

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**MODULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE CORTISOL POR LOS
ESTEROIDES SEXUALES EN OVINOS**

Por

Alejandra **CARBONE AGAZZI**
Angélica **de LARROBLA FERNÁNDEZ**

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniera Agrónoma.

MONTEVIDEO
URUGUAY

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por:

Director: -----

Nombre completo y firma

Nombre completo y firma

Nombre completo y firma

Fecha: -----

Autor: -----

Nombre completo y firma

Nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

A nuestras madres y nuestros padres, ellos son los primeros merecedores de este logro.

A nuestras hermanas, imprescindibles siempre.

A Elize, por todo lo que hizo por nosotras más allá de sus obligaciones como directora de esta tesis. Por todo lo que aprendimos de ella más allá de esta tesis.

A Dana, Daniel, Carlos, Alejandro y Carolina, por su invaluable colaboración en el trabajo de campo.

A Ana Meikle, porque gracias a su trabajo en el laboratorio tuvimos los resultados de la tesis.

A Maxi Gimeno, gracias a él hicimos este trabajo.

A los amigos y compañeros con los que transitamos el precioso camino de esta carrera; los mejores momentos están vinculados a ellos y perdurarán por siempre en nuestra memoria.

A Santiago Ferrando, las palabras no alcanzan.

A Ximena Salvo que es una amiga incondicional, apoyando en momentos difíciles y acompañando los buenos.

A Ramiro Suárez, que supo ser mi compañero de vida en esos primeros años de facultad. Aprendimos juntos a querer aún más la agronomía. También le agradezco a su familia que siempre nos acompañó.

A Lorena Graña, amiga del alma, aún a la distancia está siempre.

A Martín Rebour, amigo del alma, gracias por el afecto y apoyo; gracias por acompañar hasta el final este proceso junto a mí.

A la AeA por todo el apoyo que recibimos de ella, por todo lo lindo que vivimos ahí y porque la facultad se vive y se siente diferente desde aquella casita.

Fueron muchos los docentes que dejaron más que enseñanzas curriculares y no poder mencionarlos a todos no le quita valor al aporte que realizaron a nuestras vidas.

Por último queremos agradecer a nuestra facultad por lo bueno y lo malo, de todo ello aprendimos.

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

CUADROS

- Cuadro 1. Concentraciones promedio (\pm EEM) de estradiol (pmol/L) en ovejas gonadectomizadas antes y después del reemplazo con benzoato de estradiol.....46
- Cuadro 2. Concentraciones promedio (\pm EEM) de cortisol (nmol/L) pre y post – ACTH en animales según sexo y tratamiento.....47

FIGURAS

- Figura 1. Modelo de la respuesta biológica de los animales frente al estrés. Adaptado de Moberg G. (2000).....5
- Figura 2. Respuesta al estrés sin costo biológico. Adaptado de Moberg G. (2000).....6
- Figura 3. Estrés con costo biológico. Adaptado de Moberg G. (2000).....7
- Figura 4. Molécula de Colesterol. Adaptado de Van Lier E. (1998).....16
- Figura 5. Esquema de la esteroidogénesis adrenal en mamíferos superiores (humanos, rumiantes). Ver texto para las abreviaturas de las hormonas y enzimas. Adaptado de Conley A. *et al.* (1997).....18
- Figura 6. Representación esquemática de los efectos de 4 h de estrés por aislamiento y restricción sobre la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH en ovinos gonadectomizados con diferentes combinaciones de esteroides sexuales. Adaptado de Tilbrook A. *et al.*, (1999).....35
- Figura 7. Representación esquemática del procedimiento experimental.....44
- Figura 8. Perfiles promedios (\pm EEM) de cortisol (nmol/L) antes y después de la administración i.v. de un análogo de ACTH en hembras sin (-○-) y con (-●-) reemplazo hormonal. Los * indican los momentos en que las diferencias fueron significativas ($P < 0.05$)... 48
- Figura 9. Perfiles promedios (\pm EEM) de cortisol (nmol/L) antes y después de la administración i.v. de un análogo de ACTH en machos sin (-□-) y con (-■-) reemplazo hormonal... 49

- Figura 10. Perfiles promedios (\pm EEM) de cortisol (nmol/L) antes y después de la administración i.v. de un análogo de ACTH en hembras (-○-) y machos (-□-) sin reemplazo hormonal. Los * indican los momentos en que las diferencias fueron significativas ($P < 0.05$)...50
- Figura 11. Perfiles promedios (\pm EEM) de cortisol (nmol/L) antes y después de la administración i.v. de un análogo de ACTH en hembras (-●-) y machos (-■-) con reemplazo hormonal. Los * indican los momentos en que las diferencias fueron significativas ($P < 0.05$).....51
- Figura 12. Perfiles promedios (\pm EEM) de cortisol (nmol/L) antes y después de la administración i.v. de un análogo de ACTH en hembras sin (-○-) y con (-●-) reemplazo hormonal, y machos sin (-□-) y con reemplazo (-■-) hormonal.....52

TABLA DE CONTENIDOS

Página

<u>PÁGINA DE APROBACIÓN.....</u>	<u>I</u>
<u>AGRADECIMIENTOS.....</u>	<u>II</u>
<u>LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....</u>	<u>III</u>
<u>1 INTRODUCCIÓN.....</u>	<u>1</u>
<u>2 ESTRÉS.....</u>	<u>2</u>
2.1 CONCEPTOS.....	2
2.2 CLASIFICACIÓN DE ESTRESORES.....	8
2.3 ESTRÉS Y PRODUCCIÓN ANIMAL.....	9
<u>2.3.1 Interacción animal-animal.....</u>	<u>9</u>
<u>2.3.2 Interacción hombre-animal.....</u>	<u>10</u>
<u>2.3.3 Interacción animal-ambiente.....</u>	<u>12</u>
<u>3 HORMONAS.....</u>	<u>12</u>
3.1 DEFINICIÓN.....	12
3.2 CLASES QUÍMICAS.....	12
3.3 MODO DE ACCIÓN.....	13
3.4 REGULACIÓN DE SÍNTESIS Y SECRECIÓN.....	14
<u>4 ESTEROIDES.....</u>	<u>16</u>
4.1 ESTEROIDOGENESIS.....	16
<u>4.1.1 Regulación de la esteroidogénesis en adrenal.....</u>	<u>18</u>
4.2 PROGESTERONA.....	19
<u>4.2.1 Lugar de síntesis.....</u>	<u>19</u>
<u>4.2.2 Efectos.....</u>	<u>19</u>
4.3 TESTOSTERONA.....	20
<u>4.3.1 Lugar de síntesis.....</u>	<u>20</u>
<u>4.3.2 Efectos.....</u>	<u>20</u>
4.4 ESTRADIOL.....	20
<u>4.4.1 Lugar de síntesis.....</u>	<u>20</u>
<u>4.4.2 Efectos.....</u>	<u>20</u>
4.5 CORTISOL.....	21
<u>4.5.1 Lugar de síntesis.....</u>	<u>21</u>
<u>4.5.2 Efectos.....</u>	<u>21</u>
<u>5 EL EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIA-ADRENAL (HPA).....</u>	<u>22</u>
5.1 LA GLÁNDULA ADRENAL.....	22
5.2 GLÁNDULA PITUITARIA O HIPÓFISIS.....	23
<u>5.2.1 Hormona adrenocorticotropina.....</u>	<u>23</u>
5.3 HIPOTÁLAMO.....	24
5.4 ACTIVACION DEL EJE HPA.....	24

<u>6</u>	<u>EJE HIPOTALAMO-PITUITARIA-GONADAL.....</u>	<u>25</u>
6.1	REGULACION DEL EJE HPG EN HEMBRAS.....	25
6.2	REGULACION DEL EJE HPG EN MACHOS.....	27
<u>7</u>	<u>ESTRÉS Y REPRODUCCIÓN.....</u>	<u>27</u>
7.1	EFFECTOS EN HIPOTÁLAMO.....	28
7.2	EFFECTOS EN HIPÓFISIS.....	29
7.2.1	<u>Opioides.....</u>	<u>29</u>
7.2.2	<u>ACTH.....</u>	<u>29</u>
7.2.3	<u>Cortisol.....</u>	<u>31</u>
7.3	EFFECTOS EN GÓNADAS.....	32
7.4	EFFECTOS DIFERENTES EN CARNEROS Y OVEJAS.....	33
<u>8</u>	<u>DIFERENCIAS SEXUALES EN RESPUESTA AL ESTRÉS.....</u>	<u>36</u>
8.1	EFFECTO DEL EJE GONADAL EN EL EJE ADRENAL EN ROEDORES.....	37
8.1.1	<u>Estradiol.....</u>	<u>38</u>
8.1.2	<u>Testosterona.....</u>	<u>38</u>
8.2	EFFECTO DEL EJE GONADAL EN EL EJE ADRENAL EN OVINOS.....	39
<u>9</u>	<u>MATERIALES Y MÉTODOS.....</u>	<u>43</u>
9.1	CONDICIONES DE TRABAJO.....	43
9.2	ANIMALES.....	43
9.3	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	43
9.4	ANALISIS HORMONALES.....	44
9.5	ESTADÍSTICA.....	45
<u>10</u>	<u>RESULTADOS.....</u>	<u>46</u>
10.1	ESTRADIOL.....	46
10.2	TESTOSTERONA.....	46
10.3	CORTISOL.....	46
<u>11</u>	<u>DISCUSIÓN.....</u>	<u>53</u>
<u>12</u>	<u>CONCLUSIONES.....</u>	<u>56</u>
<u>13</u>	<u>RESUMEN.....</u>	<u>57</u>
<u>14</u>	<u>BIBLIOGRAFIA.....</u>	<u>58</u>
<u>15</u>	<u>apéndices.....</u>	<u>67</u>

1 INTRODUCCIÓN

En nuestro país, recientemente ha cobrado importancia la temática referida al bienestar de los animales. Aunque el sector ovino atraviesa por una compleja coyuntura, existen importantes estímulos para el crecimiento y desarrollo de la producción, plasmadas de hecho a través de algunas políticas diferenciales para el sector. En este sentido, mantiene vigencia comprender los fenómenos que afectan el desempeño animal en pos de atender estas dos visiones, la del bienestar animal y la de la productividad del rubro.

El estrés afecta diferentes sistemas y funciones del organismo animal a partir de situaciones que involucran el manejo en los sistemas de producción y que redundan en baja tasa de procreo, señalada, deficiente producción de lana y problemas de calidad en los cortes valiosos de carne, entre los aspectos más destacables.

Cómo el estrés afecta la reproducción reviste gran importancia en un rubro que ha venido perdiendo stock desde hace varios años, ya que es clave para el aumento de la producción de commodities que el país vende.

De investigaciones previas, se sabe que los ovinos responden al estrés en forma diferencial de acuerdo al sexo y a los niveles de esteroides sexuales en sangre. Las hembras responden con una mayor secreción de cortisol (una hormona relacionada al estrés) que los machos, lo que es sabido afecta la función reproductiva a distintos niveles (tasa ovulatoria, manifestación de estro, retención de la preñez, etc). Aún no se ha podido concluir con certeza dónde se ubican estas diferencias sexuales en la respuesta al estrés, pero varias investigaciones indican que los esteroides sexuales juegan un rol clave.

El objetivo general de este trabajo es contribuir al conocimiento de la temática de estrés, un indicador del bienestar animal.

El objetivo específico es evaluar el efecto del estradiol y testosterona sobre la producción de cortisol por la corteza adrenal, en hembras y machos gonadectomizados de adultos.

2 ESTRÉS

2.1 CONCEPTOS

Algunas situaciones que causan a los animales experiencias de miedo, ansiedad, o frustración, pueden causar fallas en la reproducción o en el desarrollo, así como afectar la salud animal directamente y su productividad tanto directa como indirectamente. Los modelos diseñados para sistemas contemporáneos de producción animal han comenzado a poner énfasis en cómo discriminar dos objetivos esenciales que se interrelacionan: la óptima productividad animal y el óptimo bienestar animal (Stanley E., 1991; Moberg G., 1985 citados por Moberg G., 2000).

Un indicador potencial del bienestar animal es la presencia o ausencia de estrés. Debido a que el animal desarrolla sofisticados mecanismos comportamentales y fisiológicos para enfrentar una situación de estrés, éste pone en peligro el bienestar animal sólo si resulta en algún costo biológico significativo (Mench J., 2000).

Los términos ‘estrés’ y ‘síndrome de estrés’ fueron por primera vez adoptados hace 60 años atrás por Hans Selye quien, en un artículo de *Nature*, describió una serie de cambios patofisiológicos los cuales se desarrollan en la rata luego de exponerse a diversos estímulos tales como físicos (frío, cirugía), químicos (formaldehído, morfina, adrenalina) o emocionales. Selye (1946, citado por Van Lier E., 1998) también mencionaba que estas respuestas comprenden una fase inicial llamada ‘reacción general de alarma’, la cual ocurre independientemente de la naturaleza de los estímulos y que está caracterizada por el agrandamiento de la glándula adrenal. La reacción de alarma es seguida por un período de resistencia, el ‘síndrome de adaptación general’, durante el cual las adrenales retornan a su estado normal, siempre que el estímulo sea retirado o su intensidad sea 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 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”.

Se puede definir estrés como la ruptura de la ‘homeostasis’ (Rivier C. *et al.* 1991). El término homeostasis fue introducido por primera vez por Cannon W. (1929 a, 1929 b, 1939, citado por Pacák K. *et al.*, 2001) para describir los “procesos fisiológicos coordinados que mantienen el medio interno del organismo estable”. Los estímulos que desafían la homeostasis son comúnmente llamados estresores (Tilbrook A. *et al.*, 2000). Weiner H. (1991, citado por Pacák K. *et al.*, 2001) describió los estresores como presiones selectivas del ambiente físico y social que amenazan o cambian un organismo, y que generan patrones específicos de respuesta compensatoria.

Otra definición de estrés fue aportada por Chrousos G. *et al.* (1992, citado por Pacák K. *et al.*, 2001) quienes lo determinaron como un estado de falta de armonía o de amenaza a la homeostasis, que genera respuestas fisiológicas y comportamentales adaptativas. Estas respuestas pueden o no ser específicas de acuerdo al estresor, y usualmente ocurren de forma

estereotipada, produciendo un síndrome de estrés ‘no-específico’ cuando la amenaza a la homeostasis excede un umbral. Ellos incluyeron polimorfismos genéticos, alteraciones en la expresión de genes y factores ambientales como determinantes importantes de la respuesta individual al estrés. En este sentido, Selye H. (1976, citado por Pacák K. *et al.*, 2001) propuso que la mayoría de los estímulos estresantes inducen dos tipos de respuesta: 1) una respuesta general de estrés, la cual es común a todos los estresores e involucra la liberación de hormona adrenocorticotropina (ACTH) y corticosteroides adrenales, y 2) respuesta individual al estrés mediada por ‘factores condicionantes’ tales como predisposiciones determinadas genéticamente. El primero en plantear la especificidad de las respuestas al estrés fue Cannon W. (1929a, 1929b, 1939, citado por Pacák K. *et al.*, 2001), quien mostró que la estabilización específica o reacción homeostática a la falta de oxígeno es completamente diferente de la que el cuerpo presenta en respuesta a la exposición al frío; ésta, a su vez, es virtualmente opuesta a la requerida para resistir al calor (Selye H., 1974 citado por Pacák K. *et al.*, 2001).

Goldstein D. (1995, citado por Pacák K. *et al.*, 2001) introdujo una nueva definición de estrés. Lo definió como “una condición donde las expectativas, ya sean genéticamente programadas, establecidas por aprendizaje previo, o deducidas de las circunstancias, no concuerdan con las percepciones actuales o anticipadas del ambiente interno o externo. Esta discrepancia entre lo observado o sentido, y lo esperado o programado genera respuestas compensatorias.”

Recientemente Dobson H. *et al.* (2000) han definido ‘estrés’ como la incapacidad del animal de lidiar con su ambiente, un fenómeno que se expresa en el fracaso para alcanzar el potencial genético, por ejemplo, tasa de crecimiento, producción de leche, resistencia a enfermedades o fertilidad.

Aunque el concepto de alostasis fue originalmente propuesto por Sterling P. *et al.* (1981 citado por Pacák K. *et al.*, 2001), el primero en introducir el término dentro de la investigación sobre estrés fue McEwen B. (1998, citado por Pacák K. *et al.*, 2001). La alostasis, puede definirse como la capacidad de mantener la estabilidad del ambiente interno a través de cambio, y se refiere a procesos activos de adaptación mediante la producción de varios mediadores tales como esteroides adrenales, catecolaminas, citoquinas y mediadores de tejidos. Bajo la exposición a una situación estresante crónica, se inician respuestas fisiológicas, induciendo respuestas alostáticas (adaptativas). Estas respuestas involucran a los sistemas mayores de forma similar a los efectos del estrés. Si las respuestas alostáticas son eficientes, ocurre adaptación y el organismo es protegido de daños. En situaciones donde las respuestas alostáticas son prolongadas, inadecuadas, sobreestimuladas por repetidos ‘ataques’ de múltiples estresores, o si ocurre falta de adaptación, la carga alostática resulta en una mala adaptación y daño en varios órganos (McEwen B., 1998; Schulkin J. *et al.*, 1994 citados por Pacák K. *et al.*, 2001). En contraste a los mecanismos homeostáticos, las regulaciones alostáticas son amplias y no dependen de mecanismos puntuales, las señales no son constantes, y la anticipación de una necesidad es un elemento importante. Otro aspecto de esta teoría es que la carga alostática también refleja aspectos del estilo de vida y disturbios de los ritmos diurnos (falta de descanso) que resultan de la sobreexposición de varios tejidos a mediadores de estrés. La teoría alostática continúa la idea de Selye acerca de ‘factores condicionantes’ para explicar diferencias individuales en la respuesta al estrés (Pacák K. *et al.*, 2001).

El estrés también se define como la respuesta biológica generada cuando un individuo percibe una amenaza a su homeostasis, siendo la amenaza el 'estresor'. Cuando la respuesta al estrés amenaza su bienestar, el animal experimenta 'distress'. El término distress ayuda a diferenciar entre una respuesta al estrés no-amenazante (frecuentemente referida como estrés bueno, 'eustress') y un estado biológico donde la respuesta al estrés tiene efectos deletéreos sobre el bienestar de los individuos (o estrés perjudicial) (Moberg G., 2000).

El modelo de estrés animal propuesto por Moberg G. (2000), y descrito en la Figura 1, divide la respuesta al estrés en tres estados generales: el reconocimiento del estresor, la defensa biológica contra el estresor y las consecuencias de la respuesta al estrés. En este último estadio es en el que se puede determinar si un animal sufre distress o solamente experimentó un breve episodio en su vida que puede no tener un impacto significativo en su bienestar.

Una respuesta al estrés comienza con la percepción del sistema nervioso central de una amenaza potencial a la homeostasis. No importa si el estímulo es o no una amenaza real; sólo su percepción es crítica. Debido a esto los estresores psicológicos pueden ser devastadores (McEwen B. *et al.*, 1993, citado por Moberg G., 2000). Una vez que el sistema nervioso central percibe una amenaza, desarrolla una respuesta biológica o defensa que consiste en alguna combinación de las cuatro respuestas biológicas generales de defensa: respuesta comportamental, del sistema nervioso autónomo, neuroendócrina, o inmune (Moberg G., 2000).

En el caso de muchos estresores, la primera respuesta e indudablemente la más económica para el animal es la respuesta comportamental. El animal puede ser exitoso en escapar del estresor simplemente alejándose de la amenaza. Obviamente, las respuestas comportamentales no son apropiadas para todos los estresores, y los animales también pueden encontrarse en situaciones donde sus opciones en comportamiento sean limitadas o frustradas. Incluso en aquellas situaciones donde una respuesta en comportamiento no puede aliviar el estresor, algunos componentes del comportamiento pueden permanecer como parte de la respuesta al estrés en conjunto. En éstas situaciones, el comportamiento puede dar indicios potenciales de distress (Bohus B., *et al.*, 1987; Rushen J., 2000, citados por Moberg G., 2000).

Una segunda línea de defensa del animal durante el estrés es el sistema nervioso autónomo. Durante el estrés, el sistema nervioso autónomo afecta diversos sistemas biológicos, incluyendo el cardiovascular, gastrointestinal, glándulas exócrinas y médula adrenal. Pero debido a que las respuestas autónomas afectan sistemas biológicos muy específicos, y a que sus efectos son de relativa corta duración, puede argumentarse que la activación del sistema nervioso autónomo no tiene un impacto significativo sobre el bienestar animal a largo plazo (Moberg G., 2000).

En contraste a los efectos del sistema nervioso autónomo, las hormonas secretadas desde el sistema neuroendócrino hipotálamo-pituitaria tienen efectos amplios y de larga duración en el cuerpo. Virtualmente todas las funciones biológicas son afectadas por el estrés, incluso la suficiencia inmune, la reproducción, el metabolismo y el comportamiento, son regulados por estas hormonas pituitarias. Se conoce que la secreción de las hormonas pituitarias son afectadas tanto directa como indirectamente durante un estrés (Matteri R. *et al.*, 2000 citado por Moberg G., 2000).

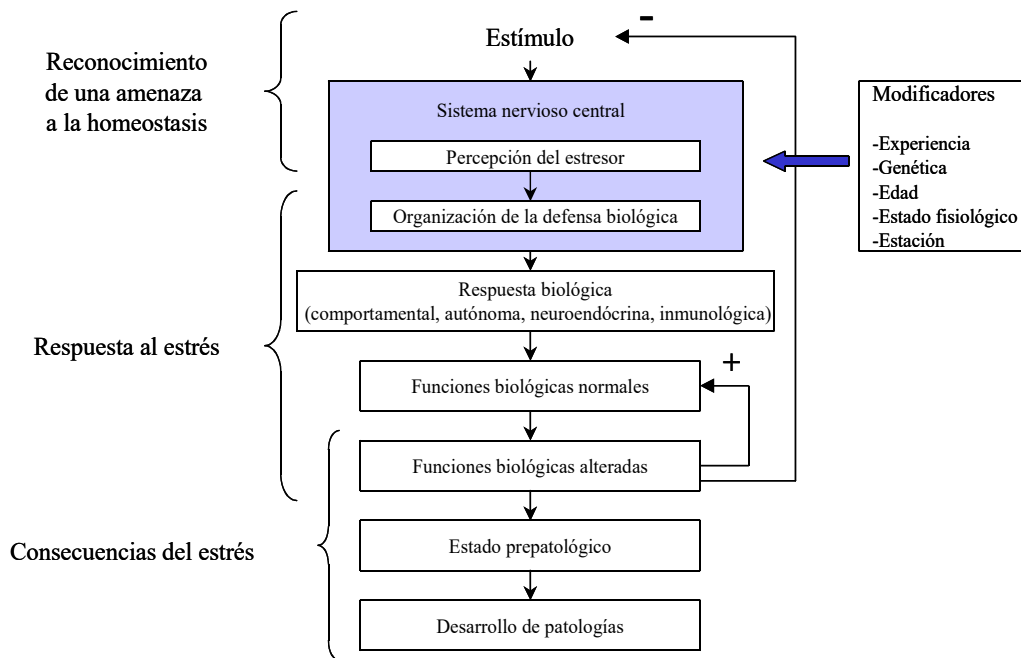


Figura 1. Modelo de la respuesta biológica de los animales frente a estrés. Adaptado de Moberg G. (2000).

Un desafío importante en la biología del estrés es desarrollar mediciones de estrés y distress. Además de la dificultad de obtener medidas sin estresar a los animales en el manejo, aparecen dos complicaciones adicionales, si bien los animales pueden activar los cuatro sistemas, no todos deben activarse necesariamente. Por otro lado, contrario a lo propuesto por Selye H. (1950, citado por Moberg G., 2000), no hay una respuesta única al estrés que pueda aplicarse a todos los estresores. Ya que como demostró Mason J. (1968, 1975, citado por Moberg G., 2000), diferentes estresores generan respuestas biológicas muy diversas.

Quizás el mayor problema en las mediciones de estrés es la variación en la respuesta biológica entre animales. Incluso expuestos al mismo estresor, cada animal en su sistema nervioso central puede utilizar una combinación de respuestas al estrés para protegerse del estresor. Los cuatro sistemas de defensa son influenciados por una variedad de factores (o modificadores), que pueden definir cómo el animal percibe un estímulo y si lo asume o no como una amenaza a su homeostasis (Moberg G., 2000) (Moberg G., 1985 citado por Moberg G., 2000).

La clave para diferenciar distress de un estrés no amenazante es su costo biológico. Durante la vida los animales desarrollan mecanismos para defenderse de estresores de corta duración. En estas situaciones, el costo es mínimo y no amenazante, debido a que existen reservas suficientes en recursos biológicos para defenderse del estresor, éstas satisfacen el costo biológico del estrés.

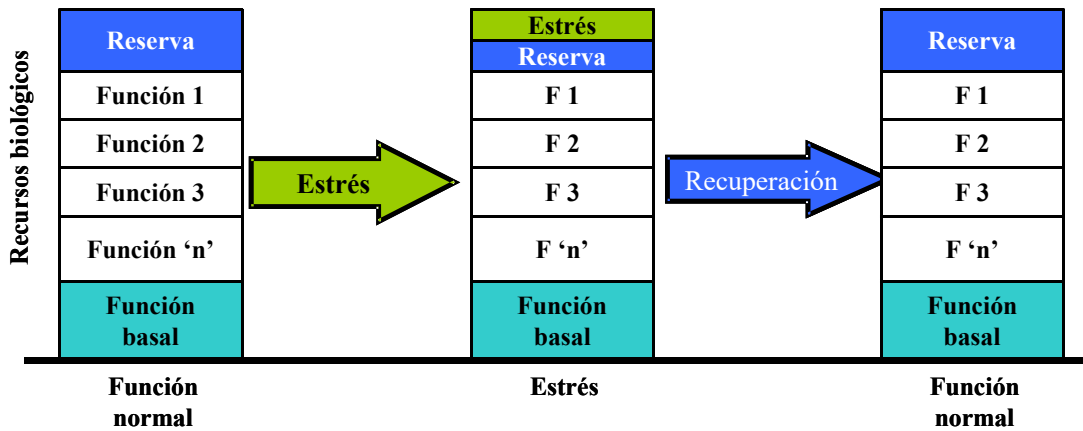
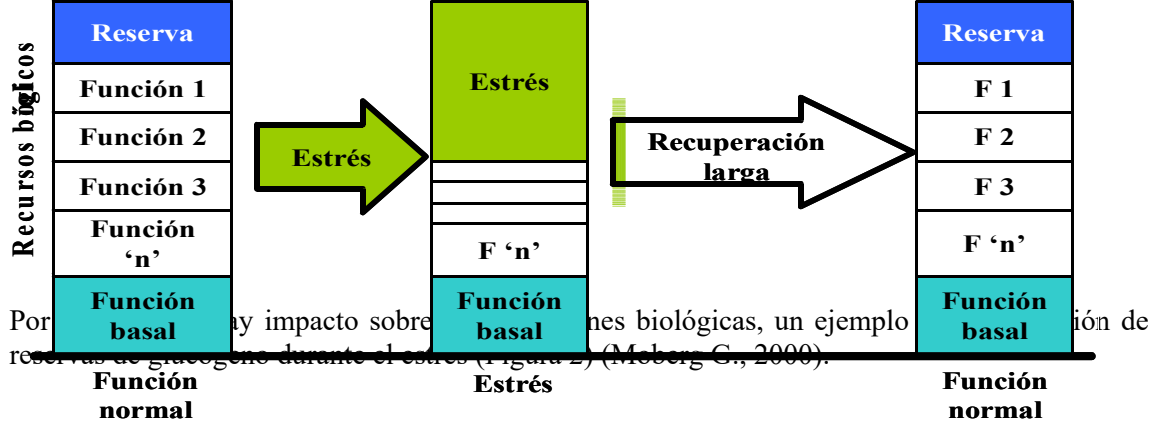


Figura 2. Respuesta al estrés sin costo biológico. Adaptado de Moberg G. (2000).

