology*; 25:373-387.
67. Van Lier, E, Pérez, R, Forsberg, M. (2003b). Sex differences in cortisol secretion alter administration of an ACTH analogue in sheep during the breeding and non-breeding season. *Animal Reproduction Science*; 79:81-92.
68. Viau, V, Meaney, M.J. (1991). Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycles in the rat. *Endocrinology*; 129:2503-2511.
69. Xiao, E, Xia, L, Shanen, D, Khabele, D, Ferin, M. (1994). Stimulatory effects of interleukin-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis on gonadotropin secretion in ovariectomized monkeys replaced with estradiol. *Endocrinology*; 135:2093-2098.
70. Young, E.A. (1995). The role of gonadal steroids in hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation. *Critical Reviews in Neurobiology*; 9:371-381.
71. Yukhananov, R, Handa, R. (1997). Estrogen alters proenkephalin RNAs in the paraventricular nucleus of the hypothalamus following stress. *Brain Research*; 764: 109-116.