Cuando las reservas biológicas son insuficientes para satisfacer el costo de la respuesta al estrés, otros recursos son desviados para hacer frente al estrés y se perjudican una o varias funciones biológicas. Puede resultar entonces en falta de crecimiento para animales jóvenes, o fallas en la reproducción de animales adultos. En estos casos, los animales comienzan estados prepatológicos-patológicos y experimentan distress (Figura 1). Este período de distress puede transcurrir hasta que el animal recupera sus recursos biológicos en forma suficiente para restaurar sus funciones normales (Figura 3).

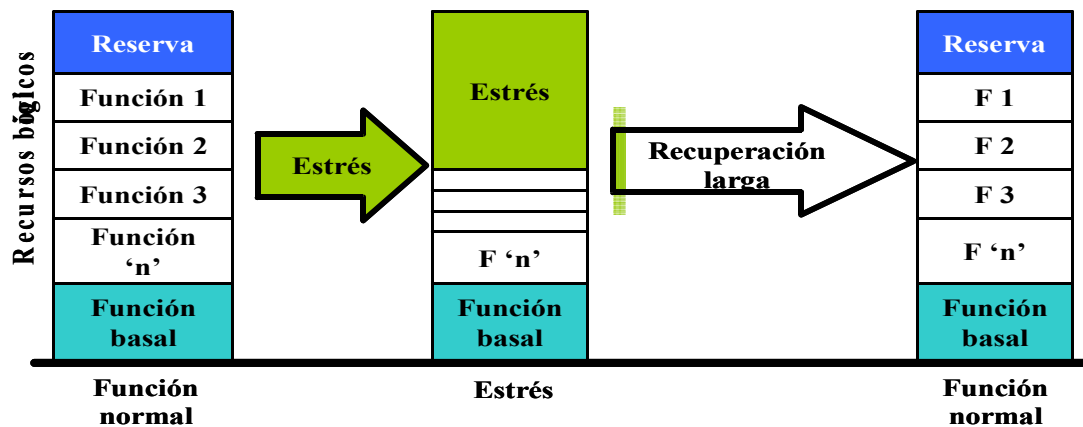


Figura 3. Estrés con costo biológico. Adaptado de Moberg G. (2000).

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

Un estrés agudo se considera usualmente como una exposición relativamente corta a un único estresor, puede interferir en funciones biológicas principalmente por dos mecanismos: afectando eventos críticos (ovulación), o desviando recursos hacia otras funciones biológicas (bajando las reservas para enfrentar otros estresores) (Moberg G., 2000).

Usualmente se asume que un estrés crónico se experimenta durante largo tiempo en forma continua (por ejemplo, exposición prolongada al frío), 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 G., 1985 citado por Moberg G., 2000). El agotamiento de las reservas debido a la exposición repetida de un mismo estresor, puede generar un estado de distress, 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 G., 2000).

Ya que el período de distress puede continuarse incluso cuando el estresor cesa y hasta que el animal retome los niveles de funciones biológicas pre-estrés, la magnitud de la respuesta al estrés y su impacto son suficientemente grandes como para denominarse estrés crónico. Durante el distress, el deterioro de las funciones sitúa al animal en un estado prepatológico que lo vuelve vulnerable a numerosas patologías (Moberg G., 2000).

La rápida activación de sistemas neuroendócrinos es una respuesta básica de los animales a perturbaciones ambientales que amenazan la homeostasis. Esta respuesta incluye la activación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA). Este eje es uno de los sistemas efectores primarios

que funciona para minimizar las desviaciones del estado homeostático y ayuda a retornar al equilibrio luego de un disturbio (Handa R. *et al.*, 1994). Numerosos factores están involucrados en la modulación de la actividad del eje HPA. Éstos incluyen sistemas neurotransmisores, neuropéptidos, hormonas esteroideas adrenales, y hormonas esteroideas gonadales (Whitnall M., 1993 citado por Handa R. *et al.*, 1994). Una variedad de estresores disponen el comienzo de una respuesta en la corteza adrenal en animales domésticos, resultando en la elevación plasmática de glucocorticoides (Kilgour R. *et al.*, 1970; Fulkerson W. *et al.*, 1982 citados por Ehnert K. *et al.*, 1991). En general, los glucocorticoides son vistos como las hormonas clave del estrés que permiten, estimulan, o suprimen las respuestas que siguen a un estrés, o son preparatorias frente a la exposición a un estresor posterior (Sapolsky R. *et al.*, 2000).

2.2 CLASIFICACIÓN DE ESTRESORES

En general, los estresores pueden ser divididos en cuatro grandes categorías:

- 1) Estresores físicos y químicos: en los físicos se incluyen entre otros frío, calor, radiación intensa, ruido, vibración, que tienen componentes psicológicos negativos o positivos según la situación. Existen estresores químicos que incluyen por ejemplo a todos los venenos. El estrés por dolor puede generarse por muchos agentes químicos y físicos diferentes.
- 2) Estresores psicológicos: que reflejan una respuesta aprendida en condiciones adversas vividas previamente. Afectan profundamente procesos emocionales y pueden resultar en cambios de comportamiento como ansiedad, miedo o frustración. Tanto el aislamiento como la aproximación de extraños en ovinos, son ejemplos de estos estresores.
- 3) Estresores sociales: que reflejan interacciones perturbadoras entre individuos. Incluye, por ejemplo, la localización de un animal dentro del territorio de otro animal dominante.
- 4) Estresores que desafían la homeostasis cardiovascular y metabólica: incluyen ejercicio, exposición al calor, hipoglicemia y hemorragia (Pacák K. *et al.*, 1998; McCarty R. 1989; van de Kar L. *et al.*, 1999 citados por Pacák K. *et al.*, 2001).

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 otros, especialmente aquellos que son importantes para la actividad locomotora, reciben suficientes 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 K. *et al.*, 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 crónico 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 (Burchfield S., 1979; Ladewig J., 1994 citados por Ladewig, J., 2000). 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 (ej. 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 estresor severo. La misma situación estresante puede afectar en forma diferente a especies distintas o a animales de la misma especie, ya que el efecto del estresor depende de la experiencia subjetiva del animal frente a la situación (Ladewig J., 2000).

Hay numerosos factores que determinan que un individuo resuelva una protección efectiva frente a un estresor en particular. Uno de estos factores, llamado la ‘retroalimentación relevante’, es la adecuada retroalimentación para las respuestas protectoras (Weiss J., 1971a,b,c citados por Pacák K. *et al.*, 2001). Por ejemplo, si la retroalimentación relevante para un estresor es baja, la respuesta relacionada al estrés se incrementa, mientras que si la retroalimentación relevante es alta, se presenta menor respuesta. Un carácter distintivo e importante de la protección exitosa frente al estrés, es que los sistemas fisiológicos no sean sólo activados eficientemente por un estrés particular, sino que también sean inactivados nuevamente luego de que el estresor cesa (McEwen B., 1997; Sapolsky R., 1994 citados por Pacák K. *et al.*, 2001). De este modo, cuando estos sistemas (ej, sistemas neuroendócrinos) no son rápidamente movilizados y luego adecuadamente reducidos, elevados niveles hormonales se vuelven peligrosos para el organismo, resultando en varias enfermedades relacionadas al estrés (ej, hipertensión, infartos, diabetes, obesidad, desórdenes autoinmunes e inflamatorios, etc. (McEwen B., 1997 citado por Pacák K. *et al.*, 2001).

2.3 ESTRÉS Y PRODUCCIÓN ANIMAL

Los animales domésticos experimentan tensiones en su vida cotidiana, que pueden afectar directa o indirectamente su comportamiento productivo (McDonald L., 1991). Estas tensiones o situaciones de estrés pueden suscitarse por la presencia de otros animales, del hombre o simplemente de ambiente.

2.3.1 Interacción animal-animal

Como fuera establecido por Mendl M. *et al.* (1992, citados por Morrow-Tesch J. *et al.*, 1994), la capacidad de un individuo de lidiar con el ambiente social no sólo puede afectar su acceso a los recursos, sino también su estado fisiológico y salud (González, M. *et al.*, 2003).

El estrés social puede influenciar el peso corporal y reducir la síntesis de anticuerpos, inmunidad celular, y la resistencia a infecciones bacterianas (Raab A. *et al.*, 1986; House J. *et*

al., 1988; Kelley K., 1980, 1985; McGlone J., 1990 citados por Morrow-Tesch J. *et al.*, 1994). Existen diferencias en peso corporal entre cerdos dominantes y sumisos, los dominantes pesaron más que los socialmente subordinados. Mendl M. *et al.* (1992, citados por Morrow-Tesch J. *et al.*, 1994) evaluaron algunas medidas fisiológicas de grupos de cerdas, clasificando cerdas con éxito alto, bajo o nulo en las interacciones sociales. Cerdas con poco éxito tuvieron elevado cortisol en saliva, y las cerdas preñadas con bajo éxito (o con rango intermedio) tuvieron crías con menores pesos al nacimiento (Morrow-Tesch J. *et al.*, 1994).

El status social puede influenciar la forma en que cada individuo lidia con su ambiente, bajo condiciones donde las vacas deben competir por comida y lugar de descanso. Aunque no se considera que la edad esté necesariamente relacionada a la condición social, bajo condiciones intensivas se ha sugerido que vacas jóvenes luego del primer parto e introducidas inmediatamente en un nuevo rodeo, son más subordinadas que las vacas más viejas y como consecuencia son más proclives a tener problemas de bienestar y salud (Galindo F., 1994; Galindo F. *et al.*, 2000 citados por González M. *et al.*, 2003). Estudios de comportamiento han demostrado que vacas que bajan de posición jerárquica en el período de servicios reducen su fertilidad (Dobson H. *et al.*, 2000).

2.3.2 Interacción hombre-animal

Los animales domesticados que están acostumbrados al manejo frecuente y al contacto cercano con humanos, usualmente se estresan menos que animales sin ese contacto (Grandin T., 1997).

El estrés por transporte puede alterar el ciclo estral de vacas, ovejas y cerdas (Lamond D., 1962; Braden A. *et al.*, 1964; Nalbondov A., 1964 citados por Ehnert K. *et al.*, 1991). También se reportó que el transporte de ovejas durante la estación no reproductiva causó ovulación, pero esta ovulación usualmente no estuvo acompañada por comportamiento estral ni por el inicio de una serie de ciclos estrales (Braden A. *et al.*, 1964 citados por Tilbrook A. *et al.*, 2000). En vacas, se encontró que el transporte también estimula la ovulación pero no el estro (Lamond D., 1962 citado por Tilbrook A. *et al.*, 2000). La mayoría de los estudios con ovinos y vacunos encontraron efectos inhibitorios del estrés por transporte sobre la reproducción (Moberg, G., 1987).

Un estudio realizado por Minton J. *et al.* (1990) muestra que la aplicación repetida de aislamiento y sujeción en corderos activa repetidamente el eje HPA y se observó alteración de las funciones inmunológicas (Coppinge T. *et al.*, 1991).

El estrés puede comprometer la calidad de la carne con cortes oscuros, lo que presenta un defecto persistente en calidad. Generalmente se ha aceptado que la glucogenólisis previa a la muerte es el mecanismo por el cual se generan los cortes oscuros. Varias condiciones, incluyendo estrés por transporte y mezcla con animales desconocidos, (Warriss P. *et al.*, 1990; McVeigh J. *et al.*, 1983; Kenny F. *et al.*, 1988 citados por Apple J. *et al.*, 1995) se han asociado con el agotamiento de las reservas de glucógeno en músculo antes de la muerte y con la obtención de cortes oscuros. Apple J. *et al.* (1995) encontraron que el estrés por aislamiento generó aumentos en los cortes oscuros en corderos. Tratamientos estresantes durante el

crecimiento pueden tener efectos adversos sobre la calidad de carne en corderos (Bramblett V. *et al.*, 1963 citados por Lanier J. *et al.*, 2000).

El confinamiento suprime la secreción de LH en ovejas, pero la repetición durante días consecutivos resulta en la acostumbramiento de los animales al estresor, con una secreción de LH poco afectada (Rasmussen D. *et al.*, 1983 citados por Tilbrook A. *et al.*, 2000).

Rushen J. (1996) plantea el tema de la aversión que muestran los animales frente a diferentes aspectos de manejo. En ovinos, tanto la sujeción como la esquila son prácticas que resultan aversas, siendo más importante la reacción que genera la esquila. La mayoría de los procedimientos de manejo, como el anterior, tienen un número de componentes y es importante determinar cuáles son los que generan mayor aversión. Aunque la remoción de lana es el componente que genera la respuesta en cortisol más prolongada de la esquila, es claro que los procedimientos asociados a todo el manejo, en sí mismos generan aversión. Si a los ovinos se les permite elegir entre sujeción, aislamiento social, contacto humano, ellos prefieren estar sujetos en contacto visual con otros ovinos que estar sueltos pero aislados visualmente de sus pares. El hecho de ser sujetados por humanos y más aún si los ovinos están acostados, genera aversión. El aislamiento social y el hecho de estar acostados también contribuye a las respuestas fisiológicas de la esquila, llevando a Hargreaves A. *et al.*, (1990a citado por Rushen J., 1996) a sugerir que este manejo puede resultar en menor aversión si los ovinos son esquilados en posición vertical mientras mantienen contacto visual con otros ovinos. Frente al aislamiento social los ovinos reaccionan balanceado y con actividad no específica, los cuales probablemente sean intentos por restablecer el contacto social (Rushen *et al.*, 1986a,d; Rushen J. *et al.*, 1986; Hargreaves A. *et al.*, 1990a citados por Rushen J., 1996).

Un número considerable de estudios han demostrado que la calidad del personal a cargo, y la naturaleza de la relación entre éste y los animales, pueden tener un mayor impacto en la producción y el bienestar animal. Muchos de los tratamientos de manejo frente a los cuales los animales muestran aversión son llevados a cabo por humanos. En un experimento se obtuvo evidencia de que los cerdos asociaron específicamente el manejo con los humanos y desarrollaron cierta aversión a ellos: cerdos manejados de mala manera tendieron a evitar a esas personas. De la misma forma, productores lecheros que manejan en forma más amigable a sus vacas, en general tienden a tener mayores producciones, y además los animales permiten a los tamberos acercarse más sugiriendo que ellas muestran menor aversión a ellos (Rushen J., 1996) (Seabrook M., 1984 citado por Rushen J., 1996).

Otros factores que pueden afectar la forma en que puede reaccionar un animal durante un procedimiento particular de manejo son los genéticos, como el temperamento, que interactúan en forma compleja con experiencias previas de manejo de animales y con el aprendizaje (Grandin T., 1997). Una línea de pensamiento propone que el grado de respuesta neuroendócrina frente al estrés está determinado por el alcance del estrés psicológico. En otras palabras, el estrés psicológico puede reducir el desempeño animal. Por ejemplo, vacas lecheras con temperamentos calmos tuvieron mayor producción de leche (Drugociu G., *et al.* 1977 citados por Lanier J. *et al.*, 2000).

2.3.3 Interacción animal-ambiente

El estrés por calor influye el consumo de alimento, peso corporal, fisiología, y funciones celulares inmunes. Los cerdos expuestos al estrés por calor presentaron menores ganancias en peso que los cerdos mantenidos a temperaturas termoneutrales (Kelley K. 1980, 1985 citados por Morrow-Tesch J. *et al.*, 1994).

La liberación preovulatoria de LH y la expresión del comportamiento estral parecen ser especialmente sensibles al estrés térmico (Moberg G., 1985 citado por Ehnert K. *et al.*, 1991). Por ejemplo, estrés por temperaturas ambientales excesivas pueden suprimir el comportamiento estral (vacas: Gangwar P. *et al.*, 1965; Bond J. *et al.*, 1972; ovejas: MacKenzie A. *et al.*, 1975 citados por Ehnert K. *et al.*, 1991). En ovejas sometidas a estrés por mojado, se retardó el pico de LH (Doney J. *et al.*, 1976). Tanto la exposición aguda a temperatura ambiental elevada como el estrés por sujeción o aislamiento causan incrementos en la secreción de cortisol en ovinos (Tilton J. *et al.*, 1975; Moberg G. *et al.*, 1980; Pierzchala K. *et al.*, 1985; Niezgodá J. *et al.*, 1987 citados por Minton J. *et al.*, 1990).

3 HORMONAS

3.1 DEFINICIÓN

Una hormona es una sustancia química producida en una parte del cuerpo (área limitada) que se transporta a otra área, donde influye en la actividad o tiende a integrar las partes componentes del organismo. Las hormonas regulan (disminuyen o aumentan) las tasa de procesos específicos, pero no aportan energía al proceso, ni inician reacciones metabólicas (Bayliss W. *et al.*, 1902 citado por McDonald L., 1991). Son sustancias secretadas por glándulas endócrinas que se caracterizan por no tener ductos de excreción ya que su producto es volcado directamente hacia el líquido extracelular y el plasma sanguíneo.

Una hormona es un mensaje químico que es transportado en la sangre hacia el sitio donde actúa unida a una proteína. Su acción se ejerce a través de la unión a un receptor, que induce cambios en la actividad de la célula a la que pertenece, la cual se denomina célula u órgano blanco ya que sus receptores son específicos para la hormona (McDonald L., 1991; García Sacristán A. 1998).

3.2 CLASES QUÍMICAS

Las hormonas pueden clasificarse según su estructura química la que a su vez determina el tipo de secreción, transporte y receptor. Nos centraremos en las hormonas polipeptídicas y esteroideas (García Sacristán A. 1998).

Las hormonas polipeptídicas varían en estructura y representan a las producidas, entre otras, por el hipotálamo y la adenohipófisis. Las hormonas proteicas son moléculas grandes (peso molecular 10000 o más) y solubles en agua, por lo que se acumulan en las células y se liberan a la sangre en forma intermitente de acuerdo a su requerimiento, transportándose libremente en sangre. Debido a su carácter hidrofílico no atraviesan las membranas celulares (compuestas por fosfolípidos) (McDonald L., 1991).

Las hormonas esteroideas constituyen otro grupo e incluyen las hormonas gonadales y corticoadrenales. La estructura del esteroide es compleja, el sustrato utilizado puede ser cualquiera de las sustancias intermedias que circulan hasta el órgano blanco, como acetato, colesterol, o aún otra hormona, como progesterona, producida en otra célula. Las hormonas esteroideas son pequeñas moléculas (peso molecular 300). Su carácter lipofílico permite que atraviesen las membranas libremente, no se almacenan en cantidades significativas dentro de la célula, y son liberadas a medida que se producen, por lo tanto su concentración en sangre refleja en cierta medida la tasa de síntesis. La hormona esteroidea no circula en la sangre en forma libre después de su liberación por el órgano endócrino; el plasma contiene proteínas específicas transportadoras para las hormonas esteroideas, a saber: globulina ligadora de corticosteroide (CBG) también llamada transcortina, que transporta adrenocorticosteroides y progesterona; y globulina ligadora de hormona sexual (SHBG), que transporta estradiol y testosterona. Esta unión a las proteínas plasmáticas limita la difusión de la hormona a través de los tejidos, pero al mismo tiempo prolonga su acción, puesto que la unión protege contra la degradación y la eliminación. La forma ligada de una hormona no puede penetrar en la célula y debe encontrarse en forma libre (proporción de equilibrio en sangre 5%) antes de poder difundir y ejercer su función biológica (McDonald L., 1991).

3.3 MODO DE ACCIÓN

Aún cuando todas las células se encuentran expuestas a hormonas, solo pueden responder las que tienen receptores específicos, por lo tanto se denominan células blanco. Los receptores específicos de estas células se encuentran en la membrana celular para las hormonas peptídicas, y en citoplasma y núcleo para las hormonas esteroideas. Por lo tanto, esteroides y péptidos, tienen mecanismos de acción diferentes (McDonald L., 1991).

El primer paso de la acción de una hormona peptídica (primer mensajero) es su unión al sitio receptor. Existen varios mecanismos de acción para los complejos receptor-hormona peptídica. En el caso particular de la ACTH, este complejo estimula la enzima adenilciclasa en la membrana celular para convertir el adenosin trifostato (ATP) en 3,5 adenosin monofostato cíclico (AMPc) en el citoplasma celular, actividad que está mediada por la proteína de unión de membrana llamada proteína G. El AMPc (segundo mensajero) transmite el mensaje de la hormona a sitios intracelulares para iniciar la cadena de reacciones que dan como resultado los efectos fisiológicos de la hormona. El AMPc causa la activación de una familia de enzimas de control ubicadas en el citoplasma, llamadas proteín quinasas. Estas proteínas son responsables de activar enzimas en el citoplasma que convierten sustratos en productos (McDonald L., 1991; Senger P., 1999).

Hay por lo menos seis pasos básicos en la acción de los esteroides. El primer paso consiste en la entrada del esteroide en la célula blanco por difusión a través de la membrana, cuando el esteroide es transportado por unión a proteínas transportadoras en sangre el complejo se disocia al contactar con la célula, permitiendo la entrada del esteroide. Luego se unen a un receptor específico perteneciente a la familia de receptores nucleares (Heinlein C. *et al.*, 2002). El complejo esteroide-receptor que se forma tras la unión experimenta una activación dependiente del tiempo o la temperatura. En el caso de receptores citoplasmáticos, posteriormente este complejo migra al núcleo donde se fija a un sitio específico en el cromosoma. Una vez ligado, ciertos componentes del genoma se activan o se reprimen, de manera que puede formarse un nuevo ácido ribonucleico mensajero (ARNm). Este ARNm migra hacia los ribosomas en el citosol para estimular la síntesis de proteínas específicas inducidas por las hormonas. La nueva proteína sirve de intermediario para la acción hormonal (McDonald L., 1991; Senger P., 1999).

Pueden definirse dos tipos de mecanismos de acción para las hormonas esteroideas: genómicos y no-genómicos. Efectos ‘genómicos’ son las acciones que demoran en su respuesta final y tienen prolongada duración ya que resulta en la transcripción de genes, y los efectos ‘no-genómicos’ son de corta duración y de rápida respuesta donde no interviene la activación génica (McEwen B. *et al.*, 1978 citado por McEwen B. *et al.*, 1999).

La actividad fisiológica de una hormona depende de varios factores que determinan la magnitud y duración de la acción de las hormonas. Éstos incluyen, patrón y duración de la secreción hormonal, vida media, densidad de receptores y afinidad hormona-receptor (Senger, P., 1999).

3.4 REGULACIÓN DE SÍNTESIS Y SECRECIÓN

La regulación de la secreción hormonal depende de varios mecanismos, pudiendo actuar más de uno sobre la misma hormona. Estos mecanismos se pueden clasificar de acuerdo a los siguientes criterios:

Control humoral: la concentración de un constituyente sanguíneo particular provoca la liberación de una hormona; el caso más claro es la relación entre glucosa e insulina. Este es uno de los esquemas de control más simple.

Control nervioso periférico: una conexión del nervio periférico puede provocar un incremento en la liberación de una hormona. Otro modo supone la *conexión hipotalámica* como forma de mediar el control nervioso. Un ejemplo es la manera en que la luz afecta el ciclo reproductivo en ciertos animales, ocasionando la liberación de gonadotropinas.

Mecanismo de retroalimentación: es una forma de corrección del gasto hormonal de una glándula por una retroalimentación sensora de niveles de otra hormona, o inclusive, de la misma hormona. Esta regulación puede ser negativa o positiva y darse, además, entre una hormona y la sustancia que se secreta bajo su influencia.

Las células endócrinas en la adenohipófisis se encuentran bajo el control de una hormona (factor) liberadora correspondiente en el hipotálamo. Estas hormonas liberadoras son pequeños

péptidos sintetizados por neurosecreción en las neuronas del hipotálamo. Son transportadas por el sistema porta hipofisiario a células endócrinas específicas en la adenohipófisis; allí, estimulan la liberación rápida de hormonas tróficas preformadas. Para la mayor parte de las hormonas tróficas hipofisiarias, el control de retroalimentación negativa se realiza por la concentración sanguínea de la hormona producida por la glándula endócrina blanco (por ejemplo, corteza adrenal, glándula tiroides, ovario y testículo). 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 L., 1991).

En general, las hormonas son secretadas en tres tipos de patrones. Un tipo es la secreción episódica, la cual en general está asociada a hormonas bajo control nervioso. Cuando los nervios en el hipotálamo se ‘encienden’, los neuropéptidos son liberados en forma explosiva (episodio), por lo tanto las hormonas de la adenohipófisis tienden a ser liberadas bajo el mismo patrón. Un segundo tipo de secreción es el patrón basal (tónico). Aquí, las hormonas permanecen bajas, pero fluctúan con bajas amplitudes de pulsos. El tercer tipo de perfil hormonal es la liberación sostenida. En este tipo, la hormona permanece elevada pero en una forma relativamente estable por un largo período de tiempo (días a semanas). En general, las hormonas que están controladas por la actividad nerviosa tienen una secreción de corta duración que es el resultado de explosiones en la actividad neural. Las hormonas que no están directamente relacionadas a la actividad nerviosa, como los esteroides gonadales, generalmente tienen un perfil sostenido de liberación mayor porque las glándulas que los producen lo hacen en forma continua. Durante el diestro o la preñez, los altos niveles de progesterona es un ejemplo de patrón sostenido de secreción hormonal (Senger P., 1999).

Las hormonas tienen diferentes duraciones dentro de la circulación sistémica. La tasa a la cual la hormona es removida de la circulación, determina su vida media. A mayor vida media, mayor el potencial de actividad biológica (Senger P., 1999).

La densidad de los receptores en el tejido blanco varía en función del tipo de célula, así como del grado en el cual la hormona promueve o inhibe la síntesis de receptores de hormona. Factores tales como la condición o nutrición animal pueden jugar un rol en influenciar el número de receptores. Diferentes hormonas promueven la síntesis de receptores tanto de sí mismas como de otras hormonas. Por ejemplo, la FSH promueve la síntesis de receptores de LH por las células del folículo (Senger P., 1999) y el estrógeno promueve la síntesis de receptores para estrógenos y progesterona en útero (Spencer T. *et al.*, 1995). Cuanto mayor el grado en que la célula es poblada por receptores, mayor el potencial de respuesta de la célula blanco (Senger P., 1999).

De esta manera, se puede ver que el sistema endócrino sirve como un importante mecanismo de control, que a su vez es controlado por diferentes vías (McDonald L., 1991).

4 ESTEROIDES

4.1 ESTEROIDOGÉNESIS

La esteroidogénesis es el proceso en el que células especializadas en tejidos específicos sintetizan hormonas esteroideas (Stocco D., 2001). La biosíntesis de esteroides adrenales es un proceso complejo que tiene lugar en dos organelos: mitocondria y retículo endoplásmico liso (RE). El colesterol es el precursor común del proceso que se inicia en la mitocondria y los metabolitos intermedios se trasladan entre los dos compartimentos subcelulares, donde están involucrados diferentes tipos de citocromos P450 (Takemori S. *et al.*, 1984 citados por Engelbrecht Y. *et al.*, 2000). De este modo las hormonas esteroideas tienen diversas funciones pero son sintetizadas por caminos enzimáticos que son idénticos en sus estados iniciales (Miller W. 1998, citado por Stocco D. 2001).

La molécula de colesterol cuenta con 27 carbonos, presenta tres anillos de seis carbonos (A, B y C) y un anillo de cinco carbonos (D), junto a una cadena lateral de ocho carbonos. Los enlaces dobles en la estructura se indican por la letra griega Δ , seguida de un número que indica el átomo de carbono de numeración más baja asociado al doble enlace. Así, el segundo anillo tiene un doble enlace entre los carbonos 5 y 6 por lo cual se le denomina ‘delta-5’ ($\Delta 5$) (McDonald L., 1991). Las fuentes de colesterol para la esteroidogénesis pueden ser: síntesis *de novo* a partir de acetato, almacenado en vacuolas lipídicas en forma esterificada dentro de la célula, o transportado por sangre desde el hígado, unido a lipoproteínas de baja densidad (LBD). En el último caso, ingresan a la célula por endocitosis por medio de receptores y constituyen la fuente principal (García Sacristán A., 1998).

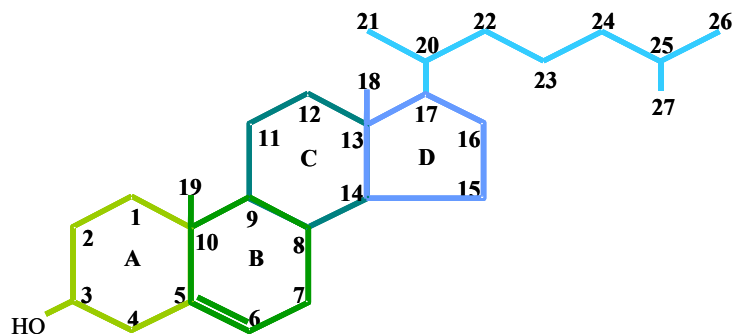


Figura 4. Molécula de Colesterol. Adaptado de Van Lier E. (1998).

En todos los tejidos esteroidogénicos, independientemente de la hormona sintetizada, el paso inicial en la esteroidogénesis es la conversión de colesterol en el primer esteroide, pregnenolona, dentro de la mitocondria (Stocco D., 2001).

La esteroidogénesis en el RE adrenal puede ser dividida en dos caminos diferentes de acuerdo al momento en que cambia de lugar el doble enlace del segundo anillo al primero ($\Delta 4$). Luego de remover la cadena lateral del colesterol por la enzima P450 P450_{scc}, el esteroide resultante, la pregnenolona, entra al RE desde la mitocondria (Takemori S. *et al.*, 1984 citados por Engelbrecht Y. *et al.*, 2000). En la vía $\Delta 5$, la pregnenolona es convertida en 17α -hidroxipregnenolona (17OHP5) y dehidroepiandrosterona (DHEA) por la enzima P450 17α -hidroxilasa/17-20 liasa (P450_{c17}). La DHEA es convertida a DHEA-sulfato y sirve de origen para andrógenos adrenales. El segundo camino, o $\Delta 4$, comienza por la acción de 3β -hidroxioesteroide-dehidrogenasa/ $\Delta 4$ - $\Delta 5$ isomerasa (3β HSD), la que cataliza la conversión de los esteroides $\Delta 5$ a los correspondientes esteroides $\Delta 4$, progesterona, 17α -hidroxiprogestero (17OHP4) y androstenediona (A4) (Sasano H. *et al.*, 1989; Suzuki T. *et al.*, 1992; Miller W. *et al.*, 1997 citados por Engelbrecht Y. *et al.*, 2000). La progesterona, el esteroide adrenal intermedio más importante fisiológicamente, sirve como sustrato para la P450 21-hidroxilasa (P450_{c21}), así como para la P450_{c17}. 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 sintetiza (P450_{aldo}). Asimismo, la hidroxilación del carbono 17 seguida por hidroxilación del carbono 21, determina el precursor de glucocorticoides, desoxicortisol (Takemori S. *et al.*, 1984 citados por Engelbrecht Y. *et al.*, 2000). El desoxicortisol es transformado en la mitocondria a cortisol por la enzima P450 11β -hidroxilasa (P450_{c11}). Aparentemente las tres enzimas mencionadas, 3β HSD, P450_{c17} y P450_{c21}, definirían los caminos 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 A. *et al.*, 1997).

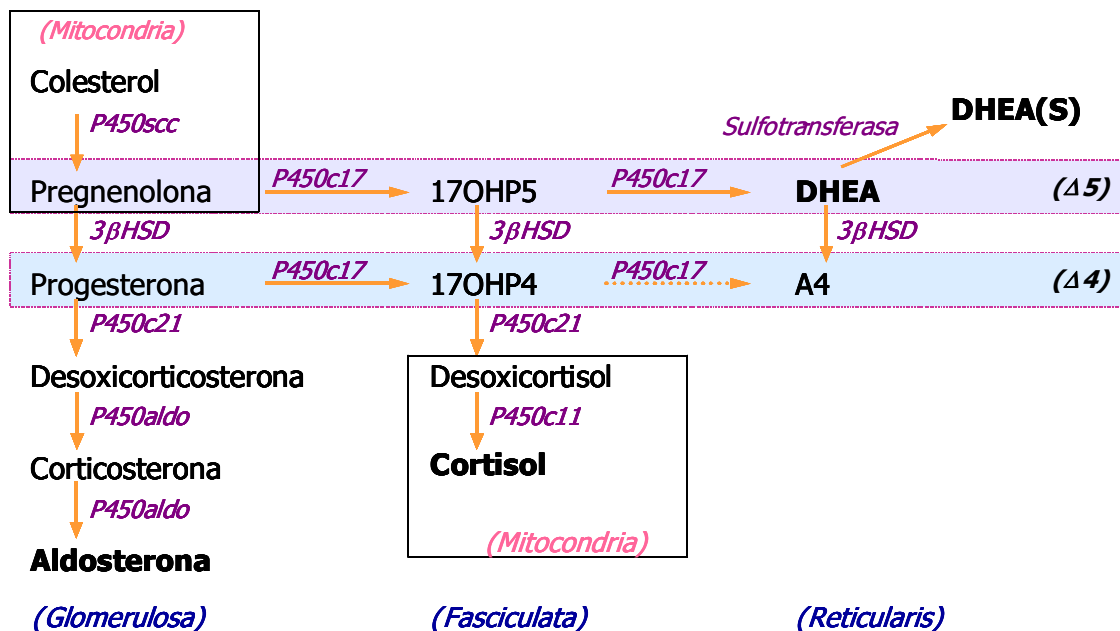


Figura 5. Esquema de la esteroidogénesis adrenal en mamíferos superiores (humanos, rumiantes). Ver texto para las abreviaturas de las hormonas y enzimas. Adaptado de Conley A. *et al.*, (1997).

La(s) reacción(es) terminal(es) en la producción de glucocorticoides tiene lugar en la mitocondria adrenal, donde desoxicorticosterona y desoxicortisol son convertidos a corticosterona y cortisol por la P450 aldosterona sintetasa (P450aldo) y P450 11 β -hidroxilasa (P450c11) respectivamente (Engelbrecht Y. *et al.*, 2000).

4.1.1 Regulación de la esteroidogénesis en adrenal

La biosíntesis de hormonas esteroideas es regulada mayormente por las hormonas tróficas de la pituitaria, como la adrenocorticotropina (ACTH), pero otros agentes también controlan la esteroidogénesis. En todos los tejidos la regulación de la producción de esteroides ocurre en dos fases. La fase aguda se da en el orden de minutos y es responsable de la producción rápida de esteroides en respuesta a necesidades inmediatas. La biosíntesis de glucocorticoides para combatir situaciones estresantes, y la síntesis de aldosterona para regular rápidamente la presión sanguínea, son ejemplos de lo que sucede en esta fase. La regulación crónica involucra la síntesis de ARNm y enzimas para la esteroidogénesis, incrementando la capacidad de síntesis de las células (Stocco D., 2001) (Stocco D. *et al.*, 1996, citados por Stocco D., 2001).

Al igual que la mayoría de los caminos biosintéticos, la esteroidogénesis tiene un paso crítico que limita su tasa de síntesis. En este caso, la transferencia rápida del colesterol desde el exterior de la mitocondria hacia su interior, donde se localiza la enzima P450scc, constituye la etapa

crítica. Esto se debe a que el colesterol por ser hidrofóbico, no puede atravesar rápidamente el espacio acuoso intermembrana mitocondrial para alcanzar la enzima P450_{scc}, y dar lugar a la síntesis aguda en respuesta a señales esteroideogénicas. En la glándula adrenal, donde la ACTH controla la biosíntesis de esteroides, la estimulación aguda requiere la síntesis de nuevas proteínas. Varias investigaciones proponen que la proteína reguladora aguda de la esteroideogénesis (StAR) es la encargada de realizar el transporte del colesterol (Stocco D., 2001) (Stone D. *et al.*, 1954; Farkash Y. *et al.*, 1986; Black S. *et al.*, 1994 citados por Stocco D., 2001).

4.2 PROGESTERONA

4.2.1 Lugar de síntesis

La progesterona es producida por el cuerpo lúteo, y por la placenta durante la gestación (García Sacristán A., 1998). Es un componente clave en la compleja regulación de las funciones reproductivas de la hembra. También es sintetizada por las glándulas adrenales, y como compuesto intermediario en las células tecaes de los folículos ováricos y en las células de Leydig de los testículos. En la oveja, las concentraciones varían entre 3 a 7 nmol/L en la fase luteal, mientras que durante la preñez las concentraciones aumentan encontrándose en el rango de 15 a 40 nmol/L.

4.2.2 Efectos

Sobre órganos reproductivos: modifica el endometrio uterino en el pasaje de la fase proliferativa (en respuesta a los estrógenos) a la fase secretora. Es necesaria para el mantenimiento de la gestación y su ausencia, o la disminución en su concentración, origina el aborto. Facilita la implantación y suprime la contractilidad del miometrio. Estimula el desarrollo de los lóbulos alveolares de la glándula mamaria (acción sinérgica con los estrógenos) (Graham J. *et al.*, 1997; García Sacristán A., 1998).

Sobre otros órganos: favorece el metabolismo general, aprovechando mejor los nutrientes y estimulando el apetito durante la gestación. Origina un aumento en los niveles de colesterol y triglicéridos. Además, induce un aumento transitorio en la excreción de sodio por la orina, debido a su capacidad de contrarrestar la acción de la aldosterona. El efecto metabólico más característico de la progesterona es el aumento de la temperatura basal (García Sacristán A., 1998). En el cerebro media las señales requeridas para las respuestas de comportamiento sexual. Evidencia reciente también aporta un rol de la progesterona en la modulación de la masa ósea (Graham J. *et al.*, 1997).

Los efectos de la progesterona en los tejidos se hacen evidentes cuando éstos han estado previamente expuestos a los estrógenos, los cuales actúan incrementando el número de receptores para esta hormona. Esto quiere decir que ambas hormonas, estrógenos y progesterona, actúan sinérgicamente (García Sacristán A., 1998).

4.3 TESTOSTERONA

4.3.1 Lugar de síntesis

La testosterona, secretada por las células de Leydig en testículos, resulta esencial para algunas etapas básicas de la división de las células germinales hasta formar los espermatozoides (García Sacristán A., 1998). La corteza adrenal también secreta andrógenos, pero en cantidades que en general son bajas y depende de la especie (McDonald L., 1991). Su secreción en carneros enteros varía entre 1 y 40 nmol/L.

4.3.2 Efectos

Sobre órganos reproductores: estimulan el crecimiento y función de los órganos genitales internos y accesorios, son responsables de los caracteres sexuales secundarios. Facilitan la libido y aumentan la potencia sexual en el macho. Es necesaria la intervención de testosterona para una normal función espermatogénica (García Sacristán A., 1998).

Sobre otros órganos: los esteroides con actividad androgénica tienen un efecto anabólico proteico y miotrófico al incrementar la síntesis de proteína y disminuir la velocidad de descomposición de aminoácidos, lo que lleva a un aumento de la masa muscular y una redistribución de la grasa. Estimula o suprime la secreción de proteínas organoespecíficas en tejidos como riñón, hígado o las glándulas salivales. Influye sobre el crecimiento óseo y la retención de calcio; favorece la retención del nitrógeno (García Sacristán A., 1998).

4.4 ESTRADIOL

4.4.1 Lugar de síntesis

Ha sido aislado de los ovarios, adrenales, placenta, y testículos. En el folículo ovárico se producen en las células de la granulosa con el control sinérgico de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH). La interacción entre las células teca y de la granulosa es necesaria para la esteroidogénesis folicular. Las glándulas adrenales producen estrógenos pero, bajo condiciones normales, en cantidades insuficientes para reemplazar la producción ovárica normal de estrógenos. La placenta también es una fuente de estrógenos en animales preñados (McDonald L., 1991). Los estrógenos pueden ser secretados por las células de Sertoli (testículos) en los machos, bajo el estímulo de la hormona folículo estimulante (FSH), ayudan al proceso de la espermiogénesis (García Sacristán A., 1998). El rango en que es secretado en la oveja varía entre 30 a 60 pmol/L durante la fase folicular.

4.4.2 Efectos

Sobre los órganos reproductores: son los responsables del desarrollo del tracto genital en la pubertad y los caracteres sexuales secundarios de la hembra. Inducen la elongación de los oviductos y aumento de la actividad secretora. Favorecen el proceso de ovicaptación durante la

ovulación. Estimulan el desarrollo de los conductos de la glándula mamaria. Regulan la foliculogénesis colaborando con la hormona folículo estimulante (FSH). Originan un aumento del tono en el miometrio uterino, lo que favorece el transporte de los espermatozoides durante el estro. Además, aumentan el nivel de anticuerpos en el tracto genital, incrementando las defensas del animal frente a posibles infecciones del aparato genital durante el estro. Causan también una relajación, junto con la relaxina, del conducto del parto. Son los responsables de la conducta sexual de la hembra durante el estro, siendo necesaria una secuencia determinada entre estrógenos y progesterona para que se origine el estro conductual. (García Sacristán A., 1998).

Sobre otros órganos: Inhiben el crecimiento de los huesos largos, en consecuencia cesa el crecimiento en las hembras púberes. Inhiben también la resorción ósea evitando una excesiva desmineralización del esqueleto durante la gestación. Incrementan la síntesis en el hígado de proteínas plasmáticas que se unen al estradiol, testosterona, cortisol, progesterona y tiroxina para su transporte. Disminuyen, además, los niveles circulantes de colesterol (García Sacristán A., 1998).

4.5 CORTISOL

4.5.1 Lugar de síntesis

Se sintetiza en la corteza de la glándula adrenal. Una elevación de ACTH precede la elevación de glucocorticoides. Luego de su ingreso al torrente sanguíneo más del 90 % del cortisol es ligado a proteínas transportadoras; únicamente el cortisol libre es biológicamente activo y se difunde a las células donde inicia sus efectos. La vida media del cortisol es menor a dos horas (McDonald L., 1991). En los ovinos los niveles basales varían de 10 a 40 nmol/L y bajo estímulo de la ACTH pueden llegar a aproximadamente 350 nmol/L (Van Lier E. *et al.*, 2003a).

4.5.2 Efectos

Regula procesos que permiten que los animales se adapten a un ambiente cambiante (colaboran en la homeostasis). Aseguran el aporte de glucosa al sistema nervioso central. Durante la lactancia contribuyen a la movilización de reservas para ser usadas en la síntesis de leche. Los glucocorticoides tienen acción anabólica en el hígado y riñón, donde inducen la gluconeogénesis, y en el pulmón, donde estimulan la biosíntesis de fosfolípidos. Tienen acción catabólica en la destrucción de macromoléculas proteicas o lipídicas en células musculares, adiposas, linfoides, conectivas, cutáneas y óseas. Son reguladores de la respuesta inflamatoria y estimulantes del sistema nervioso central (García Sacristán A., 1998).

5 EL EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIA-ADRENAL (HPA)

5.1 LA GLÁNDULA ADRENAL

Las glándulas adrenales son órganos endócrinos pares localizados en la cavidad abdominal próximos a los riñones. Las hormonas secretadas por estas glándulas regulan procesos metabólicos que permiten a los animales adaptarse a un ambiente que cambia de manera constante (McDonald L., 1991). Cada glándula consta de dos tejidos endócrinos de diferente origen embrionario: tejido adrenocortical productor de las hormonas esteroideas (corticosteroides) y células cromafines productoras de catecolaminas (Ehrhart-Bornstein M. *et al.*, 1998). Estos tejidos corresponden, respectivamente, a la parte exterior o corteza adrenal y a la parte interna o médula adrenal de la glándula.

La corteza adrenal constituye el 90% de la masa glandular y se divide, desde la parte externa hacia la interna, en tres zonas: glomerulosa, fasciculada y reticular. En la corteza adrenal se sintetizan y liberan más de 50 esteroides diferentes. Estos esteroides pueden ser de tres clases: glucocorticoides que recibieron este nombre debido a su efecto en la homeostasis de glucosa; mineralocorticoides, debido a su efecto en la homeostasis de Na y K; y hormonas esteroideas sexuales, especialmente andrógenos (McDonald L., 1991).

La desoxicorticosterona y la aldosterona tienen una actividad predominantemente mineralocorticoide y, en general, se sintetizan en la zona glomerulosa siendo ésta la única fuente en el caso de la aldosterona. La zona fasciculada y reticular producen los corticosteroides cortisol y corticosterona, que tienen actividad predominantemente glucocorticoide, y los andrógenos [predominantemente dehidroepiandrostenediona (DHEA)] que pueden ser más abundantes en la zona reticular. Los corticosteroides regulan las concentraciones de Na y K en el plasma, junto con el volumen apropiado de agua para mantener la hidratación celular. Junto a las catecolaminas participan en la regulación de los procesos metabólicos y el mantenimiento de la adecuada nutrición de todas las células, en especial del tejido nervioso. En general, las hormonas corticosteroides se ven implicadas en cambios adaptativos que ocurren en cuestión de minutos, horas o días, mientras que las catecolaminas regulan e inducen respuestas rápidas, en cuestión de segundos, en sistemas orgánicos mayores, como los sistemas cardiovasculares y neuromuscular. El cortisol es el glucocorticoide más potente secretado por la corteza adrenal, mientras que la aldosterona es el mineralocorticoide más potente (McDonald L., 1991; Ehrhart-Bornstein M. *et al.*, 1998).

La médula adrenal comprende un 10% de la masa total de la glándula adrenal. Las células medulares o cromafines sintetizan y almacenan las catecolaminas; la noradrenalina y la adrenalina (McDonald L., 1991).

Las células dentro de la adrenal se comunican unas con otras y adaptan la función de la glándula a diferentes situaciones. La glándula adrenal, entonces, produce una amplia variedad de hormonas, neuropéptidos, neurotransmisores, y citoquinas, y es evidente que la co-localización de estos diferentes sistemas tiene un significado funcional importante. El control integrado de la función adrenocortical involucra interacciones córtico-medulares, el aporte vascular de la

glándula, sus entradas neurales, el sistema inmune, factores de crecimiento, y los sistemas intraglandulares renina-angiotensina y CRH-ACTH (Ehrhart-Bornstein M. *et al.*, 1998).

5.2 GLÁNDULA PITUITARIA O HIPÓFISIS

La glándula hipófisis está ubicada en la base del cerebro y se subdivide anatómicamente en adenohipófisis (lóbulo anterior) y neurohipófisis (lóbulo posterior). La adenohipófisis contiene poblaciones múltiples de células endócrinas que secretan las hormonas tróficas hipofisarias. La adenohipófisis y el hipotálamo forman parte de un sistema de relevo de información integrado y funcional que une el sistema nervioso con el endócrino. Mientras que la corteza adrenal secreta hormonas estrechamente relacionadas (los esteroides), la hipófisis secreta numerosas hormonas peptídicas, muchas de las cuales son muy diferentes en estructura química y tamaño (McDonald L., 1991).

Las glándulas endócrinas, como la hipófisis participan exclusivamente en la función endócrina. Son pequeñas, en comparación con otros órganos corporales y están conectadas con otras glándulas endócrinas por medio de la corriente sanguínea. Se encuentran muy irrigadas, hay una estrecha relación anatómica entre las células endócrinas y la red de capilares. Las células endócrinas al trabajar en conjunto con el sistema nervioso integran y coordinan una amplia variedad de actividades fisiológicas que tienen que ver con el mantenimiento de un medio interno constante (McDonald L., 1991).

5.2.1 Hormona adrenocorticotropina

La ACTH es un polipéptido de la adenohipófisis que en la oveja, cerdo, vaca y hombre contiene 39 aminoácidos. La ACTH tiene efecto trófico en la corteza adrenal y estimula también la síntesis de corticosteroides. Existen muchos factores que afectan la liberación de ACTH de la glándula hipófisis, pero los factores centrales son la arginina vasopresina (AVP) y hormona liberadora de corticotropina (CRH). Estas hormonas se liberan desde el hipotálamo y se transportan por el sistema porta a la adenohipófisis, en donde estimulan la liberación de ACTH. La regulación de la secreción de ACTH está íntimamente asociada con el hipotálamo y existe un mecanismo de retroalimentación (McDonald L., 1991).

La principal función fisiológica de la ACTH es estimular la secreción por las zonas intermedias (zonas fasciculada y reticular) de la corteza adrenal, en especial de cortisol (mamíferos superiores) o corticosterona (roedores). La corteza adrenal responde a la ACTH morfológicamente con hipertrofia de las células en las zonas fasciculada y reticular, y en forma funcional con una producción incrementada de los glucocorticoides. La acción específica de la ACTH en la glándula adrenal parece ser la estimulación de la síntesis de corticoides. La vida media de la ACTH es de sólo 6 minutos (McDonald L., 1991).

5.3 HIPOTÁLAMO

Como ya mencionáramos, la ACTH es el principal regulador de la síntesis y secreción de cortisol. Sucesivamente, la secreción de ACTH parece ser regulada por una variedad de péptidos, pero principalmente por hormona liberadora de corticotropina (CRH) y arginina vasopresina (AVP). En el caso particular de los ovinos, la AVP es mucho más potente que la CRH en términos de su capacidad para estimular la secreción de ACTH. En contraste, cerdos y vacunos tienen mayor respuesta secretoria a la CRH que a la AVP. En todos los animales estudiados, la combinación de CRH y AVP aumentan la secreción de ACTH, situación que es similar en ratas (Dobson H. *et al.*, 2000) (Pradier P. *et al.*, 1986; Watanabe T. *et al.*, 1987, 1988; Familiar M. *et al.*, 1989; Liu J. *et al.*, 1990; Minton J. *et al.*, 1993; Carroll J. *et al.*, 1993; Jacob E. *et al.*, 1993 citados por Minton J., 1994).

La CRH hipotalámica es un neuropéptido responsable por las respuestas endócrinas, autónomas, inmunológicas y comportamentales de los mamíferos frente al estrés (Moberg G., 2000). El rol más importante de la CRH es la regulación del eje HPA a través de la inducción del gen de pro-opiomelanocortina y la secreción basal e inducida por estrés de ACTH en la pituitaria anterior, y glucocorticoides desde la glándula adrenal (Toates F., 1995 citado por Gupta S., 2004). La hipersecreción de CRH genera entre otros efectos, actividad inmunosupresora, disminución del consumo de alimento, modulación de la actividad locomotora, y limita la eficiencia de la reproducción por disminución de la actividad secretora de las células que producen GH y GnRH en el ganado (Smith R. *et al.*, 2002). Resultados de trabajos realizados en novillos inyectados con CRH, muestran que existe un efecto estimulador de este factor sobre la pituitaria y subsecuentemente sobre las adrenales, a través de los cambios registrados en las concentraciones plasmáticas de ACTH y cortisol. Mayores valores en la relación cortisol/ACTH, que indican una mayor respuesta adrenal, pueden ser de utilidad para evaluar la sensibilidad de las adrenales durante eventos estresantes (Gupta S., 2004).

Los esteroides adrenales actúan sobre el hipotálamo para influenciar la cantidad de CRH descargada. Además, ciertos estímulos de tensión como hemorragia, temperatura, toxinas y estado emocional influyen en la liberación de ACTH al provocar la liberación de CRH. El tercer 'regulador' del gasto de ACTH es la influencia diurna vista por una elevación matinal en ciertos, pero no todos los animales (McDonald L., 1991).

5.4 ACTIVACION DEL EJE HPA

La liberación de glucocorticoides es, entonces, regulada vía eje HPA, con CRH/AVP y ACTH como respectivos secretagogos (Ehrhart-Bornstein M. *et al.*, 1998). Bajo la influencia tanto de factores externos como internos, la activación del eje HPA ocasiona incremento en la síntesis de CRH en las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo, y su liberación dentro de la circulación porta pocos segundos luego de iniciado el estrés (O'Connor T. *et al.*, 2000 citado por Gupta S., 2004).

El sistema central CRH/ACTH es regulado por un mecanismo de retroalimentación. En ratas, el tratamiento con cortisol disminuyó la secreción de ACTH adrenal luego de 2 días de tratamiento, y el contenido de CRH adrenal luego de 7 días confirmando la retroalimentación negativa del cortisol sobre el hipotálamo-hipófisis. En contraste, el contenido intraadrenal de inmunoreactividad de CRH y ACTH se incrementó en ratas hipofisectomizadas en relación directa al número de días luego de la hipofisectomía. La infusión de ACTH, a una tasa que restableció su concentración normal en la sangre, previno el efecto de la hipofisectomía sobre las concentraciones intraadrenales de ACTH y CRH, y en terneros hipofisectomizados, la ACTH redujo la liberación adrenal de CRH. Estos hallazgos sugieren que la eliminación del sistema central CRH/ACTH induce un marcado incremento en la actividad del sistema intraadrenal, y que la regulación de CRH y ACTH adrenal es alcanzada a través de la inhibición de la retroalimentación por los productos finales ACTH y glucocorticoides (ratas: Bagdy G. *et al.*, 1990; Mazzocchi G. *et al.*, 1994; terneros: Edwards A. *et al.*, 1988 citados por Ehrhart-Bornstein M. *et al.*, 1998).

6 EJE HIPOTALAMO-PITUITARIA-GONADAL

Los ovinos presentan una estación reproductiva definida dependiente del fotoperíodo, siendo el acortamiento de la duración del día el factor que define su comienzo. Este fenómeno se encuentra bajo la regulación de una ruta hipotálamo-pineal-reticular (Bronson F., 1988, 1989; Bronson F. *et al.*, 1994 citados por Pérez R., 1998). En términos generales, la máxima actividad sexual de las ovejas ocurre en otoño y en los meses tempranos de invierno (Hafez E., 1952 citado por Pérez R., 1998). Los machos mantienen la fertilidad a lo largo del año, no presentan un período de quiescencia como las hembras, y muestran un patrón reproductivo estacional variable con un pico entre fines de verano y durante el otoño (Glover T. *et al.*, 1990 citado por Pérez R., 1998).

6.1 REGULACION DEL EJE HPG EN HEMBRAS

Luego de la pubertad las hembras ingresan en un período de ciclicidad reproductiva que continua a lo largo de la vida productiva. El ciclo estral consiste en una serie de eventos reproductivos predecibles que comienzan con el estro y terminan con el próximo estro. Las razones por las que el estro puede interrumpirse son la preñez, la lactancia, y la estación. La ciclicidad también puede cesar por inadecuada nutrición, cuerpo lúteo persistente, enfermedades del tracto reproductivo y condiciones ambientales estresantes (Senger P., 1999).

El ciclo estral puede ser dividido en dos fases, folicular y luteal, en función de la estructura presente en el ovario. La fase folicular es el período que va desde la regresión del cuerpo lúteo hasta la ovulación; la estructura dominante es el folículo que produce estradiol. La fase luteal es el período que va desde la ovulación hasta la regresión del cuerpo lúteo; la estructura dominante es el cuerpo lúteo que produce progesterona. Los folículos continúan en desarrollo durante esta etapa pero regresan (Senger P., 1999).

Asimismo, el ciclo estral puede ser dividido en cuatro etapas que constituyen subdivisiones de las fases folicular y luteal. La fase folicular incluye el proestro y estro, mientras que la luteal incluye metaestro y diestro. El proestro comienza cuando la progesterona declina como resultado de la luteólisis (destrucción del cuerpo lúteo). En la oveja dura de dos a tres días y se caracteriza por la transición de un período en el que domina la progesterona a otro en el que domina el estrógeno, siendo la LH y FSH las principales hormonas responsables de dicha transición. Durante esta etapa los folículos se reclutan para su crecimiento y luego la ovulación, y el sistema reproductivo de la hembra se prepara para el inicio del estro y la cópula. El estro es la etapa más reconocible del ciclo porque se caracteriza por un comportamiento visible, receptividad sexual y cópula. El estradiol es la hormona dominante en esta etapa, que además de inducir alteraciones comportamentales provoca cambios fisiológicos en el tracto reproductivo. Cuando la hembra entra en estro lo hace gradualmente, mostrando receptividad sexual en la medida que avanza esta etapa. En la oveja la duración promedio del estro es de 30 hs, con un rango entre 18 y 48 hs. La ovulación es espontánea y ocurre hacia el final del estro. El folículo recientemente ovulado sufre una remodelación celular y estructural que resulta en la formación de una glándula endócrina intraovárica llamada cuerpo lúteo, este proceso es denominado luteinización. El metaestro es el período de formación de cuerpo lúteo. En la oveja la duración de esta etapa es de aproximadamente dos días. El diestro es la etapa más larga del ciclo estral, dura de 12 a 14 días en la oveja, y comprende el período en el cual el cuerpo lúteo es totalmente funcional y la producción de progesterona es alta. De no producirse concepción, el cuerpo lúteo regresa (luteólisis) y se reinicia el ciclo. La duración total del ciclo es de 17 días en promedio con un rango entre 13 a 19 días (Senger P., 1999).

Como fuera mencionado anteriormente, la fase folicular se inicia luego de la luteólisis con una marcada reducción en los niveles de progesterona. Por lo tanto, la retroalimentación negativa por progesterona en el hipotálamo es eliminada y la GnRH liberada a amplitudes y frecuencias más altas que durante la fase luteal. Esto provoca que la FSH y la LH sean liberadas a altos niveles, promoviendo el desarrollo folicular y la producción de estrógeno (Senger P., 1999).

La secreción de GnRH en la hembra está controlada por dos áreas del hipotálamo, el centro tónico y el centro cíclico. El primero es responsable de la secreción basal de GnRH, el perfil de liberación se caracteriza por presentar muchos pulsos pequeños o episodios que presentan variaciones en frecuencia y amplitud dependiendo del grado de activación nerviosa del centro. El centro cíclico es responsable de la liberación preovulatoria de GnRH que estimula el pico de LH, causando la ovulación. Este centro libera niveles basales de GnRH hasta que recibe cantidades adecuadas de estrógenos en ausencia de progesterona. Bajos niveles de estrógeno causan retroalimentación negativa sobre el centro cíclico, lo que significa que el estrógeno reduce la activación de las neuronas de GnRH. Sin embargo, cuando los niveles de estradiol son altos, como ocurre de mediados a fin de la fase folicular, el centro cíclico responde por retroalimentación positiva liberando grandes cantidades de GnRH, que se traduce en el pico preovulatorio de LH. Durante la mitad del ciclo, cuando los niveles de estradiol son bajos y la progesterona es alta, la retroalimentación es negativa sobre el centro cíclico, evitando amplitudes mayores de pulsos de GnRH. Este ambiente hormonal también retroalimenta negativamente el centro tónico en hipotálamo (García Sacristán A., 1998; Senger P., 1999).

6.2 REGULACION DEL EJE HPG EN MACHOS

El hipotálamo del macho no desarrolla un centro cíclico como en la hembra. En lugar de una liberación basal seguida de un pico preovulatorio de GnRH cada pocas semanas, como en la hembra, la descarga de GnRH desde el hipotálamo en el macho ocurre en forma de pulsos frecuentes e intermitentes. Estos pulsos de GnRH duran unos minutos y provocan descargas de LH que ocurren casi inmediatamente luego del pulso de GnRH. Los pulsos de LH duran entre 10 y 20 minutos y ocurren entre cuatro y ocho veces a lo largo del día. Las concentraciones de FSH son menores, pero los pulsos son de mayor duración que los de LH, debido a la relativamente constante secreción de inhibina por los testículos (Senger P., 1999).

La LH actúa en las células de Leydig en los testículos. Ellas contienen receptores de membrana para la hormona y cuando ésta se une a sus receptores producen progesterona, la que mayormente es convertida a testosterona. La respuesta en secreción de testosterona de las células de Leydig es corta, pulsátil y dura de 20 a 30 minutos (Senger P., 1999).

Se cree que la descarga pulsátil de LH es importante por dos razones. Primero, las altas concentraciones de testosterona son esenciales para la espermatogénesis pero no deben estar presentes en forma continua. Segundo, las células de Leydig se vuelven refractarias a altos y sostenidos niveles de LH, resultando en un decremento en la secreción de testosterona. Se cree que la condición refractaria es causada por una reducción en el número de receptores de LH en las células de Leydig. Por lo tanto, hay una marcada reducción en la secreción de progesterona y testosterona en estas circunstancias. Los niveles de testosterona intratesticular deben ser altos para una espermatogénesis exitosa. Concentraciones altas de testosterona en forma crónica suprimen los niveles de FSH. La función de la célula de Sertoli es dependiente de FSH; por lo tanto si la FSH se reduce su función se compromete. La reducción periódica de testosterona permite remover el feedback negativo que existe sobre la FSH. Las células de Sertoli convierten la testosterona en estradiol utilizando un mecanismo idéntico al de las células de la granulosa en hembras. El rol exacto del estradiol en la reproducción en machos está pobremente comprendido, pero todo indica que esta hormona juega un rol de feedback negativo en el hipotálamo. La testosterona y el estradiol en sangre actúan sobre el hipotálamo para ejercer una retroalimentación negativa en la producción de GnRH y por lo tanto la LH y FSH se reducen. Entonces, altas concentraciones de estradiol resultan en supresión de descargas de GnRH y LH. Existe además la influencia de un inhibidor hipofisiario no esteroidal de origen gonadal, la inhibina, producida por las células de Sertoli en machos, se encuentra en fluido testicular y plasma seminal. La inhibina suprime selectivamente los niveles plasmáticos de FSH, sin alterar los niveles de LH, por medio de retroalimentación negativa (McDonald L., 1991; Senger P., 1999).

7 ESTRÉS Y REPRODUCCIÓN

La temprana observación de Selye (1939, citado por Handa R. *et al.*, 1994) que el estrés está acompañado por un incremento en la actividad del eje HPA y un decremento en las funciones

reproductivas, ha sugerido una posible relación entre hormonas del eje HPA (liberadas durante el estrés) y las del eje HPG. De hecho, la CRH, los péptidos derivados de pro-opiomelanocortina (POMC) (tales como ACTH y β -endorfina), y los corticosteroides juegan un importante rol en la modulación de los efectos del estrés sobre las funciones reproductivas (Handa R. *et al.*, 1994).

La hipótesis es que existen dos niveles de acción principales por los cuales la activación del eje HPA reduce la eficiencia del eje HPG (Dobson H. *et al.*, 1995): el cerebro (afectando la síntesis o secreción de GnRH) y la pituitaria (interfiriendo con la liberación de LH inducida por GnRH). Existiría un tercer nivel de acción en las gónadas alterando el efecto estimulador de las gonadotropinas sobre la secreción de esteroides sexuales (Rivier C. *et al.*, 1991; Tilbrook A. *et al.*, 2000). Sin embargo, el mayor impacto se cree que está dentro del cerebro o en la pituitaria (Moberg G., 1987) (Brann D. *et al.*, 1991, citados por Tilbrook A., *et al.*, 2000; Rivier C. *et al.*, 1991). Respaldando lo anterior, la mayoría de la evidencia sugiere que, aunque los estresores pueden causar pérdidas fetales en la mitad y final de la preñez, el mayor porcentaje de pérdidas reproductivas, inducidas por estrés, ocurren como resultado de la interferencia con la correcta función del eje HPG; problemas de concepción y pérdidas embrionarias tempranas las cuales resultan de una inapropiada exposición del óvulo a las gonadotropinas dentro del folículo (Staigmiller R. *et al.*, 1984).

7.1 EFECTOS EN HIPOTÁLAMO

Los glucocorticoides inhiben la secreción de gonadotropinas, sin embargo, existe evidencia que sugiere que es posible que los glucocorticoides no actúen solos y que otras hormonas del eje adrenal (tales como CRH y ACTH) puedan tener una influencia sobre la regulación del eje gonadal. Algunos estudios han implicado a la CRH directamente (a través de contactos sinápticos) o indirectamente (a través de la circulación) en la alteración de la función neuronal de la GnRH. En cualquier caso, los efectos del HPA sobre el HPG son inhibitorios (Moberg G., 1991; Rivier C. *et al.*, 1991; Handa R. *et al.*, 1994) (Rivier, C. *et al.*, 1984; Dubey *et al.*, 1985; MacLusky N. *et al.*, 1988 citados por Handa R. *et al.*, 1994).

Se han reportado efectos del estrés sobre la reproducción en ratas y monos que indican que la CRH inhibe la secreción de GnRH. Este efecto inhibitorio no ocurre en las células gonadotropas de la pituitaria sino directamente en el hipotálamo, probablemente vía neuronas opioides que se proyectan hacia las células neurosecretoras de GnRH. El efecto de la CRH parece ser independiente de los restantes componentes del eje adrenal ya que el péptido es igualmente efectivo en animales adrenalectomizados. Además, la influencia de la CRH en el HPG parece ser dependiente de la especie, como lo indican algunos estudios que muestran que en ratas la inyección intravenosa de CRH no afecta la actividad del eje HPG, mientras que en primates disminuye los niveles plasmáticos de LH (Rivier C. *et al.*, 1991) (Xiao E. *et al.*, 1989 citado por Rivier C. *et al.*, 1991) (Rivier C. *et al.*, 1984; Petraglia F. *et al.*, 1986, 1987; Olster D. *et al.*, 1987; McLusky N. *et al.*, 1988 citados por Moberg G., 1991).

7.2 EFECTOS EN HIPÓFISIS

Si una oveja tiene un desarrollo ovárico normal, primando la ovulación, determinadas prácticas de manejo relacionadas a estresores que ocurran antes de la expresión del comportamiento estral pueden bloquear este comportamiento, resultando en fallas del animal en el apareamiento y concepción (Ehnert K. *et al.*, 1991). Una restricción nutricional aguda tiene un efecto rápido y detrimental sobre el desarrollo folicular en vaquillonas al afectarse la secreción de FSH y LH (Mackey D. *et al.*, 2000). El estrés ha sido vinculado a una baja tasa de ovulación en la rata y en la oveja. En la rata, los corticosteroides adrenales tienen el potencial de bloquear la liberación preovulatoria de LH, actuando directamente sobre las células gonadotropas probablemente evitando que el estrógeno sensibilice las células de la pituitaria a la GnRH (Moberg G., 1987). También en vaquillonas lecheras el estrés inhibe el pico preovulatorio de LH (Doney J. *et al.*, 1973; McKay D. *et al.*, 1975; Stoebel D. *et al.*, 1982a citados por Matteri R. *et al.*, 1984).

7.2.1 Opioides

Debido a que la ACTH secretada durante una situación de estrés puede tener un efecto directo sobre la regulación de las células gonadotropas, existe la posibilidad de que los opioides secretados de la pituitaria, durante el estrés, puedan también influenciar la regulación gonadotrópica. La ACTH es sintetizada como parte de una larga prohormona, pro-opiomelanocortina (POMC). Además del péptido ACTH, POMC también da lugar a varios péptidos opioides biológicamente activos, incluyendo β -endorfina. Durante el estrés, estos opioides son co-secretados con ACTH dentro de la circulación. Debido a que las β -endorfinas tienen un efecto sobre el sistema nervioso central en la secreción de GnRH, durante el estrés podría directamente influenciar la regulación de gonadotropinas. Sin embargo, hasta el momento, no existe evidencia *in vivo* ni *in vitro* de tal efecto directo (Matteri R. *et al.*, 1985; Howlett T. *et al.*, 1986; Owens P. *et al.*, 1987; Petraglia F. *et al.*, 1987; Malven P., 1987; Smith A. *et al.*, 1988 citados por Moberg G., 1991). En ratas, es generalmente aceptado que los péptidos opioides endógenos ejercen una influencia inhibitoria tónica sobre el eje HPG, y que los mismos actúan directamente sobre las neuronas GnRH en el hipotálamo a través de receptores específicos (Drouva S. *et al.*, 1981; Rasmussen D. *et al.*, 1989 citados por Rivier C. *et al.*, 1991).

7.2.2 ACTH

La administración de ACTH para provocar la activación adrenal es utilizada frecuentemente ya que presenta ciertas ventajas. Primero, la ACTH estimula la corteza adrenal para secretar todos los esteroides gonadales que son liberados durante el estrés, no sólo los corticosteroides. En segundo lugar, la cantidad de corticosteroides secretados en respuesta a una única administración de ACTH puede ser limitada por la capacidad biológica de la corteza adrenal, evitando que ocurra un efecto farmacológico que podría presentarse cuando se administran excesivas cantidades de corticosteroides exógenos. Esta aproximación se ha basado en la asunción de que la ACTH no tiene un efecto directo e independiente sobre las gonadotropinas y que cualquier efecto observado luego de su administración puede ser atribuido a la secreción

resultante de glucocorticoides. Sin embargo, los resultados de un número limitado de estudios cuestionan tal asunción y sugieren fuertemente que la ACTH tendría un efecto independiente sobre el eje gonadal diferente de la liberación adrenal de esteroides (Moberg, G., 1987, 1991).

En vacas, la administración de ACTH bloquea la liberación preovulatoria de LH así como también disminuye las concentraciones de LH circulantes, pero la infusión de cortisol sólo bloquea el pico preovulatorio y no tiene efecto sobre la secreción basal de LH. En el mismo sentido, la ACTH exógena en vacas es más efectiva que el cortisol en suprimir la respuesta de LH a GnRH. Una explicación para estos resultados es que las diferencias entre el tratamiento con ACTH y glucocorticoides pueden ser atribuidas a la estimulación de ACTH en la secreción de esteroides adrenales diferentes de los glucocorticoides, tales como progesterona o testosterona. Las concentraciones de cortisol y progesterona plasmáticas se incrementan luego de la administración i.v. de ACTH a vacas lecheras o de carne. Lo mismo se ha observado en ovejas ovariectomizadas y capones (Van Lier E. *et al.*, 1998). En ratas y en cerdos, la ACTH conduce a la elevación en el plasma de corticosterona y progesterona (Matteri R. *et al.*, 1984) (Feder H. *et al.*, 1969; Gwazdauskas F. *et al.*, 1972; Li P., 1983a; Moberg G. *et al.*, 1981; Moberg G., 1982; Dorough K. *et al.*, 1981 citados por De Silva M. *et al.*, 1983). Tanto la progesterona como la testosterona son importantes en la regulación del eje gonadal, pero no hay evidencia convincente de que tengan algún efecto significativo sobre la función gonadotropa bajo situaciones de estrés (Moberg G., 1987) o bajo condiciones experimentales (Van Lier E. *et al.*, 1999). La ACTH administrada a carneros adrenalectomizados puede evitar que la GnRH exógena estimule la secreción de LH en ausencia de cualquier esteroide adrenal (Fuquay J. *et al.*, 1983). Tratamientos prolongados con ACTH o glucocorticoides han mostrado suprimir las concentraciones plasmáticas de LH y testosterona en machos, con efectos más marcados cuando los carneros se encontraban en la estación reproductiva que cuando estaban fuera de ella. Se sugirió que la ACTH ejerce estas acciones supresivas sobre la LH por medio de efectos a nivel de pituitaria. (Mohamed F. *et al.*, 1988a) (Liptrap, R. *et al.*, 1975; Thibier, M. *et al.*, 1976; Cox, J. *et al.*, 1979, citados por Mohamed, F. *et al.*, 1988b). El efecto supresivo de la ACTH en la respuesta de la pituitaria frente a GnRH exógena, confirma la acción de la ACTH sobre la pituitaria y no sobre el hipotálamo (Cox J. *et al.*, 1988). Un estudio subsiguiente, *in vitro*, con tejido de pituitaria confirmó que la ACTH es capaz de alterar la función gonadotropa (Matteri R. *et al.*, 1986 citado por Moberg G., 1991). En este sistema, la ACTH sintética tiene un efecto bifásico, estimulando la secreción basal de gonadotropinas y al mismo tiempo disminuyendo la cantidad de gonadotropinas liberadas en respuesta a un posterior desafío con GnRH. El significado fisiológico de una acción directa de la ACTH sobre la función gonadotropa permanece sin aclarar porque no ha sido demostrado que la ACTH liberada en respuesta a CRH exógena altere la secreción de gonadotropinas (Moberg G., 1987). En el toro la administración de ACTH redujo la secreción basal de LH, disminuyó la pulsatilidad de LH en carneros castrados (Van Lier E. *et al.*, 1999), inhibió el pico preovulatorio de LH en vacas lecheras y en cerdas, y suprimió la respuesta de LH a GnRH en vaquillonas de ganado lechero y en carneros (Fuquay J. *et al.*, 1983). Asimismo, se ha demostrado que el estrés comportamental causa una reducción similar en la sensibilidad de la pituitaria a la GnRH (Johnson B. *et al.*, 1982; Barb C. *et al.*, 1982; Stoebel D. *et al.*, 1982; Matteri R. *et al.*, 1982 citados por Matteri R. *et al.*, 1984).

Se sugiere que el estrés es capaz de inducir un período refractario relativamente largo de secreción de gonadotropinas. En un estudio, las inyecciones de ACTH 11, 6, 3 o 1.5 h antes de la

administración de GnRH, fueron todas efectivas en reducir la subsiguiente respuesta en LH. Dado que esta supresión de LH inducida por ACTH también ocurre en la oveja, pueden producirse reducciones significativas en fertilidad si el estrés es experimentado durante tal período previo al pico preovulatorio de LH (Matteri R. *et al.*, 1984) (Barb C. *et al.*, 1982; Matteri R. *et al.*, 1982; Stoebel D. *et al.*, 1982b citados por Matteri R. *et al.*, 1984). Parecería que la elevación prolongada de glucocorticoides no es un prerrequisito para inducir el decremento en la sensibilidad a la GnRH, ya que el uso de ACTH sintética fue efectivo en reducir la respuesta a GnRH de la pituitaria, aún cuando la respuesta del corticosteroide fue de corta vida (Matteri R. *et al.*, 1984).

7.2.3 Cortisol

La respuesta de la adrenal al estrés es tan ampliamente reconocida, que los incrementos en las concentraciones circulantes de glucocorticoides adrenales son utilizados como un indicador de estrés (Moberg G., 1985a citado por Moberg G., 1991). La correlación entre la secreción disminuida de gonadotropinas y las elevadas concentraciones plasmáticas de corticosteroides durante el estrés, indican que los esteroides adrenales deben tener un efecto sobre la secreción de gonadotropinas. Existe considerable evidencia tanto *in vivo* como *in vitro* que, excepto en los monos, los glucocorticoides pueden actuar directamente en las células gonadotropas de la pituitaria de animales domésticos para reducir la secreción de gonadotropinas, especialmente LH. La acción primaria de los glucocorticoides sobre las gonadotropinas es bloquear la capacidad de la GnRH de estimular la secreción de LH. Si existe o no un efecto comparable de los glucocorticoides en la liberación basal de LH y FSH, es controversial y los resultados parecen ser dependientes de la especie, sexo y duración del tratamiento con glucocorticoides (Moberg, G., 1987). En algunas especies como monos y suinos, las concentraciones plasmáticas de glucocorticoides aparentemente necesitan estar altas por un período de tiempo extendido para afectar la reproducción (Tilbrook A. *et al.*, 2000). Sólo la exposición prolongada de la pituitaria a los glucocorticoides parece tener un efecto sobre la secreción basal de LH, sugiriendo que la relativamente breve elevación de éstos que ocurre durante una situación de estrés, probablemente no sea suficiente para afectar dicha secreción de LH. Durante la mayoría de las situaciones de estrés, las concentraciones circulantes de glucocorticoides se elevan por pocas horas (Padmanabhan V. *et al.*, 1983; Suter D. *et al.*, 1985 citados por Moberg G., 1991).

En ovinos, los estresores relacionados al manejo tales como, la sujeción y el confinamiento, elevan las concentraciones plasmáticas de glucocorticoides y al mismo tiempo disminuyen la respuesta de la pituitaria a GnRH exógena (Matteri R. *et al.*, 1984) (Moberg G., 1985 citado por Moberg G., 1991). Sin embargo, el rol de los glucocorticoides en la supresión de GnRH y LH en los ovinos sigue siendo un tema de debate ya que hay reportes contradictorios (ver sección 7.4).

La GnRH estimula la secreción de LH a través de dos mecanismos diferentes: activación de la proteinquinasa C, y por movilización y metabolismo del ácido araquidónico. Los mecanismos dependientes de proteinquinasa C están involucrados con la prolongación de la liberación de LH, mientras que el rol de ácido araquidónico y sus metabolitos es inducir el inicio rápido de la secreción de LH que se observa luego de la estimulación con GnRH. La rápida secreción de LH es el tipo de respuesta que se suprime por el tratamiento con glucocorticoides. En ovinos, el cortisol reduce la capacidad de las células gonadotropas de secretar LH en respuesta a un desafío

con GnRH, evitando que el péptido induzca la movilización de ácido araquidónico y su metabolismo, y por ende la secreción rápida de LH (Moberg G., 1991; Nangalama A. *et al.*, 1991) (Chang J. *et al.*, 1987; Huckle W. *et al.*, 1988; Noar Z. *et al.*, 1981 citados por Moberg G., 1991).

Otro mecanismo por el cual los glucocorticoides pueden alterar la función gonadotrópica, es modificando la retroalimentación de los esteroides gonadales en las células gonadotropas. Los esteroides gonadales tienen dos efectos diferentes sobre la regulación gonadotrópica: 1) pueden inhibir la secreción gonadotrópica por la clásica retroalimentación negativa (hembra: progesterona y estrógenos; macho: testosterona y estrógenos); y 2) en la hembra, el estrógeno sensibiliza la célula gonadotropa para la liberación preovulatoria de LH (Moberg G., 1991).

En la rata, los glucocorticoides parecen impedir que el estrógeno sensibilice las células gonadotropas a GnRH, esto previene la liberación preovulatoria de LH. Tal mecanismo de acción podría explicar cómo los glucocorticoides pueden bloquear la liberación preovulatoria de LH, pero tienen solamente un efecto marginal sobre la síntesis y la secreción basal de LH. Aunque este mecanismo de acción es atractivo, aún no se ha determinado en animales domésticos, si los glucocorticoides alteran la sensibilización por estrógenos de la pituitaria, especialmente porque un estudio relacionado cuestiona tales efectos en ovinos. También se ha visto en los monos que el tratamiento con glucocorticoides no previene la estimulación por estrógeno de la secreción de LH. En contraste a estos hallazgos, Li P. (1987, citado por Moberg G., 1991), encontró que el cortisol inhibe la estimulación por estrógenos de la secreción de LH en cultivos de células de la pituitaria de porcinos, pero esto ocurrió, nuevamente, luego de un tratamiento prolongado con el esteroide adrenal (Baldwin D., 1979; Moberg G. *et al.*, 1981; Kamel F. *et al.*, 1987; O'Byrne K. *et al.*, 1988; Hayashi K. *et al.*, 1990 citados por Moberg G., 1991).

7.3 EFECTOS EN GÓNADAS

La mayor influencia del eje adrenal en la regulación de las gónadas es a través de la modulación de la secreción de gonadotropinas. Independientemente de esta influencia, existe acción directa de los glucocorticoides sobre las gónadas, especialmente en la función testicular (Moberg G., 1991). Hay evidencia considerable de que un tratamiento prolongado tanto con ACTH como con glucocorticoides, suprime la testosterona plasmática en toros y padrillos equinos. En contraste, tratamientos de corta duración con ACTH se caracterizaron por incrementos en las concentraciones plasmáticas de testosterona en verracos y padrillos equinos. Se ha sugerido que estos efectos de la ACTH sobre los testículos son mediados por cortisol (Doerr P. *et al.*, 1975; Liptrap R. *et al.*, 1975; Thibier M. *et al.*, 1976; Chantraprateep P. *et al.*, 1978; Cox J. *et al.*, 1979; Welsh T. *et al.*, 1979 citados por Mohamed F. *et al.*, 1988a). En toros, hay una relación inversa entre las concentraciones plasmáticas de glucocorticoides y la cantidad de testosterona secretada en respuesta a LH exógena. Asimismo, en suinos el tratamiento prolongado con ACTH suprime la producción de testosterona aunque la respuesta de corto plazo a los glucocorticoides en los verracos puede incrementar la liberación de testosterona. La observación que el estrés disminuye los niveles plasmáticos de testosterona, ha generado

discusiones tales como, si los cambios son causados por disminución en la secreción de LH o por efecto directo de los péptidos derivados de POMC, corticosteroides, y/o CRH a nivel gonadal. Los receptores y ARNm de CRH y los péptidos derivados de POMC se encuentran en gónadas de roedores, las cuales tienen también receptores para corticosteroides adrenales. En presencia de las glándulas adrenales, la prolongada infusión de ACTH a ratas machos, reduce los niveles basales de testosterona a través de la alteración en la sensibilidad testicular a la LH. La capacidad de los corticosteroides de regular las funciones gonadales directamente es generalmente aceptada. La CRH también está presente en los testículos de ratas, donde ejerce efectos inhibitorios en la esteroidogénesis. La observación de que el estrés incrementa la biosíntesis de CRH en el cerebro sugiere la posibilidad de que la producción testicular de CRH pueda ser estimulada en forma similar, y que este péptido pueda jugar un rol fisiológico en mediar la inhibición inducida por estrés de la producción de esteroides sexuales (Evain D. *et al.*, 1976; Saez J., 1977; Bambino T. *et al.*, 1981; Welsh T. *et al.*, 1982; Collu R. *et al.*, 1984; Valenca M. *et al.*, 1986; Bardin C. *et al.*, 1987; Audhya T. *et al.*, 1987, 1989; Ulisse S. *et al.*, 1989; Mann D. *et al.*, 1987, 1990; Fabbri A. *et al.*, 1990; Imaki T. *et al.*, 1991 citados por Rivier C. *et al.*, 1991). A pesar de la respuesta testicular al efecto del eje adrenal, actualmente no hay evidencia de que dicha respuesta a los glucocorticoides, durante el estrés, tenga algún significado en el macho (Liptrap R. *et al.*, 1975; Welsh T. *et al.*, 1979; Pitzel L. *et al.*, 1979; Juniewicz P. *et al.*, 1981; Knight J. *et al.*, 1982 citados por Moberg G., 1991).

En vacas, la administración de ACTH provocó un decremento en la secreción de estrógeno y LH y un incremento en la concentración de progesterona. Es sabido que la corteza adrenal produce progesterona en el ganado. Por lo tanto, se presume que las vacas bajo estrés pueden incrementar la progesterona adrenal, deprimiendo la acción del estrógeno y suprimiendo la expresión del estro (Dobson H. *et al.*, 2001) (Stoebel D. *et al.*, 1982; Wagner W. *et al.*, 1972 citados por Yoshida Ch. *et al.*, 2005).

7.4 EFECTOS DIFERENTES EN CARNEROS Y OVEJAS

Existen diferencias pronunciadas entre machos y hembras en la respuesta del eje HPA al estrés. Las primeras investigaciones que arribaron a esta conclusión fueron conducidas en roedores. Las hembras secretan niveles más elevados de corticosterona que los machos (Kitay J., 1961; Handa R. *et al.*, 1994) (Critchlow V. *et al.*, 1963 citado por Burgess L. *et al.*, 1992). En ovinos, estas diferencias también se han encontrado, con las hembras secretando más cortisol que los machos. Por lo expresado anteriormente, respecto a los efectos del estrés sobre la reproducción y unido a esta respuesta diferencial de acuerdo al sexo, no es difícil comprender entonces que las diferencias se manifiestan también en términos reproductivos. Diferentes estresores pueden estimular diferentes sistemas, siendo algunos inhibitorios y otros estimulatorios con respecto a la reproducción (Tilbrook A. *et al.*, 2000).

Los mecanismos por los cuales el estrés impacta sobre la reproducción también pueden ser diferentes entre sexos y pueden estar influenciados por la predominancia de la secreción de esteroides sexuales particulares, en momentos particulares. De hecho, hay claras diferencias entre carneros y ovejas en los mecanismos por los cuales el estrés suprime la secreción de LH, y

los esteroides sexuales influyen estos mecanismos. En un estudio en el que se trabajó con ovinos gonadectomizados de ambos sexos, que fueron sometidos a un estrés por aislamiento/sujeción y que recibieron reemplazo con esteroides sexuales, la secreción de LH fue suprimida en todos los animales. Los parámetros de secreción de LH que fueron afectados, difirieron entre carneros y ovejas gonadectomizados, y entre los ovinos a los que se les suministraron tratamientos con esteroides sexuales. Específicamente, el efecto del estresor estudiado sobre la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH difirió entre grupos. Los decrementos en la frecuencia de pulsos de LH durante el aislamiento/sujeción indican que la actividad de las neuronas GnRH en el hipotálamo fue inhibida por el estresor, porque tanto en los carneros como en las ovejas, la secreción de GnRH es pulsátil y existe un alto grado de concordancia entre pulsos de GnRH y LH. Los cambios en la amplitud de los pulsos de LH, sin embargo, podrían indicar acciones del estrés tanto sobre el hipotálamo, para disminuir la amplitud de pulsos de GnRH, como sobre la pituitaria para reducir la respuesta de la misma a las acciones de la GnRH. (Clarke I. *et al.*, 1982,1987; Caraty A. *et al.*, 1988; Jackson G. *et al.* 1991; Tilbrook A. *et al.* 1991 citados por Tilbrook A. *et al.*, 1999).

En cuanto a la influencia que ejercen los esteroides sexuales, en el experimento de Tilbrook A. *et al.* (1999) se administraron testosterona, estradiol, progesterona y estradiol + progesterona, observándose diferencias entre los tratamientos. Machos y hembras tratados con testosterona y progesterona, respectivamente, mostraron una reducción en la secreción de GnRH. En hembras tratadas tanto con estradiol como con estradiol + progesterona, la secreción de GnRH se redujo. Los resultados indican que los andrógenos en el macho y el estradiol y la progesterona en la hembra, así como el sexo, influenciaron el grado en el cual el estrés por aislamiento/sujeción inhibió la actividad de las neuronas GnRH en el hipotálamo, y/o las acciones de GnRH sobre la pituitaria para estimular la liberación de LH. En carneros, los andrógenos influyen el grado en que el estrés por aislamiento/sujeción invoca mecanismos que actúan en el hipotálamo o en la pituitaria para inhibir la secreción de LH. En ovejas ovariectomizadas no tratadas con esteroides, la frecuencia pero no la amplitud de pulsos de LH fue inhibida por estrés por aislamiento/sujeción, sugiriendo que el efecto predominante de este estresor estuvo a nivel de las neuronas GnRH en estos animales (Tilbrook A. *et al.*, 1999).

En ovejas, el estradiol es capaz de influenciar las acciones del estrés sobre la actividad de neuronas GnRH y puede, también, jugar un rol al afectar la respuesta de la pituitaria a las acciones de la GnRH. La progesterona, por otro lado, parece mediar los efectos del estrés sobre la secreción de LH a través de acciones directas sobre el cerebro. El tratamiento combinado de estradiol y progesterona resultó en una reducción en la amplitud pero no en la frecuencia del pulso de LH durante el estrés por aislamiento/sujeción. Las disminuciones en la amplitud del pulso de LH en ovejas ovariectomizadas tratadas con estradiol o estradiol + progesterona, representan cambios en la respuesta de la pituitaria a la GnRH (Tilbrook A. *et al.*, 1999) (ver figura 6) aunque ha sido reportado que el aislamiento y la sujeción no afectaron la respuesta en LH a la GnRH en ovejas en anestro tratadas con estradiol (Dobson H. *et al.*, 1995). Es posible que estos decrementos en la amplitud del pulso de LH durante el aislamiento/sujeción puedan deberse a efectos hipotalámicos del estrés, ya que ha sido recientemente encontrado que el estrés en ovejas puede tener diferentes efectos sobre el patrón de secreción de GnRH y LH (Tilbrook A. *et al.*, 1999).

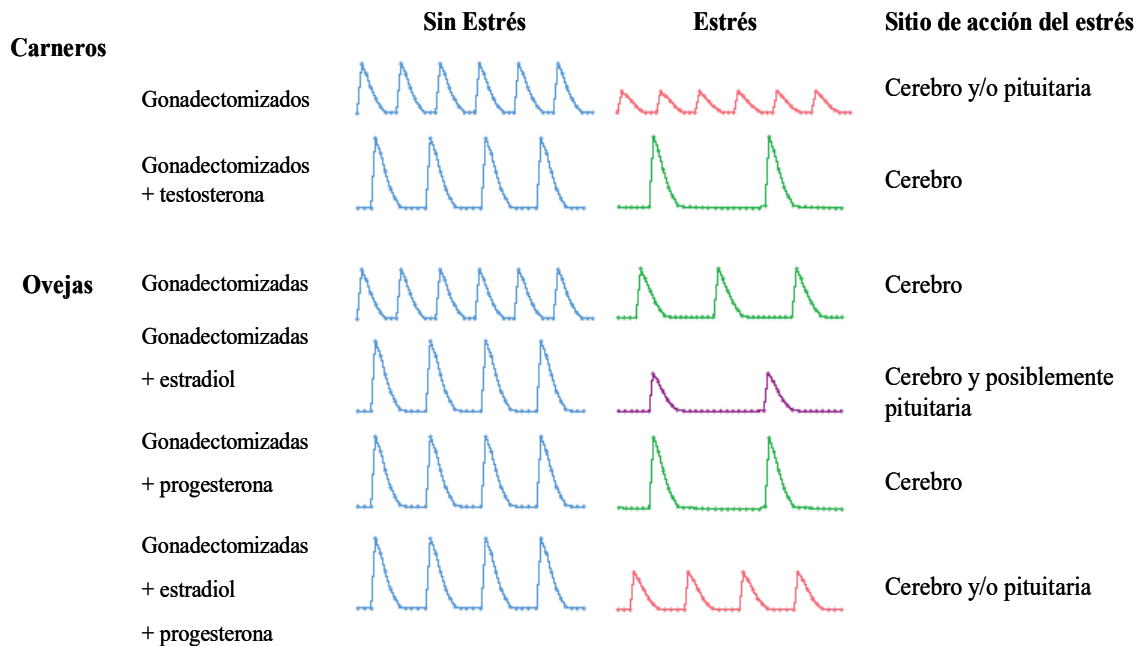


Figura 6. Representación esquemática de los efectos de 4 h de estrés por aislamiento y restricción sobre la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH en ovinos gonadectomizados con diferentes combinaciones de esteroides sexuales. Adaptado de Tilbrook A. *et al.*, (1999).

Aunque los esteroides sexuales pueden influenciar el efecto del estrés por aislamiento/sujeción sobre la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH, hubo una diferencia sexual en el impacto del estresor sobre la secreción de LH, que fue independiente de las acciones de los esteroides sexuales. En los carneros gonadectomizados que no fueron tratados con esteroides (carneros control) hubo una disminución en la amplitud pero no en la frecuencia de los pulsos de LH durante el estrés, mientras que en las ovejas control, fue inhibida la frecuencia pero no la amplitud de los pulsos. Adicionalmente, cuando se inyectó GnRH, el estrés por aislamiento/sujeción disminuyó la respuesta de la pituitaria a la GnRH en carneros gonadectomizados pero no en ovejas gonadectomizadas (Tilbrook A. *et al.*, 1999). Posteriormente, Turner A. *et al.* (2000a) encontraron que la secreción de LH fue suprimida por estrés por aislamiento y sujeción en animales gonadectomizados pero no hubo tal supresión en animales intactos y no hubo diferencia entre sexos. Ellos explicaron la falta de efecto en animales enteros por una secreción naturalmente baja de LH de la raza con la que trabajaron (Romney Marsh) en el momento de la estación de cría en el cual se condujo el experimento; lo que podría enmascarar los resultados. Además, factores gonadales de los animales enteros pueden haber interactuado con las rutas de estrés activadas durante el aislamiento/sujeción para prevenir la supresión de LH que fue observada en animales gonadectomizados.

Los resultados del estudio de Tilbrook A. *et al.* (1999), sugieren que el estrés inhibe la secreción de LH por diferentes mecanismos en machos y hembras, y estos mecanismos involucran componentes dependientes y no dependientes de esteroides. La ACTH es capaz de suprimir la secreción de LH en carneros castrados (Van Lier E. *et al.*, 1999). Se inhibió la respuesta de LH a GnRH tanto en carneros como en hembras ovariectomizadas tratados con ACTH, y esto es similar a los hallazgos reportados anteriormente (Tilbrook A. *et al.* 1999). Además, estos efectos de ACTH probablemente ocurran vía mecanismos que no involucran la activación de las glándulas adrenales (Matteri R. *et al.*, 1984; Fuquay J. *et al.*, 1983; Dobson H. *et al.*, 1988). A pesar de la capacidad de la ACTH de inhibir la respuesta de LH a la GnRH en ovinos, esta hormona no necesariamente es un mediador de significancia en los efectos del aislamiento/sujeción sobre la secreción de LH (Tilbrook A. *et al.*, 1999).

Aunque algunos estudios han encontrado efectos inhibitorios de los glucocorticoides sobre la reproducción en ovinos, la mayoría han indicado que ellos no son los mediadores predominantes en la supresión de la secreción de LH inducida por estrés. A pesar del mayor incremento en cortisol en hembras durante un estrés por aislamiento y sujeción, no hubo diferencias entre los sexos en la supresión de la secreción de LH debido a este estresor. Si los glucocorticoides estuvieran totalmente involucrados en la supresión de la secreción de LH, era esperable encontrar diferencias entre sexos bajo estas circunstancias (Turner A. *et al.*, 2000a). Esto es consistente con las conclusiones de Tilbrook A. *et al.* (1999) y estudios conducidos en otras especies (Tilbrook A. *et al.* 2000). El tratamiento de ovejas con dexametasona (glucocorticoide sintético) no redujo la secreción de LH ni inhibió la respuesta de LH a GnRH. Tampoco el tratamiento con cortisol o dexametasona afectaron la generación de picos de LH en hembras (Phillips D. *et al.*, 1990 citado por Tilbrook A., 1999). Por su parte, en carneros tratados con cortisol no se afectó la respuesta de LH a GnRH (Fuquay J. *et al.*, 1983). La infusión de cortisol solo, en carneros castrados no afectó la frecuencia o amplitud de los pulsos de LH. No obstante, en carneros castrados, la combinación de cortisol y estradiol disminuyó la frecuencia de pulsos de LH. La administración de estradiol en carneros castrados también incrementó las concentraciones tisulares de receptores de GnRH y ARNm de receptores de GnRH, mientras que el cortisol redujo estas respuestas (Adams T. *et al.*, 1999) (Daley C. *et al.*, 1999 citado por Tilbrook A. *et al.*, 2000). Los autores de estos estudios concluyeron que el cortisol es capaz de aumentar los efectos de retroalimentación negativa del estradiol, y de esta manera reduce la expresión de receptores de GnRH por estrógenos. No obstante, sus resultados también indican que el cortisol solo, no es el mayor mediador de estos efectos.

8 DIFERENCIAS SEXUALES EN RESPUESTA AL ESTRÉS

El estrés afecta en forma diferente la reproducción de hembras y machos de varias especies. En roedores las hembras muestran niveles más elevados de corticosterona en respuesta al estrés que los machos, mientras que en primates y ovinos el mismo fenómeno ocurre con los niveles de cortisol. Estas diferencias en la secreción de glucocorticoides reflejan diferencias en el funcionamiento del eje HPA. Varios autores afirman que así como el eje HPA afecta el eje HPG

frente un estrés, el eje HPG también tiene efecto sobre el primero (Kitay J., 1961; Nowak K. *et al.*, 1995; Viau V. *et al.*, 1991; Xiao E. *et al.*, 1994; Handa R. *et al.*, 1994).

Turner A., *et al.* (2002a), plantearon la importancia de dilucidar las diferencias sexuales en la actividad del eje HPA en animales enteros porque la secreción de hormonas gonadales ocurre en forma fisiológica (y no farmacológica como sucede con los reemplazos), y porque pueden existir factores no esteroideos de las gónadas que influyen el eje HPA. Además, al comparar la actividad del eje entre sexos, es necesario activar este eje utilizando diferentes estresores porque éstos activan diferentes rutas (Rivier C. *et al.*, 1991) y/o diferentes estresores pueden activar la misma ruta de forma distinta. En ese sentido, los investigadores trabajaron con animales enteros y gonadectomizados, encontrando que las ovejas tuvieron mayor respuesta en cortisol que los carneros frente a estresores físicos/sicológicos como el asilamiento/sujeción, y éstos presentaron mayor respuesta en cortisol que las ovejas frente a un estrés metabólico como la hipoglicemia inducida por insulina (Turner A., *et al.* 2002a). La mayor respuesta en cortisol de las ovejas a un estrés adicional audiovisual, es similar a resultados de la investigación previa en la que se impuso el estresor físico/psicológico (asilamiento/sujeción) (Turner A. *et al.*, 2002b). Colectivamente, estos pocos ejemplos pueden sugerir un patrón donde los estresores metabólicos generan mayores respuestas del eje HPA en carneros, y los estresores físicos y sicológicos mayores respuestas en ovejas.

8.1 EFECTO DEL EJE GONADAL EN EL EJE ADRENAL EN ROEDORES

En roedores de ambos sexos, la administración de estrógenos incrementa la secreción basal de corticosterona así como la respuesta en ACTH y corticosterona a estresores físicos y fisiológicos (Burgess L. *et al.*, 1992; Handa R. *et al.*, 1994). El efecto del estrógeno sobre la secreción de ACTH se manifiesta como una prolongación de la secreción sugiriendo que un mecanismo por el cual el estrógeno aumenta la secreción de hormonas del estrés, es alterando la retroalimentación negativa mediada por receptores de glucocorticoides (GR) (Burgess L. *et al.*, 1992, 1993; Young E., 1995). Consistentemente con esta hipótesis, se detectaron alteraciones en la capacidad de los glucocorticoides de regular la secreción de la corticosterona por retroalimentación y de autorregular los niveles de ARNm de GR cuando el estrógeno está presente. El tratamiento con estrógeno disminuye los niveles estables de ARNm de receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides en tejidos neuroendócrinos involucrados en la regulación de la secreción ACTH y de corticosterona. Estos resultados son consistentes con estudios previos que han mostrado que la ovariectomía incrementa los niveles de ARNm de GR en la adenohipófisis de las ratas y este incremento no ocurre cuando se tratan con estrógeno. La ovariectomía incrementa los niveles de ARNm de GR en el hipotálamo de las ratas. La regulación por retroalimentación negativa del eje HPA está mediada predominantemente a través de la unión de la corticosterona a receptores de corticosterona intracelulares ubicados en el hipocampo, hipotálamo, y adenohipófisis (Keller-Wood M. *et al.*, 1984; McEwen B. *et al.*, 1986; Peiffer A. *et al.*, 1987; Jacobson L. *et al.*, 1991 citados por Burgess L. *et al.*, 1993).

8.1.1 Estradiol

Cuando los niveles de estrógenos circulantes son altos, como en el pro-estro, los niveles de corticosterona son mayores y, en forma similar, la respuesta del eje HPA a un estresor es mayor (Viau V. *et al.*, 1991) (Raps D. *et al.*, 1971 citado por Handa R. *et al.*, 1994). Además de los cambios en la secreción hormonal, otros estudios han demostrado también cambios en los niveles de CRH y en ARNm de CRH dentro de núcleo paraventricular (PVN) en presencia de estrógeno (Haas D. *et al.*, 1989; Bohler H. *et al.*, 1990 citados por Handa R. *et al.*, 1994). Esta información señala a las neuronas CRH del PVN como el sitio en el cual el estrógeno induce alteraciones en la función del HPA. Si estos cambios en la CRH hipotalámica son respuestas primarias al estrógeno, o respuestas secundarias a cambios en GR por estrógenos, permanece sin ser determinado (Handa R. *et al.*, 1994). Además de estos efectos del estrógeno mediados centralmente, se ha reportado que el estrógeno puede incrementar la producción de corticosterona por la glándula adrenal e incrementar la sensibilidad de la adenohipófisis a extractos hipotalámicos conteniendo CRH. Se ha reportado que la expresión o actividad de un número de enzimas esteroideogénicas en la adrenal es mayor en hembras que en machos, o estimulada por estrógenos e inhibida por andrógenos (Perry J. *et al.*, 1992; El-Migdadi *et al.*, 1995; Nowak K. *et al.*, 1995) (Simpson E. *et al.*, 1988; Belanger B. *et al.* 1991; Gallant S. *et al.* 1991; Issacson W. *et al.* 1993 citados por Canny B. *et al.*, 1999). La producción de corticosterona en las células adrenocorticales de ratas ovariectomizadas se incrementó luego de administrar benzoato de estradiol (Lo M-J. *et al.*, 2000). Otro indicio que sugiere un efecto directo del estradiol en la corteza adrenal proviene de un estudio en ratas realizado por Atkinson H. *et al.* (1997), quienes encontraron diferencias en los niveles basales de corticosterona (no acompañados por diferencias en los niveles basales de ACTH) en machos y hembras en diferentes etapas del ciclo estral. De todos estos estudios se infiere que el estrógeno puede modular el eje HPA a varios niveles en roedores.

8.1.2 Testosterona

Algunos reportes acerca del efecto de la testosterona sobre la liberación de esteroides adrenales en respuesta al estrés, demostraron que la castración prepuberal de ratas macho puede incrementar la respuesta en corticosterona a estresores físicos (Gaskin J. *et al.*, 1971 citado por Handa R. *et al.*, 1994). Una única inyección de testosterona en ratas macho castradas fue efectiva en restablecer la respuesta en corticosterona que muestran los machos intactos. Esta información sugiere que la testosterona normalmente actúa para inhibir la respuesta del eje HPA a perturbaciones ambientales. En el mismo sentido, Handa R. *et al.* (1994), mostraron que la castración de machos adultos incrementa la ACTH así como la respuesta en corticosterona a estresores físicos y fisiológicos en comparación a machos intactos. Machos enteros y castrados pero androgenizados, mostraron la misma respuesta al estrés. La castración de ratas macho incrementa el contenido de CRH hipotalámico y el número de células CRH-inmunoreactivas en el PVN al eliminar la inhibición por andrógenos (Bingaman E. *et al.*, 1994). Esta mayor respuesta del eje HPA al estrés en machos castrados no es acompañada por cambios en la sensibilidad de la adenohipófisis a la CRH, sugiriendo un sitio central de acción (Handa R. *et al.*, 1994). En las ratas, la respuesta del HPA al estrés parece ser sensible a variaciones en los niveles de testosterona circulante, ya que en los niveles de ACTH y corticosterona pueden observarse

correlaciones negativas con niveles de testosterona en machos intactos y castrados con reemplazo de testosterona en respuesta al estrés (Viau V. *et al.*, 1996). Efectos independientes e interactivos de la testosterona y corticosterona en la regulación del eje HPA en ratas fueron demostrados por Viau V. *et al.* (1999), los que probablemente ocurran cascada-arriba del PVN.

8.2 EFECTO DEL EJE GONADAL EN EL EJE ADRENAL EN OVINOS

En ovinos, Van Lier E. *et al.*, (2003a) encontraron que también en esta especie la respuesta de la glándula adrenal a la administración de ACTH exógena –en términos de secreción de cortisol– fue afectada por el sexo y estado gonadal, tanto en la estación reproductiva como la no reproductiva. Esta estimulación directa de la corteza adrenal por la ACTH exógena sugiere que las diferencias sexuales se localizan en la corteza adrenal y probablemente están relacionadas con los esteroides sexuales. En ambas estaciones luego de administrar ACTH las hembras mostraron mayores concentraciones en niveles de cortisol que los machos, sin embargo la diferencia pareció menos marcada en la estación no-reproductiva. La respuesta en cortisol en las ovejas no fue afectada por la estación mientras que en los carneros se registró menor respuesta en la estación reproductiva. La gonadectomía redujo la respuesta respecto a las hembras intactas pero no tuvo efecto entre los carneros. Varios reportes mencionan la exitosa eliminación de diferencias sexuales por gonadectomía a nivel adrenal en roedores (ratas: El-Migdadi F. *et al.*, 1995; ratones: Perry J. *et al.*, 1992). Los carneros enteros tuvieron menores niveles de cortisol comparados con las hembras enteras, y los niveles de cortisol de animales gonadectomizados de ambos sexos fueron intermedios entre los de los grupos de animales enteros (Van Lier E. *et al.* 2003a). Es importante tomar en consideración los efectos estacionales en el análisis de las diferencias sexuales en la secreción de cortisol. La administración de ACTH ocasionó niveles menores de cortisol en carneros con pulsos de testosterona en estación reproductiva y en aquellos que presentaron pulsos en la estación no reproductiva. Esta información sugiere que los efectos de los andrógenos podrían tener lugar en un sitio no central del eje HPA. La administración de ACTH en toros luego del desarrollo de la pubertad resulta en decrementos de la secreción de cortisol comparado con los novillos, sugiriendo una modulación directa de la esteroidogénesis por los andrógenos en la corteza adrenal (Verkerk G. *et al.*, 1997).

En su trabajo, Canny B. *et al.* (1999) encontraron que la secreción basal de ACTH fue mayor en los cultivos de células de la pituitaria anterior de hembras. Con respecto al incremento relativo en la producción de cortisol en respuesta a ACTH sintética, éste fue mayor en cultivos de células adrenales de hembras que de machos, y no hubo efectos aparentes de la gonadectomía. La producción de cortisol *in vitro* por células adrenocorticales provenientes de hembras fue mayor en células de ovejas en preñez tardía que en las no preñadas (Glickman J. *et al.*, 1980 citado por Canny B., 1999), diferencia que podría explicarse debido al ambiente relativamente estrogénico de la preñez tardía. Estas diferencias entre sexos en la actividad del eje HPA *in vitro* encontradas por Canny B. *et al.*, no se observaron *in vivo* por Tilbrook A. *et al.* (1999) en ovinos macho y hembra gonadectomizados, que recibieron varias combinaciones de esteroides sexuales. Los autores no incluyeron animales enteros en su experimento. De todas maneras se puede argumentar que los esteroides sexuales de reemplazo que imitan el ambiente hormonal de animales enteros deberían ser suficientes para obtener las supuestas diferencias

sexuales. Sin embargo, tales tratamientos de reemplazo de hormonas en general no siguen los patrones naturales de secreción, lo cual es un problema cuando se trabaja con este tipo de modelos. El reemplazo hormonal puede llevar a concentraciones no fisiológicas de una hormona en particular, la cual posiblemente puede interferir con las dinámicas de receptores de las diferentes hormonas y de este modo enmascarar sus efectos (Van Lier E. *et al.*, 2003a).

Considerando lo señalado para roedores respecto a la participación de los estrógenos en la regulación de la corteza adrenal (Kitay J., 1963a,b) y que sus receptores (RE) se hallaron en la glándula adrenal tanto en roedores como en primates (Cutler G. *et al.*, 1978; Calandra R. *et al.*, 1980; Hirst J. *et al.*, 1992), se sugiere que las diferencias en la secreción de cortisol en ovinos de diferente sexo observadas por Van Lier E. *et al.* (2003a) se podrían deber, entre otras cosas, a una diferente sensibilidad adrenal a los estrógenos. Para conocer los mecanismos por los cuales las hormonas esteroideas afectan la esteroidogénesis adrenal, el primer paso es demostrar la presencia de los receptores específicos a través de los cuales ejercen sus efectos en los tejidos blanco. En este sentido, se caracterizaron los RE de la glándula adrenal de ovinos de diferentes sexos y estados gonadales en la estación reproductiva (Van Lier E. *et al.*, 2003b). Las ovejas tuvieron mayores niveles de RE citosólico en las adrenales que los carneros y la gonadectomía incrementó la concentración de RE en ambos sexos.

Se detectó estradiol en ovinos castrados sin estrés, lo que puede estar indicando un origen extra-gonadal de estradiol o de andrógenos precursores, pero no se pudo determinar si el origen fue o no la corteza adrenal (Van Lier E. *et al.*, 2003b). No obstante, existen fuentes no ováricas de estrógeno, ya que se observó que el peso uterino en ovejas castradas inmunizadas contra estrógenos fue menor que en ovejas castradas no inmunizadas (Adams N. *et al.* 1990). Además, estos autores observaron incrementos en el peso de las adrenales y decremento en los contenidos de estrógenos en el tejido uterino de ovejas inmunizadas. Es probable que estos estrógenos (y/o sus precursores) se originen en las glándulas adrenales, ya que la adrenalectomía incrementa los RE y disminuye las concentraciones de estradiol en el útero en ovejas castradas (Atkinson S. *et al.*, 1988). Si bien se ha encontrado actividad de aromataasa en las glándulas adrenales de fetos y recién nacidos de suinos, indicando capacidad de síntesis de estrógenos, esto no fue observado en primates o rumiantes (Conley A. *et al.*, 1996).

La falta de diferencias estacionales en las ovejas encontrada por Van Lier *et al.*, (2003a), no resulta fácil de explicar puesto que, si los estrógenos en la estación reproductiva fueron en parte responsables de los mayores niveles de cortisol en ovejas luego del suministro de ACTH comparado con carneros, no queda claro cómo las ovejas logran mantener una alta respuesta en cortisol en la estación no-reproductiva. Los autores encuentran una posible explicación en el mecanismo de sensibilidad compensatorio, el cual establece una relación inversa entre la abundancia de receptores de esteroides sexuales y la concentración de la hormona circulante (Young L. *et al.*, 1995). La glándula adrenal puede ser más sensible a los estrógenos en la estación no-reproductiva y por tanto ser capaz de mantener una alta respuesta en cortisol a pesar de los bajos niveles de estrógenos. En el estudio de receptores, la concentración de RE en ovejas intactas parece seguir el mismo patrón descrito para el útero, con regulación en más por estradiol (fase folicular) y regulación en menos por progesterona (fase luteal) (Rexroad C., 1981a,b).

En suma, los esteroides sexuales (gonadales) actúan en múltiples sitios modulando la respuesta del eje HPA. Dos estrategias diferentes parecen emerger. En machos, los andrógenos actuarían indirectamente para inhibir la actividad del PVN (y por lo tanto el eje HPA) y probablemente en forma directa a nivel adrenal. Como consecuencia, hay una disminución en los productos secretorios del eje HPA y mantenimiento de la secreción de hormonas reproductivas. En hembras, los estrógenos incrementan la secreción de ACTH y glucocorticoides, pero esto puede ser secundario a una defectuosa retroalimentación negativa mediada por GR. Ambas estrategias sugieren la evolución de un dimorfismo sexual en los patrones regulatorios en un intento por mantener la competencia reproductiva en el enfrentamiento a estresores físicos o psicológicos que amenazan la homeostasis (Handa R. *et al.*, 1994; Ogilvie K. *et al.*, 1997; McCormick C. *et al.*, 1998). Se piensa que las diferencias de género en la función endócrina sean debidas a dos acciones de los esteroides sexuales, llamados efectos ‘organizacionales’ y ‘activacionales’. Los esteroides gonadales presentes durante el período perinatal pueden organizar sustratos neuronales, resultando en alteraciones de por vida de la función endócrina. Por ejemplo, la presencia de andrógenos temprano en el período postnatal de las ratas previene la ocurrencia de pulsos de estradiol en el adulto. Varias manipulaciones perinatales del organismo en desarrollo (estrés prenatal, manejo neonatal) han mostrado tener efectos sobre la función del eje HPA que persisten de adulto. Las diferencias sexuales en el eje HPA están presentes en los neonatos, y las hormonas han mostrado modular la función del HPA tanto en neonatos como en adultos (Carter D. *et al.*, 1986; Hary L. *et al.*, 1986; Levine S., 1994; Meaney M. *et al.*, 1996 citados por McCormick C. *et al.*, 1998). En contraste, los efectos ‘activacionales’ de los esteroides resultan de la influencia de niveles circulantes de estas hormonas, y pueden ser revertidos por castración o simulados con regímenes de reemplazo de esteroides. Existe fuerte evidencia para la hipótesis de que los esteroides gonadales alteran la actividad del eje HPA de forma activacional. En particular, los niveles circulantes de estradiol aumentan la secreción de ACTH y los andrógenos testiculares suprimen la secreción adrenal de corticosterona (Ogilvie K. *et al.*, 1997) (Breedlove E. *et al.*, 1994; Gorski R. *et al.*, 1979; Harlan R. *et al.*, 1979 citados por Ogilvie K. *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos por McCormick C. *et al.* (1998) sugieren que el estado gonadal modula la función del eje HPA durante la ontogenia y por lo tanto determina, en parte, los efectos de los glucocorticoides en la salud física y cognitiva durante el resto de la vida del animal. Ellos encontraron que la exposición del neonato tanto a testosterona como a estrógeno es necesaria para permitir que la testosterona suprima la función del HPA en respuesta al estrés en adultos. En varias regiones del cerebro, la diferenciación sexual masculina depende de la aromatización intraneuronal de testosterona a estradiol (McEwen B. *et al.*, 1997; Naftolin F. *et al.*, 1975 citados por McCormick C. *et al.*, 1998). Asimismo, la duración del reemplazo es importante en generar efectos activacionales en el eje HPA.

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. En las hembras los gametos están presentes al nacimiento y luego en la pubertad son liberados cíclicamente durante la ovulación, el cual es un evento muy vulnerable. Cualquier alteración en el pico pre-ovulatorio de LH puede comprometer la concepción. En los carneros, la espermatogénesis raramente se detiene, aunque los ovinos son reproductores estacionales (Lincoln G. *et al.*, 1980). La calidad y cantidad de esperma son afectadas por la estación (Amir D. *et al.*, 1965; Bielli A. *et al.*, 1997) 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 HPA es probablemente máxima permitiendo al animal el escape de cualquier efecto detrimental del estrés en su estado reproductivo. Es razonable pensar que cada sexo tenga sus propias estrategias para proceder frente a los efectos del estrés. En las hembras el costo de la reproducción es extremadamente alto, por lo tanto todos los recursos que se gastan en gestación, lactación y sobrevivencia de las crías son tomados en cuenta. Las formas de evitar estos costos en un ambiente hostil o inestable suponen prevenir la concepción o inducir pérdidas tempranas de embriones. Los machos, por otro lado, tienen 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. Estas diferencias sexuales en las estrategias reproductivas ('oportunistas' vs 'estratégicos') puede ofrecer una explicación de porqué los ejes HPA y HPG interactúan en forma diferente en cada sexo (Van Lier E., 2003c).

Todavía las vías de regulación de la modulación de esteroides gonadales de la actividad del eje HPA son desconocidas (Yukhananov R. *et al.*, 1997). Cómo tales esteroides determinan estos efectos y la exacta localización de sus sitios de acción son aún materias bajo estudio (Van Lier E., 2003c).

9 MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 CONDICIONES DE TRABAJO

El estudio fue realizado en el Centro Regional Sur de la Facultad de Agronomía, en mayo del 2005 (estación reproductiva ovina tardía). Hasta el día previo al experimento, los animales estuvieron en pasturas mejoradas con acceso libre al agua. El día previo a comenzar cada muestreo de sangre se colocó, bajo efecto de xilacina, un catéter en la vena yugular del cuello de cada animal para la obtención de sangre. La misma se colectó en tubos heparinizados. Los muestreos tuvieron lugar en pequeños bretes bajo un tinglado en los cuales los animales fueron ubicados de a pares y por sexo. La sangre fue colectada cada 15 minutos durante 4 horas. Luego de la colocación de los catéteres los animales fueron encerrados en los bretes, se alimentaron con fardos de alfalfa y tuvieron acceso libre al agua, hasta finalizar los muestreos de sangre al otro día. Fueron pesados antes y después del experimento.

9.2 ANIMALES

Se utilizaron diez ovinos de raza Corriedale distribuidos de la siguiente manera: cuatro ovejas adultas (PV promedio (\pm EEM): 42.5 ± 1.53 kg) provenientes de la Estación Experimental Bañado de Medina – Cerro Largo; y seis carneros de 30 meses de edad (PV promedio 70.6 ± 1.52 kg) provenientes de un establecimiento en San José. Todos los animales fueron gonadectomizados cuatro semanas antes del experimento bajo efecto de xilacina (0.5 mL i.m.) y con anestesia local (lidocaína al 2%). Al momento del muestreo los animales estaban acostumbrados al manejo. Toda la experimentación animal fue realizada de acuerdo a las recomendaciones de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República.

9.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento consistió en dos muestreos seriados de sangre con una semana de diferencia entre ellos. El día del primer muestreo, una hora luego de iniciado, cada animal recibió 0.5 mL de un análogo de ACTH i.v. (un polipéptido basado en los primeros 24 aminoácidos de los 39 presentes en la molécula natural: Tetracosactid, Synacthen Depot[®], 1 mg/mL, Ciba Geigy, Basel, Switzerland), siendo considerado tiempo 0. Cuatro días más tarde se administraron hormonas de reemplazo a los animales. Los machos recibieron 1 mL de Ciclopentilpropionato de Testosterona i.m. (en vehículo oleoso, 100 mg/mL, Laboratorios Dispert S.A., Montevideo, Uruguay) y las hembras recibieron 0.5 mL de Benzoato de Estradiol i.m. (en vehículo oleoso, 5 mg/mL, Laboratorios Dispert S.A., Montevideo, Uruguay). El segundo muestreo (72 h luego de administrar el reemplazo hormonal) fue igual al primero administrando ACTH a la hora de haber comenzado. Se evaluaron el efecto del sexo sobre la secreción de cortisol post-ACTH en animales gonadectomizados, y si el reemplazo hormonal con benzoato de estradiol (hembras) o

ciclopentilpropionato de testosterona (machos) fue capaz de modificar la respuesta, en términos de cortisol, a la ACTH.

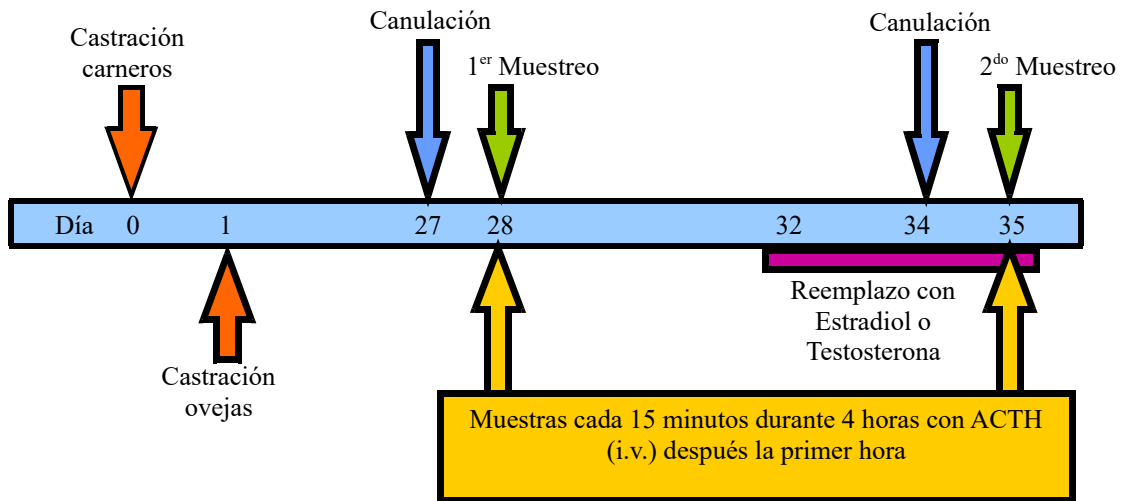


Figura 7. Representación esquemática del procedimiento experimental.

9.4 ANALISIS HORMONALES

El plasma fue obtenido por centrifugación de las muestras inmediatamente luego de ser colectado. Se tomaron aproximadamente 3 mL de plasma en cada muestra y se conservaron a -20°C hasta su análisis en el laboratorio. Para el análisis de cortisol se tomaron las muestras cada 30 min de la primera hora de muestreo hasta la inyección de ACTH. A partir de allí se tomaron las muestras cada 15 min hasta las 2 horas post inyección de ACTH), y luego cada 30 minutos nuevamente hasta el final. El 17 β -estradiol fue determinado para hembras previo al reemplazo hormonal (día 32) y diariamente hasta el día 35 inclusive, donde se analizaron además muestras pre y post ACTH.

Todas las concentraciones hormonales se determinaron por radioinmunoanálisis (RIA) (Meikle A. *et al.*, 2001), previamente validado (Coat-A-Count kit radioinmunoensayo, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) (cortisol: Van Lier E. *et al.*, 1998; estradiol: Meikle A. *et al.*, 1997).

Según el fabricante el antisuero es altamente específico para cortisol y tiene una reactividad cruzada extremadamente baja para otros esteroides naturales o sintéticos. Todas las muestras

fueron procesadas en un único ensayo de RIA. Muestras de control de calidad conteniendo cortisol endógeno (bajo 36.9 nmol/L, medio 154.9 nmol/L y alto 296.0 nmol/L) fueron ensayadas en duplicados al comienzo, a la mitad y al final del ensayo. Los coeficientes de variación intra-ensayo fueron 8.6%, 3.8% y 5.2%, respectivamente. El límite analítico de detección del ensayo fue 10.8 nmol/L.

Para 17 β -estradiol el antisuero también es altamente específico, de acuerdo al fabricante, y tiene una reactividad cruzada extremadamente baja para otros esteroides naturales o sintéticos. Muestras de control de calidad conteniendo estradiol endógeno (bajo 14.4 pmol/L y medio 45.3 pmol/L) fueron ensayadas en duplicados al comienzo, a la mitad y al final del ensayo. Los coeficientes de variación intra-ensayo fueron 23.6% y 6.2%, respectivamente. El límite analítico de detección del ensayo fue 2.6 pmol/L.

9.5 ESTADÍSTICA

Se utilizó el paquete estadístico Statistical Analysis Systems (SAS) (1999-2000) para realizar el análisis de varianza de medidas repetidas de los datos de cortisol utilizando el procedimiento MIXED, conjunto con el test de Tukey-Kramer. Para cada animal los valores promedios de las muestras -60, -30 y 0 (concentraciones pre-tratamiento) fueron tomados como concentraciones basales de cortisol y sirvieron como controles para el tratamiento de ACTH dentro de cada animal. Los principales efectos estudiados fueron sexo (macho o hembra) y estado hormonal (gonadectomizados con o sin reemplazo hormonal). El efecto del tiempo (tiempo de muestreo en minutos desde el comienzo del muestreo) fue considerado como el factor de medidas repetidas y el animal fue el error experimental. Se analizaron además, las diferencias de las concentraciones promedias de cortisol pre y post ACTH por separado entre grupos (hembras y machos, con y sin reemplazo), y las diferencias de esos promedios (pre y post ACTH) dentro de cada grupo. Un nivel alfa de $P < 0.05$ fue usado para determinar significancia.

10 RESULTADOS

10.1 ESTRADIOL

El reemplazo hormonal logró aumentar las concentraciones plasmáticas de 17 β -estradiol, incluso en el día 35 (segundo muestreo). Previo a la administración de benzoato de estradiol, las concentraciones de 17 β -estradiol en hembras gonadectomizadas fueron muy bajas, pero detectables (Cuadro 1). Los niveles plasmáticos de 17 β -estradiol luego de la administración de benzoato de estradiol fueron superiores a concentraciones fisiológicas ($P < 0.05$). Se observó además variación en el comportamiento y actividad sexual de las hembras (permitieron la monta), verificándose a campo el efecto del esteroide exógeno. Este hecho pudo constatarse al conducir los animales hacia los bretes para la colocación de las cánulas del segundo muestreo.

Cuadro 1. Concentraciones promedio (\pm EEM) de 17 β -estradiol (pmol/L) en ovejas gonadectomizadas antes y después del reemplazo con benzoato de estradiol.

Día	32	33	34	35
Promedio (pmol/L)	4.5 (± 0.7)	1692 (± 347.7)	498 (± 102.9)	225 (± 59.2)

Nota: día 35 es el día de muestreo frecuente con administración de ACTH.

No se vio efecto de la administración de ACTH sobre los niveles de estradiol ya que los niveles post-ACTH no mostraron un patrón consistente.

10.2 TESTOSTERONA

No se realizó análisis de RIA para evaluar el reemplazo hormonal en carneros castrados, sin embargo, puede deducirse que el tratamiento fue efectivo en aumentar las concentraciones plasmáticas del esteroide, ya que los machos androgenizados presentaron comportamiento sexual (monta) en los días posteriores a la administración de ciclopentilpropionato de testosterona. La constatación de este comportamiento tuvo lugar de la misma forma que fuera descrito para las hembras en el segundo muestreo.

10.3 CORTISOL

Los principales efectos del sexo y tiempo (en minutos respecto a la aplicación de ACTH) fueron significativos ($P < 0.0001$), pero no el tratamiento (administración o no de esteroides

exógenos) ($P = 0.1419$). Fueron significativas las interacciones sexo*tratamiento, sexo*tiempo y tratamiento*tiempo ($P < 0.01$), así como la triple interacción ($P < 0.001$).

El modelo de simulación de estrés administrando ACTH fue efectivo en aumentar la secreción de cortisol. Los niveles de cortisol pre-ACTH se encontraron en el rango fisiológico correspondiente a niveles basales, excepto en dos ocasiones en hembras. Los niveles post-ACTH se encontraron en el rango fisiológico esperado en situaciones de estrés en ambos sexos.

Los niveles basales de cortisol (pre-ACTH) fueron bajos. Se encontraron diferencias significativas entre la secreción pre-ACTH de cortisol que presentaron las hembras gonadectomizadas sin benzoato de estradiol (primer semana de muestreo) y la presentada por el resto de los grupos ($P < 0.05$).

La estimulación de las glándulas adrenales con ACTH indujo la secreción de cortisol y los niveles alcanzados fueron significativamente mayores a los niveles basales en todos los animales hasta el final del experimento ($P < 0.001$) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentraciones promedio (\pm EEM) de cortisol (nmol/L) pre y post – ACTH en animales según sexo y tratamiento

	Hembras sin estradiol	Hembras con estradiol	Machos sin testosterona	Machos con testosterona
Pre-ACTH	82.6 (\pm 12.5) ^{A, a}	49.6 (\pm 3.6) ^{B, a}	29.6 (\pm 4.7) ^{B, a}	23.0 (\pm 1.7) ^{B, a}
Post-ACTH	256.2 (\pm 32.7) ^{A, b}	325.0 (\pm 42.4) ^{B, b}	146.3 (\pm 21.7) ^{C, b}	129.9 (\pm 20.0) ^{C, b}

*Letras mayúsculas (A,B) indican significancia dentro de filas ($P < 0.05$), letras minúsculas (a,b) indican significancia dentro de columnas ($P < 0.0001$).

Se encontraron diferencias en la respuesta de cortisol mostrada por los diferentes grupos según la combinación sexo y tratamiento.

En cuanto al efecto que ejercieron los esteroides sexuales reemplazados, las respuestas encontradas en cortisol variaron. Las hembras presentaron mayores secreciones de cortisol cuando tuvieron reemplazo hormonal ($P = 0.0062$) que sin estradiol (Figura 8). Por otro lado, en los machos la administración de ciclopentilpropionato de testosterona no afectó la respuesta de cortisol frente a la administración de ACTH ($P = 0.2912$) comparado con los carneros sin reemplazo (Figura 9).

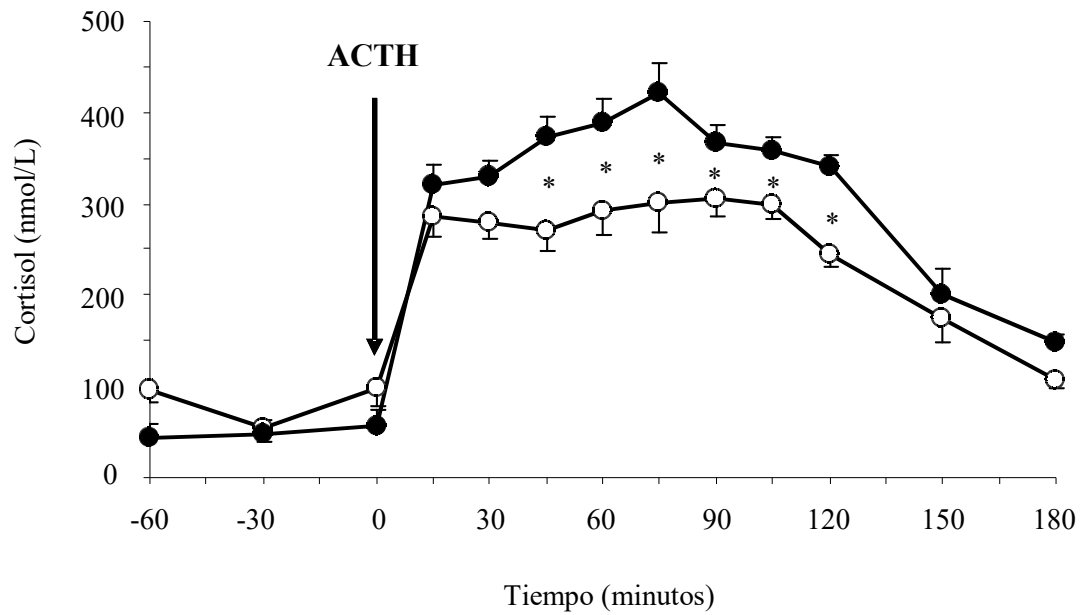


Figura 8. Perfiles promedios (\pm EEM) de cortisol (nmol/L) antes y después de la administración i.v. de un análogo de ACTH en hembras sin (-o-) y con (-●-) reemplazo hormonal. Los * indican los momentos en que las diferencias fueron significativas ($P < 0.05$).

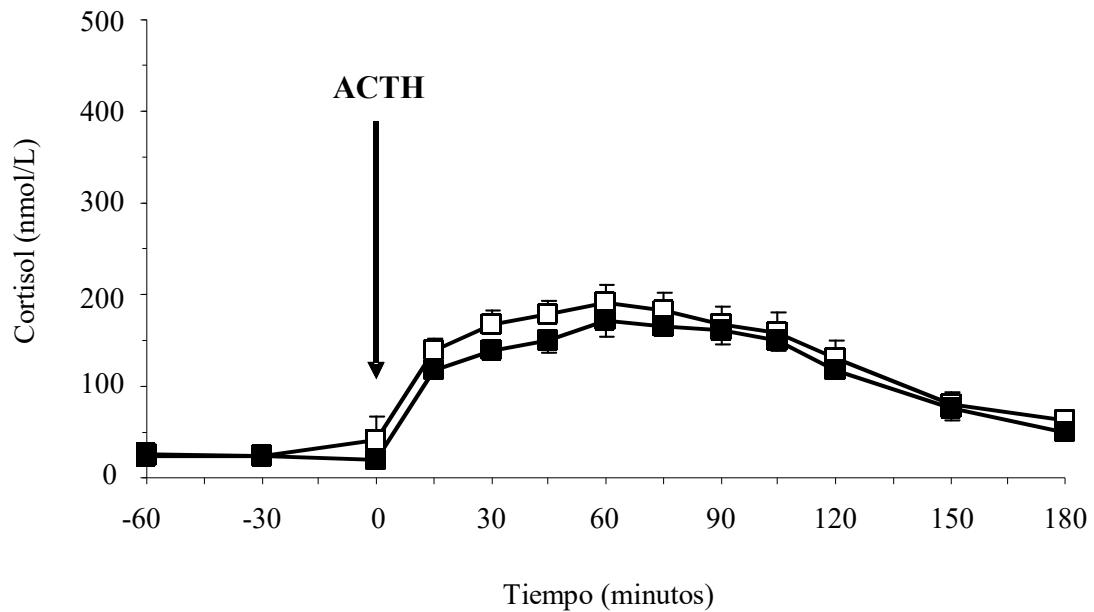


Figura 9. Perfiles promedios (\pm EEM) de cortisol (nmol/L) antes y después de la administración i.v. de un análogo de ACTH en machos sin (-□-) y con (-■-) reemplazo hormonal.

Cuando la respuesta de cortisol se evalúa comparando sexos también se encontraron diferencias. En animales sin reemplazo hormonal, las hembras secretaron más cortisol que los machos ($P < 0.0001$) en respuesta a la ACTH, excepto a los 180 minutos de administrado la ACTH ($P = 0.0981$) (Figura 10). Cuando los animales de ambos sexos fueron tratados con reemplazo hormonal de los esteroides sexuales correspondientes, se observaron diferencias significativas en todos los momentos ($P < 0.0001$), manteniendo una relación donde las hembras contaron con mayores niveles plasmáticos de cortisol que los machos (Figura 11).

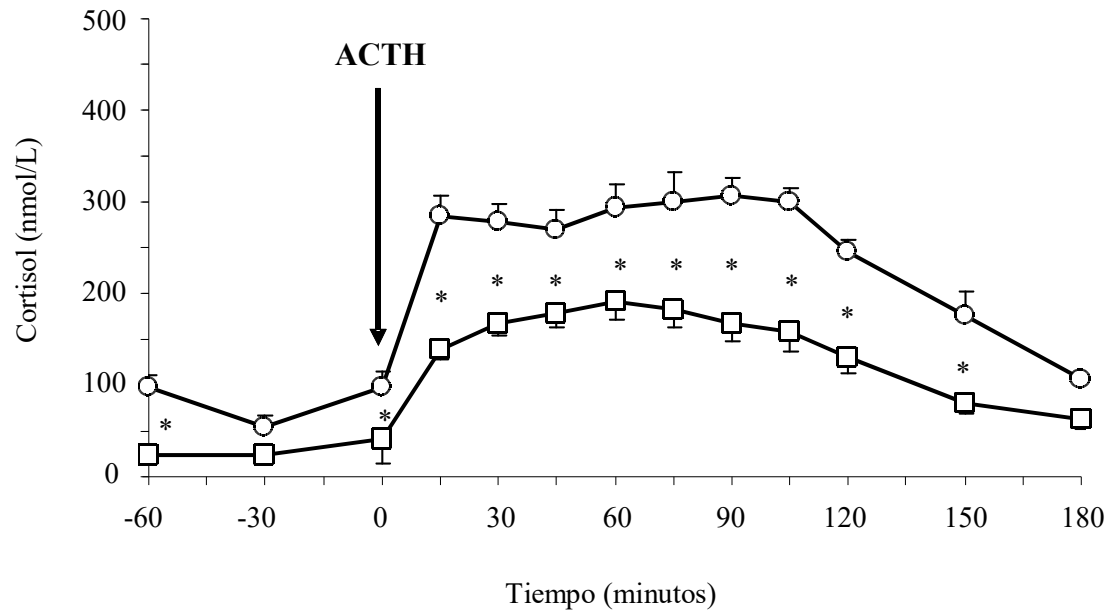


Figura 10. Perfiles promedios (\pm EEM) de cortisol (nmol/L) antes y después de la administración i.v. de un análogo de ACTH en hembras (-○-) y machos (-□-) sin reemplazo hormonal. Los * indican los momentos en que las diferencias fueron significativas ($P < 0.05$).

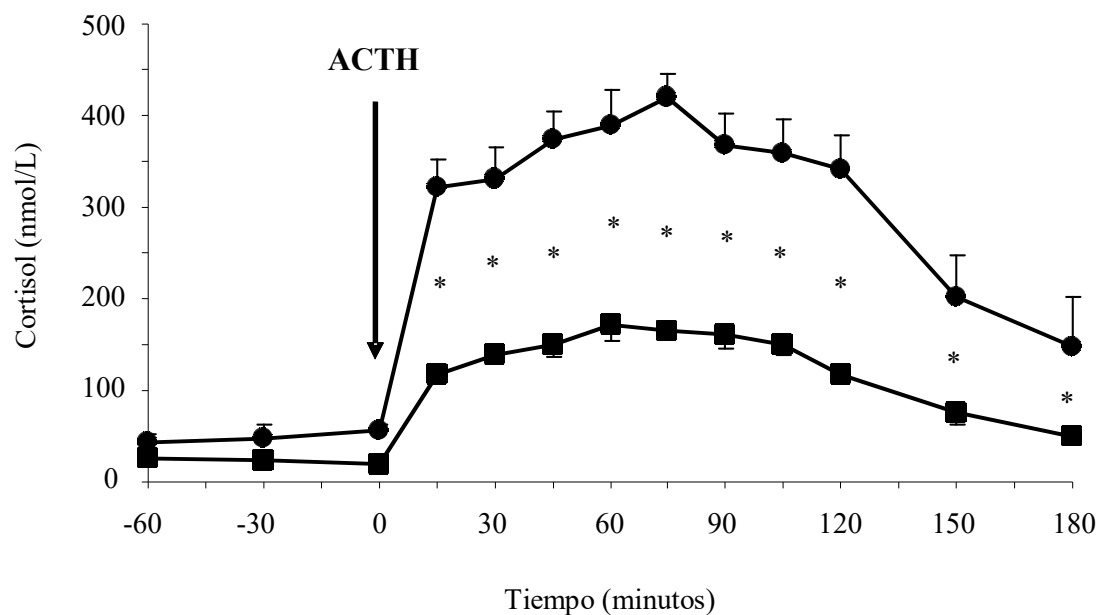


Figura 11. Perfiles promedios (\pm EEM) de cortisol (nmol/L) antes y después de la administración i.v. de un análogo de ACTH en hembras (-●-) y machos (-■-) con reemplazo hormonal. Los * indican los momentos en que las diferencias fueron significativas ($P < 0.05$).

En resumen, puede observarse que las hembras con y sin reemplazo siempre secretaron más cortisol que los machos (Figura 12), siendo esta diferencia más marcada cuando los esteroides sexuales se incluyeron en el sistema.

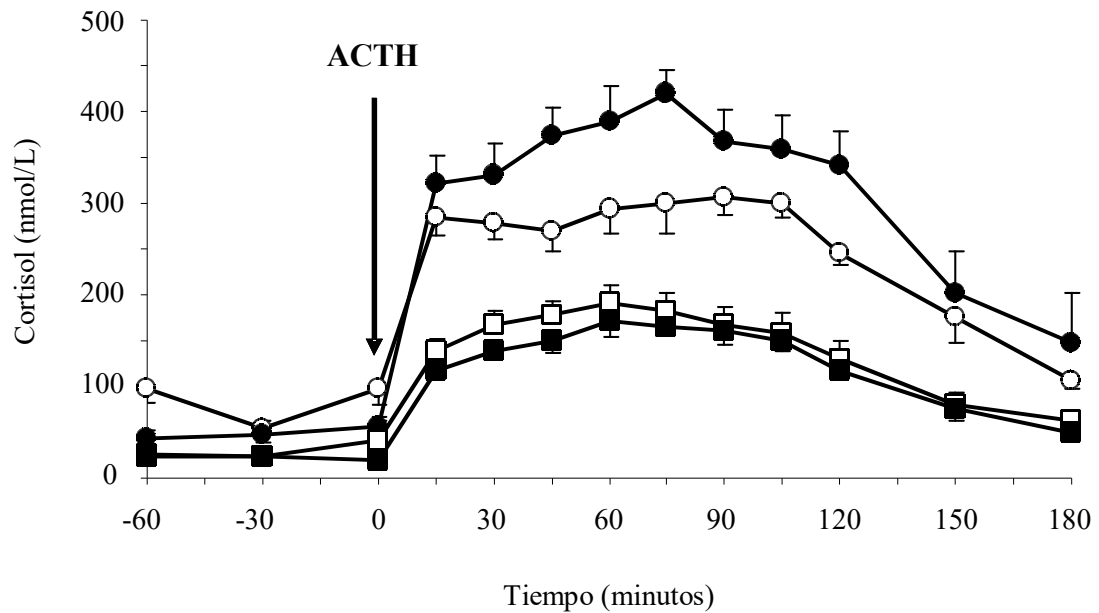


Figura 12. Perfiles promedios (\pm EEM) de cortisol (nmol/L) antes y después de la administración i.v. de un análogo de ACTH en hembras sin (-○-) y con (-●-) reemplazo hormonal, y machos sin (-□-) y con reemplazo (-■-) hormonal.

11 DISCUSIÓN

Los valores de cortisol pre-ACTH en hembras para el primer muestreo fueron superiores a los niveles basales, lo que puede asociarse al hecho de que para la mayoría del equipo de trabajo era la primera vez que realizaba dicha tarea. Además, surge de las anotaciones de campo que las cánulas y catéteres de esos animales tuvieron que ser ajustadas y en algunos casos inclusive, ser cambiadas. Dado que por razones de disponibilidad económica no se trabajó con todas las muestras tomadas, sería interesante analizar todas las muestras pre-ACTH a fin de determinar con mayor detalle los perfiles de cortisol en esa etapa. Cabe también la posibilidad que frente a lo novedoso en el primer muestreo las hembras y machos hayan reaccionado con distintos niveles de ansiedad, resultando en mayores niveles de cortisol pre-ACTH en las hembras.

La administración de ACTH *in vivo* fue efectiva en estimular la secreción de cortisol por la glándula adrenal en ambos sexos, lo que está en acuerdo con lo expresado por Moberg G. (1987, 1991) y Tilbrook A. *et al.* (2000), y lo observado en esta especie por varios investigadores (Doney J. *et al.*, 1976; Fuquay J. *et al.*, 1983; Mohamed F. *et al.*, 1988a,b; Cox J. *et al.*, 1988; Turner A. *et al.*, 2002; Van Lier E. *et al.*, 1998, 1999, 2003a). Asimismo, Canny B. *et al.* (1999) encontraron esta respuesta *in vitro* cuando administraron ACTH en cultivos de células de glándulas adrenales de ovinos.

Los resultados confirman la existencia de diferencias sexuales en secreción de cortisol post-ACTH en ovinos. Las hembras secretaron mayores niveles de cortisol que los machos cuando ambos grupos recibieron reemplazo. Lo mismo sucedió en los grupos sin reemplazo. Esto difiere con lo encontrado por Tilbrook A. *et al.* (1999) y Van Lier E. *et al.* (2003a), quienes no observaron diferencias en la respuesta en cortisol entre machos y hembras gonadectomizados. En roedores, cuando se remueven las gónadas, las diferencias sexuales en la función del eje HPA son severamente reducidas o ausentes (ratas: El-Migdadi F. *et al.*, 1995; ratones: Perry J. *et al.*, 1992). Si bien en el estudio anterior (Van Lier E. *et al.*, 2003a) los niveles de cortisol en carneros y ovejas gonadectomizados no fueron estadísticamente diferentes, los perfiles no se superponían, el de las hembras se encontraba por encima del de los machos. La contradicción de los resultados actuales con los de la literatura es difícil de explicar, y sugiere que otros elementos a parte de los esteroides sexuales circulantes estuvieron implicados. Puede ser que las diferencias observadas entre ovejas y carneros gonadectomizados en este estudio sean debidas a efectos 'organizacionales' de los esteroides sexuales (McCormick C. *et al.*, 1998). De acuerdo a estos autores los esteroides gonadales presentes durante los períodos fetal y perinatal pueden organizar sustratos neuronales, resultando en alteraciones de por vida en la función endócrina. Dado que en este experimento se trabajó a nivel periférico (administración exógena de ACTH) se podría pensar que también en la adrenal existen efectos organizacionales de los esteroides sexuales.

En las ovejas, se registraron niveles bajos (pero detectables) de 17 β -estradiol antes de la administración de benzoato de estradiol, pese a que fueron ovariectomizadas. Esto junto con lo observado por otros (Atkinson S. *et al.*, 1988; Adams N. *et al.*, 1990; Van Lier E. *et al.*, 2003b) sugiere una fuente extragonadal de secreción de 17 β -estradiol (o sus precursores) que posiblemente sea adrenal. Las concentraciones plasmáticas de 17 β -estradiol luego de la

administración de benzoato de estradiol fueron farmacológicas puesto que superaron ampliamente el rango fisiológico para el período de mayor secreción (fase folicular: 30-60 pmol/L). Las concentraciones medidas en plasma reflejan que la dosis de benzoato de estradiol utilizada fue alta.

La diferencia en respuesta en cortisol en hembras luego de recibir reemplazo hormonal fue mayor a la observada en un estudio anterior donde se compararon ovejas enteras con ovariectomizadas (Van Lier E. *et al.*, 2003a). El hecho que la administración de benzoato de estradiol fue capaz de elevar la respuesta de cortisol a ACTH en las mismas ovejas ovariectomizadas confirma claramente que el estradiol actúa a nivel de la glándula adrenal. El efecto del estradiol sobre la secreción de cortisol fue observado por primera vez en roedores hace más de 40 años por Kitay J. (1961). A medida que se hicieron disponibles técnicas moleculares más sofisticadas se demostró la presencia de receptores de estrógenos (RE) en la glándula adrenal de ratas y primates (Cutler G. *et al.*, 1978; Calandra R. *et al.*, 1980; Hirst *et al.*, 1992) lo que marcó una posible acción estrogénica en la glándula. El primer reporte de presencia de RE en adrenal en ovinos surge de un estudio realizado en Uruguay (Van Lier E. *et al.*, 2003b), donde se observó que tanto los machos como las hembras, enteros y gonadectomizados, tenían concentraciones detectables pero diferentes de RE. La presencia del RE es necesaria para que el estradiol pueda actuar, pero para confirmar la acción estrogénica fue necesario trabajar con un modelo en donde se eliminó la fuente principal (ovario) y se sustituyó la hormona. Según Van Lier E. *et al.* (2003b) se han sugerido posibles mecanismos por los cuales los estrógenos estimulan la secreción de cortisol: 1) influenciando la sensibilidad adrenocortical a la ACTH (Atkinson H. *et al.*, 1997; Lo M-J. *et al.*, 2000), 2) incrementando la disponibilidad del precursor de esteroides (colesterol) por efecto de la proteína aguda de la regulación de la esteroidogénesis (StAR) (Towson D. *et al.*, 1996; Stocco D., 2001); y/o 3) induciendo enzimas relacionadas a la síntesis de glucocorticoides (Perry J. *et al.*, 1992).

El reemplazo con ciclopentilpropionato de testosterona, bajo las condiciones de este experimento, no mostró efecto sobre la respuesta en cortisol, lo que está en desacuerdo a lo hallado en ovinos (Van Lier E. *et al.*, 2003a), roedores (Gaskin J. *et al.*, 1970; Handa R. *et al.*, 1994; Viau V. *et al.*, 1996; Ogilvie K. *et al.*, 1997; McCormick C. *et al.*, 1998), y vacunos (Verkerk G. *et al.*, 1997). Estos autores en conjunto, proponen un rol inhibitorio de los andrógenos sobre la secreción de cortisol que es muy contundente. Al momento de escribir este trabajo no estaban disponibles los resultados de análisis de testosterona en las muestras pre y post-reemplazo. Sin embargo se constató actividad sexual en los machos durante el reemplazo que es una indicación indirecta de la presencia de niveles de testosterona en los machos tratados. De todas maneras no existen elementos que permitan explicar la falta de efecto esperado. Los modelos que incluyen terapia de reemplazo hormonal presentan como desventaja la dificultad de identificar en qué medida el resultado representa la respuesta fisiológica, o si representa una distorsión debido a niveles hormonales artificiales. Si las terapias de reemplazo no se asemejan a los patrones naturales de secreción es posible que interfieran con las dinámicas de receptores de las diferentes hormonas y de este modo enmascaren sus efectos (Van Lier E. *et al.*, 2003a).

Por otro lado, con estos resultados no se puede descartar el efecto inhibitorio de testosterona sobre la secreción de cortisol, sólo podemos decir que nuestro tratamiento no fue el adecuado en evidenciarlo. Es posible sugerir algunas explicaciones para este resultado. Varios autores han

encontrado que la regulación de los receptores de andrógenos (RA) se da ‘en más’ o ‘en menos’ de acuerdo al tejido, tipo celular y especie (Takeda H. *et al.*, 1991; Zhu L-J *et al.*, 2000). Por otra parte, aunque no se ha estudiado aún la presencia de RA en las glándulas adrenales de ovinos, y los resultados en otras especies son contradictorios (presencia: Takeda H. *et al.*, 1990; Ruizeveld J. *et al.*, 1991; Kimura N. *et al.*, 1993; ausencia: Iwamura M. *et al.*, 1994), es posible sugerir su presencia en esta especie. Tomando en cuenta lo mencionado recientemente, se puede pensar que la dosis de ciclopentilpropionato de testosterona en nuestro experimento fue tan alta que afectó los RA presentes en ese momento por regulación ‘en menos’. Tal vez si el tiempo transcurrido entre la administración de ciclopentilpropionato de testosterona y ACTH hubiese sido mayor, podría haber actuado un proceso de recuperación de los niveles de RA, como sugiere Meikle A. (2001) para RE en corderas luego de administrarles benzoato de estradiol. Asimismo, es posible entonces, que las 72 h transcurridas desde el reemplazo con ciclopentilpropionato de testosterona hasta el muestreo no hayan sido suficientes para evidenciar su efecto en la corteza adrenal que hubiese determinado la reducción en la secreción de cortisol. Verkerk G. *et al.*, (1997) plantean que la testosterona puede afectar la respuesta a ACTH de la glándula adrenal. Además, el aporte trófico proveniente del eje HPA, en forma de ACTH, es esencial para el mantenimiento de la función adrenocortical. Cualquier alteración en ese aporte por las acciones de los andrógenos (por ejemplo, un aumento en la retroalimentación negativa en la pituitaria) alteraría la secreción de ACTH (Simpson E. *et al.*, 1988 citado por Verkerk G. *et al.*, 1997). Respecto al factor tiempo que mencionamos, McCormick C. *et al.* (1998), observaron que para generar efectos activacionales en el eje HPA en ratas macho castrados, la duración del reemplazo es importante.

12 CONCLUSIONES

- La ACTH fue efectiva en inducir la secreción de cortisol por la corteza adrenal en ambos sexos, con y sin reemplazo hormonal.
- Esta investigación confirma la existencia de diferencias sexuales en respuesta de cortisol a ACTH en ovinos que actuaron como sus propios testigos. Las hembras ovariectomizadas con y sin reemplazo hormonal, secretan más cortisol que los machos bajo las mismas condiciones, lo que no había sido encontrado por otros autores hasta el momento y por lo tanto parecería que no sólo los esteroides sexuales circulantes están involucrados en las diferencias sexuales a nivel adrenal.
- Pudo verificarse la existencia de niveles de estrógenos de origen extragonadal en las hembras.
- El benzoato de estradiol efectivamente ejerce un efecto estimulante sobre la secreción de cortisol luego de la administración de ACTH.
- La ciclopentilpropionato de testosterona, bajo nuestro esquema de administración no logró disminuir la respuesta de cortisol luego de la administración de ACTH.

CONSIDERACIONES

- El estudio debería incluir las determinaciones por RIA de testosterona en machos y hembras con y sin reemplazo hormonal, y estradiol en los machos.
- Se debería determinar la presencia de receptores de andrógenos en la glándula adrenal a fin de establecer si las adrenales son potencialmente sensibles a la acción de testosterona y poder empezar a explicar los mecanismos por los cuales los andrógenos afectan la respuesta de cortisol adrenal.
- Se debería revisar la dosis y la vía de administración de benzoato de estradiol para obtener concentraciones plasmáticas similares a las fisiológicas, con el objetivo de verificar los resultados obtenidos en este estudio.
- Se debería repetir el experimento en carneros orchiectomizados prolongando el tiempo de reemplazo con ciclopentilpropionato de testosterona antes de administrar ACTH y a su vez revisar la dosis y la vía de administración del reemplazo.

13 RESUMEN

En nuestro país, recientemente ha cobrado importancia la temática referida al bienestar animal. El estrés, un indicador de bienestar, afecta diferentes sistemas y funciones del organismo animal. En particular, comprender cómo el estrés afecta la reproducción reviste gran importancia y se justifica aún más en un rubro como el ovino que ha venido perdiendo stock desde hace varios años. Trabajos previos indican que los ovinos responden al estrés en forma diferencial de acuerdo al sexo y a los niveles de esteroides sexuales en sangre. Las hembras responden con una mayor secreción de cortisol que los machos, lo que afecta la función reproductiva a distintos niveles (tasa ovulatoria, manifestación de estro, retención de la preñez, etc). Aún no se ha podido concluir dónde se ubican estas diferencias sexuales en la respuesta al estrés, pero varias investigaciones indican que los esteroides sexuales juegan un rol clave.

El objetivo general de este trabajo es contribuir al conocimiento de la temática de estrés y el específico evaluar el efecto del estradiol y testosterona sobre la producción de cortisol por la corteza adrenal, en hembras y machos gonadectomizados de adultos. Para ello se llevó a cabo un experimento en el Centro Regional Sur de la Facultad de Agronomía en mayo del 2005, en el que se utilizaron diez ovinos adultos de raza Corriedale (cuatro ovejas y seis carneros). Todos los animales fueron gonadectomizados cuatro semanas antes del experimento. Al momento del muestreo los animales estaban acostumbrados al manejo. Se realizaron dos muestreos seriados de sangre con una semana de diferencia entre ellos. El día del primer muestreo, una hora luego de iniciado, cada animal recibió 0.5 mL de un análogo de ACTH i.v., siendo considerado tiempo 0. Cuatro días más tarde se administraron hormonas de reemplazo a los animales. Los machos recibieron 1 mL de ciclopentilpropionato de testosterona i.m. y las hembras recibieron 0.5 mL de benzoato de estradiol i.m. El segundo muestreo (72 h luego del reemplazo) fue igual al primero administrando ACTH a la hora de haber comenzado. Se evaluaron el efecto del sexo sobre la secreción de cortisol post-ACTH en animales gonadectomizados, y si el reemplazo hormonal con benzoato de estradiol (hembras) o ciclopentilpropionato de testosterona (machos) fue capaz de modificar la respuesta, en términos de cortisol, a la ACTH. Se utilizó un nivel alfa de $P < 0.05$.

Los resultados muestran que la ACTH fue efectiva en estimular las glándulas adrenales en todos los animales hasta el final del experimento ($P < 0.001$). Las hembras presentaron mayores niveles de cortisol que los machos tanto con como sin reemplazo ($P < 0.0001$). Previo a la administración de benzoato de estradiol, las concentraciones de 17β -estradiol en las hembras fueron muy bajas, pero detectables, y luego fueron farmacológicas. El reemplazo fue efectivo en aumentar la respuesta en cortisol en las hembras ($P = 0.0062$), mientras que en los machos esto no sucedió cuando recibieron reemplazo ($P = 0.2912$).

Estos resultados confirman la existencia de diferencias sexuales en la secreción de cortisol post ACTH en ovinos, la presencia de estrógeno extragonadal (posiblemente de origen adrenal) y el rol estimulante del benzoato de estradiol sobre la secreción de cortisol. Surge un nuevo aspecto respecto a las diferencias en secreción de cortisol entre machos y hembras gonadectomizados; es posible que no sólo los esteroides sexuales circulantes, estén involucrados en las diferencias sexuales a nivel adrenal. Es necesario indagar en la falta de efecto de la ciclopentilpropionato de testosterona encontrado en las condiciones de nuestro experimento.

BIBLIOGRAFIA

ADAMS, N.; ATKINSON, S.; HOSKINSON, R.; ABORDI, J.; BRIEGEL, J.; JONES, M.; SANDERS, M. 1990. Immunization of ovariectomized ewes against progesterone, oestrogen or cortisol to detect effects of adrenal steroids on reproduction. *Journal of Reproduction and Fertility*. 89:477-483.

ADAMS, T.; SAKURAI, H.; ADAMS, B. 1999. Effect of Stress-Like Concentrations of Cortisol on Estradiol-Dependent Expression of Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor in Orchidectomized Sheep. *Biology of Reproduction*. 60:164-168.

AMIR, D.; VOLCANI, R. 1965. Seasonal fluctuations in the sexual activity of Awassi, German Merino, Corriedale, Border-Leicester and Dorset Horn rams. II. Seasonal changes in semen characteristics. *Journal of Agricultural Sciences*. 64:121-125.

APPLE, J.; DIKEMAN, M.; MINTON, J.; McMURPHY, R.; FEDDE, M.; LEITH, D.; UNRUH, J. 1995. Effects of Restraint and Isolation Stress and Epidural Blockade on Endocrine and Blood Metabolite Status, Muscle Glycogen Metabolism, and Incidence of Dark-Cutting Longissimus Muscle of Sheep. *Journal of Animal Science*. 73:2295-2307.

ATKINSON, H.; WADDELL, B. 1997. Circadian Variation in Basal Plasma Corticosterone and Adrenocorticotropin in the Rat: Sexual Dimorphism and Changes across the Estrous Cycle. *Endocrinology*. 138:3842-3848.

ATKINSON, S.; ADAMS, N. 1988. Adrenal glands alter the concentration of oestradiol-17 β and its receptor in the uterus of ovariectomized ewes. *Journal of Endocrinology*. 118:375-380.

BIELLI, A.; GASTEL, T.; PÉREZ, R.; LÓPEZ, A.; CASTRILLEJO, A.; REGUEIRO, M. FORSBERG, M.; LUNDENHEIM, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 1997. Influence of nutrition on seasonal variations in testicular morphology and function in Corriedale rams. *Journal of Reproduction and Development*. 43:171-180.

BINGAMAN, E.; MAGNUSON, D; GRAY, T; HANDA, R. 1994. Androgen inhibits the increases in hypothalamic corticotrophin-releasing hormone (CRH) and CRH- immunoreactivity following gonadectomy. *Neuroendocrinology*. 59:228-234.

BURGESS, L.; HANDA, R. 1992. Chronic Estrogen-Induced Alterations in Adrenocorticotropin and Corticosterone Secretion, and Glucocorticoid Receptor-Mediated Functions in Female Rats. *Endocrinology*. 131:1261-1269.

BURGESS, L.; HANDA, R. 1993. Estrogen-Induced Alterations in the Regulation of Mineralocorticoid and Glucocorticoid Receptor Messenger RNA Expression in the Female Rat Anterior Pituitary Gland and Brain. *Molecular and Cellular Neurosciences*. 4:191-198.

- CALANDRA, R; 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.
- 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.
- CONLEY, A.; CORBIN, C.; HINSHELWOOD, M.; LIU, Z.; SIMPSON, E.; FORD, J.; HARADA, N. 1996. Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis. *Biology of Reproduction*. 54:497-505.
- _____ ; 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 $\Delta 5$ and $\Delta 4$ Pathways of Steroidogenesis in Mammals. *Biology of Reproduction*. 56:789-799.
- COPPINGE, T.; MINTON, J.; REDDY, P.; BLECHA, F. 1991. Repeated restraint and isolation stress in lambs increases pituitary-adrenal secretions and reduces cell-mediated immunity. *Journal of Animal Science*. 69:2808-2814.
- COX, J.; MOHAMED, F. 1988. Studies of pituitary-adrenal-testis interaction in sheep. III. The effects of repeated injections of adrenocorticotrophic hormone in recently castrated rams. *Theriogenology*. 29:867-872.
- CUTLER, G.; BARNES, K.; SAUER, M; LORIAUX, D. 1978. Estrogen receptor in rat adrenal gland. *Endocrinology*. 102:252-257.
- DE SILVA, M.; KALTENBACH, C.; DUNN, T. 1983. Serum cortisol and Progesterone after administration of Adrenocorticotrophin and (or) Prolactin to Sheep. *Journal of Animal Science*. 57:1525-1529.
- DOBSON, H., ESSAWY, S.; ALAM, M. 1988. Suppression of LH response to gonadotrophin-releasing hormone or oestradiol by ACTH (1-24) treatment in anoestrous ewes. *Journal of Endocrinology*. 118:193-197.
- _____ ; SMITH, R. 1995. Stress and reproduction en farm animals. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 49:451-461.
- _____ ; SMITH, R. 2000. What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science*. 60-61:743-752.
- _____ ; TEBBLE, J.; SMITH, R.; WARD, W. 2001. Is Stress Really all that Important? *Theriogenology*. 55:65-73.

- DONEY, J.; GUNN, R.; SMITH, W. 1976. Effects of pre-mating environmental stress, ACTH, cortisone acetate or metyrapone on oestrus and ovulation in sheep. *Journal of Agricultural Sciences*. 87:127-132.
- EHNERT, K.; MOBERG, G. 1991. Disruption of estrous behavior in ewes by dexamethasone or management-related stress's. *Journal of Animal Science*. 69:2988-2994.
- EHRHART-BORNSTEIN, M.; HINSON, J.; BORNSTEIN, S.; SCHERBAUM, W.; VINSON, G. 1998. Intraadrenal Interactions in the Regulation of Adrenocortical Steroidogenesis. *Endocrine Reviews*. 19:101-143.
- EL-MIGDADI, F.; GALLANT, S.; BROWNIE, A. 1995. Sex differences in cytochrome oxidase and P-450_{11β} in the rat adrenal cortex. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 112:185-194.
- ENGELBRECHT, Y.; SWART, P. 2000. Adrenal function in Angora goats: A comparative study of adrenal steroidogenesis in Angora goats, Boer goats, and Merino sheep. *Journal of Animal Science*. 78:1036-1046.
- FUQUAY, J.; MOBERG, G. 1983. Influence of the pituitary-adrenal axis on the induced release of luteinizing hormone in rams. *Journal of Endocrinology*. 99:151-155.
- GARCÍA SACRISTAN, A. 1998. *Fisiología veterinaria. Segunda Reimpresión. España. McGraw-Hill, Interamericana. 1074 p.*
- GASKIN, J.; KITAY, J. 1970. Adrenocortical function in the Hamster: sex differences and effects of gonadal hormones. *Endocrinology*. 87:779-786.
- GONZÁLEZ, M.; YABUTA, A.; GALINDO, F. 2003. Behaviour and adrenal activity of first parturition and multiparous cows under a competitive situation. *Applied Animal Behaviour Science*. 83:259-266.
- GRAHAM, J.; CLARKE, C. 1997. Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. *Endocrine Reviews*. 18:502-519.
- GRANDIN, T. 1997. Assessment of Stress During Handling and Transport. *Journal of Animal Science*. 75:249-257.
- GUPTA, S.; EARLEY, B.; TING, S.; LEONARD, N., CROWE, M. 2004. Technical Note: Effect of corticotropin-releasing hormone on adrenocorticotrophic hormone and cortisol in steers. *Journal of Animal Science*. 82:1952-1956.
- HANDA, R.; BURGESS, L; KERR, J.; O'KEEFE, J. 1994. Gonadal Steroid Hormone Receptors and Sex Differences in the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. *Hormones and Behavior*. 28:464-476.

- HEINLEIN, C.; CHANG, C. 2002. Androgen Receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocrine Reviews*. 23:175-200.
- HIRST, J. 1992. Steroid Hormone Receptors in the Adrenal Glands of Fetal and Adult Rhesus Monkeys. *Endocrinology and Metabolism*. 75:308-314.
- IWAMURA, M.; ABRAHAMSSON, P.; BENNING, C.; COCKETT, A.; DI SANT'AGNESE, A. 1994. Androgen Receptor Immunostaining and Its Tissue Distribution in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Sections After Microwave Treatment. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 42:783-788.
- KIMURA, N.; MIZOKAMI, A.; OONUMA, T.; SASANO, H.; NAGURA, H. 1993. Immunocytochemical Localization of Androgen Receptor with Polyclonal Antibody in Paraffin-embedded Human Tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 41:671-678.
- KITAY, J. 1961. Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. *Endocrinology*. 68:818-824.
- _____. 1963a. Effects of estradiol on pituitary-adrenal function in male and female rats. *Endocrinology*. 72:947-954.
- _____. 1963b. Pituitary-adrenal function in the rat after gonadectomy and gonadal hormone replacement. *Endocrinology*. 73:253-260.
- LADEWIG, J. 2000. Chronic intermitent stress: A model for the study of long-term stressors. IN: *The biology of animal stress*. Moberg G. and Mench J. London, UK., CABI Publishing. 159-169.
- LANIER, J.; GRANDIN, T.; GREEN, R.; AVERY, D.; McGEE, K. 2000. The relationship between reaction to sudden, intermittent movements and sounds and temperament. *Journal of Animal Science*. 78:1467-1474.
- LINCOLN, G.; SHORT, R. 1980. Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Recent Progress in Hormone Research*. 36:1-52.
- LO, M-J.; CHANG, L-L; WANG, P. 2000. Effect of estradiol on corticosterone secretion in ovariectomized rats. *Journal of Cellular Biochemistry*. 77:560-568.
- MACKEY, D.; WYLIE, A.; SREENAN, J.; ROCHE, J.; DISKIN, M. 2000. The effect of acute nutritional change on follicle wave turnover, gonadotropin, and steroid concentration in beef heifers. *Journal of Animal Science*. 78:429-442.
- MATTERI, R.; WATSON, J.; MOBERG, G. 1984. Stress or acute adrenocorticotrophin treatment suppress LHRH-induced LH release in the ram. *Journal of Reproduction and Fertility*. 72:385-393.

McCORMICK, C.; FUREY, B.; CHILD, M.; SAWYER, 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.

McDONALD, L. 1991. *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. Cuarta Edición. México. McGraw-Hill, Interamericana. 551 p.

McEWEN, B.; ALVES, S. 1999. Estrogen Actions in the Central Nervous System. *Endocrine Reviews*. 20:279-307.

MEIKLE, A.; TASENDE, C.; RODRÍGUEZ, M.; GARÓFALO, E. 1997. Effects of oestradiol and progesterone on the reproductive tract and on uterine sex steroid receptors in female lambs. *Theriogenology*. 48:1105-1113.

_____; FORSBERG, M. 2001a. Conceptos básicos sobre progesterona y reproducción bovina. Radioinmunoanálisis (RIA). Control de calidad del radioinmunoensayo (RIA). Uppsala-Swedish. Centre for Reproductive Biology in Uppsala Swedish University of Agricultural Sciences. Department of Clinical Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine. Report 17. 1-34.

_____. 2001b. Reproductive Endocrinology of Prepuberal and Anestrous Ewes. Doctoral Thesis. Department of Clinical Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. Report N° 97, ISSN 1401-6257, ISBN 91-576-5915-X.

MENCH, J. 2000. Preface. IN: *The Biology of Animal Stress. Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. Moberg G. and Mench J. London, UK., CABI publishing. xi-xiii.

MINTON, J.; BLECHA, F. 1990. Effect of acute stressors on endocrinological and immunological functions in lambs. *Journal of Animal Science*. 68:3145-3151.

_____. 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.

MOBERG, G. 1987. Influence of the adrenal axis upon the gonads. IN: *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. 9:456- 496.

_____. 1991. How Behavioral Stress Disrupts the Endocrine Control of Reproduction in Domestic Animals. *Journal of Dairy Science*. 74:304-311.

_____. 2000. Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare. IN: *The Biology of Animal Stress; Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. Moberg, G. and Mench, J. Ed. New York, USA. CABI Publishing. 1-21.

- MOHAMED, F.; COX, J.; MOONAN, V. 1988a. Studies of pituitary-adrenal-testis interaction in sheep. I. The effects of repeated injections of adrenocorticotrophic hormone during the breeding season. *Theriogenology*. 29:849-857.
- _____ ; COX J. 1988b. Studies of pituitary-adrenal-testis interaction in sheep. II. The effects of repeated injections of adrenocorticotrophic hormone outside of the breeding season. *Theriogenology*. 29:859-865.
- MORROW-TESCH, J.; McGLONE, J.; SALAK-JOHNSON, J. 1994. Heat and Social Stress Effects on Pig Immune Measures. *Journal of Animal Science*. 72:2599-2609.
- NANGALAMA, A.; MOBERG, G. 1991. Interaction between cortisol and arachidonic acid on the secretion of LH from ovine pituitary tissue. *Journal of Endocrinology*. 131:87-94.
- 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.
- 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.
- PACÁK, K.; PALKOVITS, M. 2001. Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. *Endocrine Reviews*. 22:502-548.
- PÉREZ, R. 1998. Studies on Seasonal Variation in Testicular Function in Corriedale Rams with Special Emphasis on Nutritional Effects. Doctoral Thesis. Uppsala, Sweden. Swedish University of Agricultural Sciences. 47p.
- PERRY, J.; STALVEY, J. 1992. Gonadal Steroids Modulate Adrenal Fasciculata 3β -Hydroxysteroid Dehydrogenase-Isomerase Activity in Mice. *Biology of Reproduction*. 46:73-82.
- REXROAD, C. 1981a. Estrogen and progesterone binding in the myometrium of the ewe. I. During de estrous cycle. *Journal of Animal Science*. 53:1057-1069.
- _____. 1981b. Estrogen and progesterone binding in the myometrium of the ewe. II. Regulation by estradiol and progesterone. *Journal of Animal Science*. 53:1070-1076.
- 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.
- RUIZEVELD DE WINTER, J.; TRAPMAN, J.; VERMEY, M.; MULDER, E.; ZEGERS, N.; VAN DER KWAST, T. 1991. Androgen Receptor Expression in Human Tissues: An Immunohistochemical Study. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 39:927-936.
- RUSHEN, J. 1996. Using Aversion Learning Techniques to Assess the Mental State, Suffering, and Welfare of Farm Animals. *Journal of Animal Science*. 74:1990-1995.

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.

SENGER, P. 1999. Pathways to pregnancy and parturition. 1er edición. Washington, USA. The Mack Printing Group-Science Press, Ephrata, PA. 247p.

SPENCER, T.; BAZER, F. 1995. Temporal and Spatial Alterations in Uterine Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Gene Expression during the Estrous Cycle and Early Pregnancy in the Ewe. *Biology of Reproduction*. 53:1527-1543.

STAIGMILLER, R.; MOOR, R. 1984. Effect of Follicle Cells on the Maturation and Developmental Competence of Ovine Oocytes Matured Outside the Follicle. *Gamete Research*. 9:221-229.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS. 1999-2000. VERSIÓN 8.01. SAS INSTITUTE INC. CARY, NC, USA.

STOCCO, D. 2001. StAR Protein and the Regulation of Steroid Hormone Biosynthesis. *Physiology*. 63:193-213.

TAKEDA, H.; CHODAK, G.; MUTCHNIK, S.; NAKAMOTO, T.; CHANG, C. 1990. Immunohistochemical localization of androgen receptors with mono-and polyclonal antibodies to androgen receptor. *Journal of Endocrinology*. 126:17-25.

_____ ; NAKAMOTO, T.; KOKONTIS, J.; CHODAK, G.; CHANG, C. 1991. Autoregulation of androgen receptor expression in rodent prostate: immunohistochemical and in situ hybridization analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 177:488-496.

TILBROOK, A.; CANNY, B.; 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*. 160:469-481.

_____ ; 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.

TOWNSON, D.; WANG, X.; KEYES, P.; KOSTYO, J.; STOCCO, D. 1996. Expression of the steroidogenic acute regulatory protein in the corpus luteum of the rabbit: dependence upon the luteotropic hormone, estradiol-17 β . *Biology of Reproduction*. 55:868-874.

TURNER, A.; CANNY, B.; HOBBS, R.; BOND, J.; CLARKE, I. 2002a. 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.

_____ ; RIVALLAND, E.; CLARKE, I.; LAMBERT, G.; MORRIS, M.; TILBROOK, A. 2002b. Noradrenaline, but Not Neuropeptide Y, Is Elevated in Cerebrospinal Fluid from the Third Cerebral Ventricle following Audiovisual Stress in Gonadectomised Rams and Ewes. *Neuroendocrinology*. 76:373-380.

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, ISSN 0348-8659, ISBN 91-576-5560-X.

_____ ; ANDERSSON, H.; PÉREZ, R.; FORSBERG, M. 1998. Effects of Administration of Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH) on Extragonadal Progesterone Levels in Sheep. *Reproduction in Domestic Animals*. 33:55-59.

_____ ; PÉREZ, R.; FORSBERG, M. 1999. Effects of adrenocorticotrophin (ACTH) and progesterone on luteinising hormone (LH) secretion in recently castrated rams. *Animal Reproduction Science*. 755:115-126.

_____ ; PÉREZ, R.; FORSBERG, M. 2003a. Sex differences in cortisol secretion after administration of an ACTH analogue in sheep during the breeding and non-breeding season. *Animal Reproduction Science*. 79:81-92.

_____ ; MEIKLE, A.; BIELLI, A.; AKERBERG, S.; FORSBERG, M.; SAHLIN, L. 2003b. Sex differences in oestrogen receptor levels in adrenal glands of sheep during the breeding season. *Domestic Animal Endocrinology*. 25:373-387.

_____. 2003c. Sex differences in response to adrenocorticotropin (ACTH) administration in sheep. Doctoral Thesis. Department of Clinical Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. Report N° 157, ISSN 1401-6257, ISBN 91-576-6385-8.

VERKERK, G.; MACMILLAN, K. 1997. Adrenocortical Responses to an Adrenocorticotrophic Hormone in Bulls and Steers. *Journal of Animal Science*. 75:2520-2525.

VIAU, V.; MEANEY, M. 1991. Variations in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response to Stress during the Estrous Cycle in the Rat. *Endocrinology*. 129:2503-2511.

_____ ; MEANEY, M. 1996. The inhibitory effect of testosterone on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress is mediated by the medial preoptic area. *Journal of Neuroscience*. 16:1866-1876.

_____ ; CHU, A.; SORIANO, L.; DALLMAN, M. 1999. Independent and overlapping effects of corticosterone and testosterone on corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin

mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and stress-induced adrenocorticotrophic hormone release. *Journal of Neuroscience*. 19:6684-6693.

XIAO, E.; XIA, L.; SHANEN, D.; KHABELE, D.; FERIN, M. 1994. Stimulatory Effects of Interleukin-Induced Activation of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis on Gonadotropin Secretion in Ovariectomized Monkeys Replaced with Estradiol. *Endocrinology*. 135:2093-2098.

YOSHIDA, Ch.; NAKAO, T. 2005. Response of Plasma Cortisol and Progesterone after ACTH Challenge in Ovariectomized Lactating Dairy Cows. *Journal of Reproduction and Development*. 51:99-107.

YOUNG, E. 1995. The Role of Gonadal Steroids in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Regulation. *Critical Reviews in Neurobiology*. 9:371-381.

YOUNG, L; CREWS, D. 1995. Comparative Neuroendocrinology of Steroid Receptor Gene Expression and Regulation: Relationship to Physiology and Behavior. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 6:317-323.

YUKHANANOV, R.; HANDA, R. 1997. Estrogen alters proenkephalin RNAs in the paraventricular nucleus of the hypothalamus following stress. *Brain Research*. 764:109-116.

ZHU, L-J.; HARDY, M.; INIGO, I.; HUHTANIEMI, I.; BARDIN, C.; MOO-YOUNG, A. 2000. Effects of Androgen on Androgen Receptor Expression in Rat Testicular and Epididymal Cells: A Quantitative Immunohistochemical Study. *Biology of Reproduction*. 63:368-376.

14 APÉNDICES

Cuadro 1. Concentraciones de estradiol (pmol/L), en hembras gonadectomizadas sin y con reemplazo hormonal.

Hembras						
	167	311	979	988	Promedio	EEM
Día 32	3.3	3.5	6.3	5.0	4.5	0.7
Día 33	1378	1336	1318	2734	1692	348
Día 34	799	398	451	342	498	103
Día 35 pre-ACTH	174	260	450	63	237	82
Día 35 post-ACTH	239	270	243	103	214	38

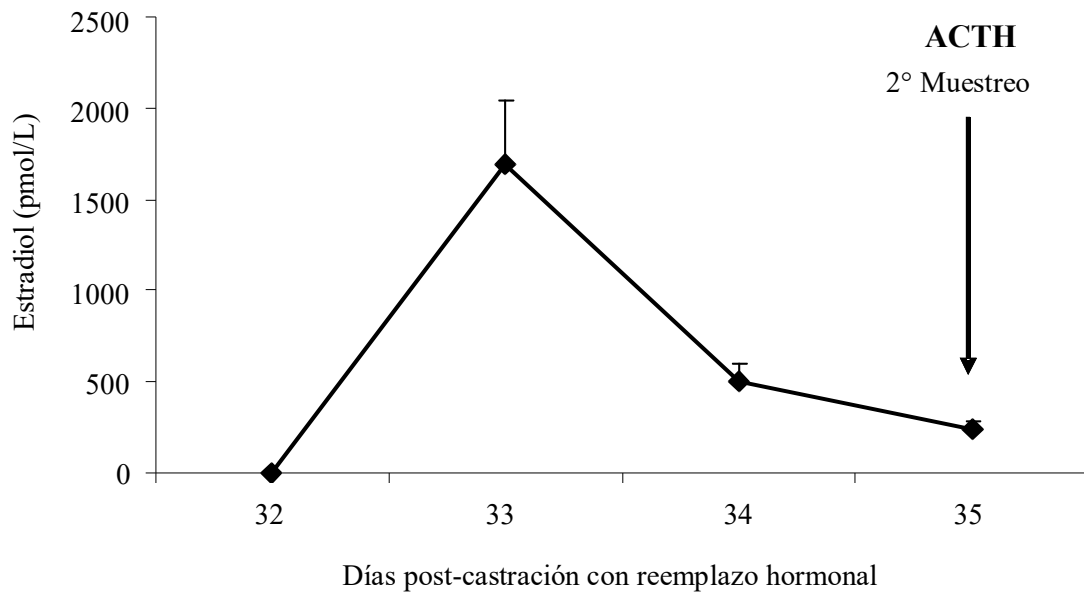


Gráfico 1. Niveles plasmáticos de estradiol (pmol/L) luego del reemplazo con benzoato de estradiol.

Cuadro 2. Cortisol plasmático en hembras sin y con reemplazo

	Tiempo	167	311	979	988	Promedio	EEM
Sin Estradiol	-60	108,0	127,6	94,7	57,1	96,9	14,9
	-30	88,9	64,3	25,5	36,6	53,8	14,3
	0	142,4	91,6	98,7	56,1	97,2	17,7
	15	347,5	268,6	269,8	255,9	285,5	20,9
	30	234,7	304,7	311,1	266,0	279,1	17,8
	45	262,4	292,5	311,0	213,7	269,9	21,2
	60	256,3	317,6	356,8	243,0	293,4	26,6
	75	257,1	363,8	349,6	233,4	301,0	32,7
	90	285,7	329,4	349,0	260,9	306,3	20,1
	105	255,4	300,2	324,7	317,5	299,5	15,6
	120	267,5	250,6	205,7	258,6	245,6	13,7
	150	209,9	134,6	124,3	232,5	175,3	27,0
180	113,5	88,1	97,2	126,8	106,4	8,6	
Con Estradiol	-60	35,0	67,0	31,4	39,2	43,2	8,1
	-30	49,2	32,0	21,6	90,0	48,2	15,1
	0	48,0	75,2	47,2	59,0	57,4	6,5
	15	249,7	374,5	291,2	369,9	321,3	30,6
	30	229,5	370,1	338,3	382,7	330,2	34,8
	45	279,7	398,2	397,9	416,9	373,2	31,5
	60	281,9	419,1	396,4	459,5	389,2	38,1
	75	441,0	414,8	354,1	471,8	420,4	25,0
	90	288,7	396,7	332,7	448,2	366,6	35,1
	105	309,1	394,1	286,3	443,2	358,2	36,6
	120	285,4	343,6	283,4	448,5	340,2	38,7
	150	164,5	180,0	125,0	338,1	201,9	46,9
180	67,2	131,6	89,6	306,7	148,8	54,3	

Cuadro 3. Cortisol plasmático en machos sin y con reemplazo

	Tiempo	415	435	437	442	443	438	Promedio	EEM
Sin Testosterona	-60	21,2	26,8	24,3	26,4	31,7	13,3	24,0	2,6
	-30	36,1	21,5	28,3	29,2	19,1	13,0	24,5	3,4
	0	14,2	20,5	18,9	22,2	19,7	147,0	40,4	21,3
	15	162,6	156,3	106,1	136,5	122,0	156,7	140,0	9,2
	30	133,4	173,8	167,2	188,5	138,4	206,0	167,9	11,5
	45	130,5	204,7	179,7	183,3	162,0	211,2	178,6	12,1
	60	142,6	223,3	160,0	224,4	161,8	233,4	190,9	16,4
	75	144,1	222,0	132,9	224,4	171,5	205,0	183,3	16,2
	90	113,6	197,9	126,1	204,6	199,0	164,6	167,6	16,2
	105	87,5	186,5	119,8	196,5	181,9	182,3	159,1	18,1
	120	68,1	114,4	124,2	172,2	154,7	151,6	130,9	15,2
	150	39,6	69,9	82,5	98,9	111,7	85,3	81,3	10,2
180	29,9	49,5	59,0	91,5	75,4	73,8	63,2	8,9	
Con Testosterona	-60	44,9	26,9	23,7	13,5	20,6	22,1	25,3	4,3
	-30	18,7	12,4	33,3	38,2	33,0	11,9	24,6	4,7
	0	10,7	11,2	37,5	29,6	11,1	15,0	19,2	4,7
	15	100,1	137,0	108,8	138,8	113,3	103,1	116,9	6,9
	30	125,4	157,3	113,7	165,5	137,9	134,8	139,1	7,9
	45	162,1	181,7	106,3	159,1	137,6	153,1	150,0	10,5
	60	125,8	220,7	135,1	193,4	178,1	181,3	172,4	14,7
	75	153,4	183,6	135,2	177,4	170,4	165,8	164,3	7,2
	90	126,8	197,2	133,8	202,5	162,5	144,9	161,3	13,2
	105	130,8	148,4	115,2	183,6	168,7	157,2	150,7	10,2
	120	100,1	125,8	106,6	140,3	136,7	96,7	117,7	7,8
	150	52,0	72,9	110,5	83,9	97,5	41,7	76,4	10,8
180	29,9	39,5	80,4	49,5	62,0	39,9	50,2	7,5	

SAS de cortisol de medidas repetidas

```

OPTIONS LS=90 PS=9000;

DATA CORT2005;
INPUT ANIM SEX$ TRATAMIENTO$ TIEMPO CORT;
CARDS;
415 Macho Sin -60 21.21
415 Macho Sin -30 36.12
... etc
RUN;

PROC MIXED COVTEST DATA=CORT2005;
CLASS ANIM SEX TRATAMIENTO TIEMPO;
MODEL CORT= SEX TRATAMIENTO TIEMPO SEX*TRATAMIENTO SEX*TIEMPO TRATAMIENTO*TIEMPO
SEX*TRATAMIENTO*TIEMPO;
RANDOM ANIM;
REPEATED/TYPE=AR (1) SUBJECT=ANIM(SEX TRATAMIENTO);
LSMEANS SEX*TRATAMIENTO SEX*TIEMPO TRATAMIENTO*TIEMPO SEX*TRATAMIENTO*TIEMPO/ PDIF
ADJ=TUKEY;
LSMEANS SEX*TRATAMIENTO /SLICE=SEX;
LSMEANS SEX*TRATAMIENTO /SLICE=TRATAMIENTO;
LSMEANS SEX*TIEMPO /SLICE=SEX;
LSMEANS SEX*TIEMPO /SLICE=TIEMPO;
LSMEANS TRATAMIENTO*TIEMPO /SLICE=TRATAMIENTO;
LSMEANS TRATAMIENTO*TIEMPO /SLICE=TIEMPO;
LSMEANS SEX*TRATAMIENTO*TIEMPO /SLICE=SEX;
LSMEANS SEX*TRATAMIENTO*TIEMPO /SLICE=TRATAMIENTO;
LSMEANS SEX*TRATAMIENTO*TIEMPO /SLICE=TIEMPO;
LSMEANS SEX*TRATAMIENTO*TIEMPO /SLICE=SEX*TRATAMIENTO;
LSMEANS SEX*TRATAMIENTO*TIEMPO /SLICE=SEX*TIEMPO;
LSMEANS SEX*TRATAMIENTO*TIEMPO /SLICE=TRATAMIENTO*TIEMPO;
RUN;

```

The SAS System

11:21 Saturday, November 23, 2005

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	WORK.CORT2005
Dependent Variable	CORT
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive
Subject Effect	ANIM(SEX*TRATAMIENT)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information

Class	Levels	Values
ANIM	10	167 311 415 435 437 438 442 443 979 988
SEX	2	Hembra Macho
TRATAMIENTO	2	Con Sin
TIEMPO	13	-60 -30 0 15 30 45 60 75 90 105 120 150 180

Dimensions

Covariance Parameters	3
Columns in X	126
Columns in Z	10
Subjects	1
Max Obs Per Subject	260
Observations Used	260
Observations Not Used	0
Total Observations	260

Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	2214.71518999	
1	4	2081.34544463	.
2	1	2081.22940003	0.00000568
3	1	2081.22436957	0.00000003
4	1	2081.22434689	0.00000000

Convergence criteria met.

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate	Standard Error	Z Value	Pr Z
ANIM		34.6091	166.84	0.21	0.4178
AR(1)	ANIM(SEX*TRATAMIENT)	0.6928	0.05706	12.14	<.0001
Residual		1586.46	290.08	5.47	<.0001

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	2081.2
AIC (smaller is better)	2087.2
AICC (smaller is better)	2087.3
BIC (smaller is better)	2088.1

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
SEX	1	200	126.94	<.0001
TRATAMIENTO	1	200	2.17	0.1419
TIEMPO	12	200	73.34	<.0001
SEX*TRATAMIENTO	1	200	7.91	0.0054
SEX*TIEMPO	12	200	10.56	<.0001
TRATAMIENTO*TIEMPO	12	200	2.25	0.0110
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	12	200	2.94	0.0009

Tests of Effect Slices

Effect	SEX	TRATAMIENTO	TIEMPO	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
SEX*TRATAMIENTO	Hembra			1	200	7.66	0.0062
SEX*TRATAMIENTO	Macho			1	200	1.12	0.2912
SEX*TRATAMIENTO		Con		1	200	102.68	<.0001
SEX*TRATAMIENTO		Sin		1	200	39.40	<.0001
SEX*TIEMPO	Hembra			12	200	57.01	<.0001
SEX*TIEMPO	Macho			12	200	19.37	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Hembra	Con		12	200	40.61	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Hembra	Sin		12	200	20.55	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Macho	Con		12	200	9.27	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Macho	Sin		12	200	10.34	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Hembra		-60	1	200	3.63	0.0581
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Hembra		-30	1	200	0.04	0.8413
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Hembra		0	1	200	2.00	0.1588
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Hembra		15	1	200	1.63	0.2038
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Hembra		30	1	200	3.28	0.0714
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Hembra		45	1	200	13.44	0.0003
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Hembra		60	1	200	11.57	0.0008
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Hembra		75	1	200	17.98	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Hembra		90	1	200	4.59	0.0334
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Hembra		105	1	200	4.35	0.0383
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Hembra		120	1	200	11.28	0.0009
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Hembra		150	1	200	0.89	0.3466
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Hembra		180	1	200	2.27	0.1336
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Macho		-60	1	200	0.00	0.9536
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Macho		-30	1	200	0.00	0.9980
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Macho		0	1	200	0.85	0.3569
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Macho		15	1	200	1.02	0.3143
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Macho		30	1	200	1.57	0.2119
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Macho		45	1	200	1.55	0.2151
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Macho		60	1	200	0.65	0.4222
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Macho		75	1	200	0.68	0.4091
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Macho		90	1	200	0.08	0.7820
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Macho		105	1	200	0.14	0.7137
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Macho		120	1	200	0.33	0.5680
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Macho		150	1	200	0.05	0.8304
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO	Macho		180	1	200	0.32	0.5731
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Con	-60	1	200	0.47	0.4923
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Con	-30	1	200	0.82	0.3649
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Con	0	1	200	2.16	0.1436
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Con	15	1	200	61.90	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Con	30	1	200	54.05	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Con	45	1	200	73.73	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Con	60	1	200	69.59	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Con	75	1	200	97.12	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Con	90	1	200	62.41	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Con	105	1	200	63.77	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Con	120	1	200	73.31	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Con	150	1	200	23.31	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Con	180	1	200	14.39	0.0002
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Sin	-60	1	200	7.87	0.0055
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Sin	-30	1	200	1.27	0.2609
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Sin	0	1	200	4.77	0.0301
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Sin	15	1	200	31.29	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Sin	30	1	200	18.32	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Sin	45	1	200	12.34	0.0005
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Sin	60	1	200	15.56	0.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Sin	75	1	200	20.50	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Sin	90	1	200	28.45	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Sin	105	1	200	29.17	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Sin	120	1	200	19.50	<.0001
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Sin	150	1	200	13.07	0.0004
SEX*TRATAMIENT*TIEMPO		Sin	180	1	200	2.76	0.0981

SAS Pre y Post-ACTH dentro de cada grupo

```

OPTIONS LS=90 PS=9000;
DATA CORTPROM2005;
INPUT ANIM SEX$ TRATAMIENTO$ TIPO$ CORT;
CARDS;
415 Macho Sin pre 23.85333333
...
988 Hembra Con post 408.54
RUN;

PROC MIXED COVTEST DATA=CORTPROM2005;
CLASS ANIM SEX TRATAMIENTO TIPO;
MODEL CORT= SEX TRATAMIENTO TIPO SEX*TRATAMIENTO SEX*TIPO TRATAMIENTO*TIPO
SEX*TRATAMIENTO*TIPO;
LSMEANS SEX*TRATAMIENTO SEX*TIPO TRATAMIENTO*TIPO SEX*TRATAMIENTO*TIPO/ PDIFF ADJ=TUKEY;
RUN;

```

The SAS System 08:56 Thursday, December 12, 2005

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	WORK.CORTPROM2005
Dependent Variable	CORT
Covariance Structure	Diagonal
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Residual

Class Level Information

Class	Levels	Values
ANIM	10	167 311 415 435 437 438 442 443 979 988
SEX	2	Hembra Macho
TRATAMIENTO	2	Con Sin
TIPO	2	post pre

Dimensions

Covariance Parameters	1
Columns in X	27
Columns in Z	0
Subjects	1
Max Obs Per Subject	40
Observations Used	40
Observations Not Used	0
Total Observations	40

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Estimate	Standard Error	Z Value	Pr > Z
Residual	688.07	172.02	4.00	<.0001

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	312.6
AIC (smaller is better)	314.6
AICC (smaller is better)	314.7
BIC (smaller is better)	316.1

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
SEX	1	32	128.95	<.0001
TRATAMIENTO	1	32	0.14	0.7092
TIPO	1	32	394.36	<.0001
SEX*TRATAMIENTO	1	32	3.01	0.0923
SEX*TIPO	1	32	44.33	<.0001
TRATAMIENTO*TIPO	1	32	7.39	0.0105
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	1	32	10.87	0.0024

Differences of Least Squares Means

Effect	SEX	TRATAMIENTO	TIPO	_SEX	_TRATAMIENTO	_TIPO	Adj P
SEX*TIPO	Hembra		post	Hembra		pre	<.0001
SEX*TIPO	Hembra		post	Macho		post	<.0001
SEX*TIPO	Hembra		post	Macho		pre	<.0001
SEX*TIPO	Hembra		pre	Macho		post	<.0001
SEX*TIPO	Hembra		pre	Macho		pre	0.0115
SEX*TIPO	Macho		post	Macho		pre	<.0001
TRATAMIENTO*TIPO		Con	post		Con	pre	<.0001
TRATAMIENTO*TIPO		Con	post		Sin	post	0.1482
TRATAMIENTO*TIPO		Con	post		Sin	pre	<.0001
TRATAMIENTO*TIPO		Con	pre		Sin	post	<.0001
TRATAMIENTO*TIPO		Con	pre		Sin	pre	0.3627
TRATAMIENTO*TIPO		Sin	post		Sin	pre	<.0001
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Con	post	Hembra	Con	pre	<.0001
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Con	post	Hembra	Sin	post	0.0159
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Con	post	Hembra	Sin	pre	<.0001
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Con	post	Macho	Con	post	<.0001
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Con	post	Macho	Con	pre	<.0001
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Con	post	Macho	Sin	post	<.0001
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Con	pre	Hembra	Sin	post	<.0001
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Con	pre	Hembra	Sin	pre	0.6360
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Con	pre	Macho	Con	post	0.0010
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Con	pre	Macho	Con	pre	0.7651
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Con	pre	Macho	Sin	post	<.0001
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Con	pre	Macho	Sin	pre	0.9326
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Sin	post	Hembra	Sin	pre	<.0001
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Sin	post	Macho	Con	post	<.0001
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Sin	post	Macho	Con	pre	<.0001
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Sin	post	Macho	Sin	post	<.0001
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Sin	post	Macho	Sin	pre	<.0001
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Sin	pre	Macho	Con	post	0.1329
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Sin	pre	Macho	Con	pre	0.0255
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Sin	pre	Macho	Sin	post	0.0140
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Hembra	Sin	pre	Macho	Sin	pre	0.0643
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Macho	Con	post	Macho	Con	pre	<.0001

SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Macho	Con	post	Macho	Sin	post	0.9559
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Macho	Con	post	Macho	Sin	pre	<.0001
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Macho	Con	pre	Macho	Sin	post	<.0001
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Macho	Con	pre	Macho	Sin	pre	0.9998
SEX*TRATAMIENTO*TIPO	Macho	Sin	post	Macho	Sin	pre	<.0001

SAS Pre y Post-ACTH por tipo entre grupos

```

OPTIONS LS=90 PS=9000;
DATA CORTPROM2005;
INPUT ANIM SEX$ TRATAMIENTO$ TIPO$ CORT;
CARDS;
415 Macho Sin pre 23.85333333
...
988 Hembra Con post 408.54
RUN;

```

```

PROC SORT DATA=CORTPROM2005;
BY TIPO;
RUN;

```

```

PROC MIXED COVTEST DATA=CORTPROM2005;
CLASS ANIM SEX TRATAMIENTO TIPO;
BY TIPO;
MODEL CORT= SEX TRATAMIENTO SEX*TRATAMIENTO;
LSMEANS SEX*TRATAMIENTO / PDIFF ADJ=TUKEY;
RUN;

```

The SAS System

08:56 Thursday, December 12, 2005

----- TIPO=post -----

The Mixed Procedure
Model Information

Data Set	WORK.CORTPROM2005
Dependent Variable	CORT
Covariance Structure	Diagonal
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Residual

Class Level Information

Class	Levels	Values
ANIM	10	167 311 415 435 437 438 442 443 979 988
SEX	2	Hembra Macho
TRATAMIENTO	2	Con Sin
TIPO	1	post

Dimensions	
Covariance Parameters	1
Columns in X	9
Columns in Z	0
Subjects	1
Max Obs Per Subject	20
Observations Used	20
Observations Not Used	0
Total Observations	20

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Estimate	Standard Error	Z Value	Pr Z
Residual	1132.44	400.38	2.83	0.0023

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	164.3
AIC (smaller is better)	166.3
AICC (smaller is better)	166.6
BIC (smaller is better)	167.0

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
SEX	1	16	98.58	<.0001
TRATAMIENTO	1	16	2.91	0.1074
SEX*TRATAMIENTO	1	16	7.69	0.0136

Differences of Least Squares Means

Effect	SEX	TRATAMIENTO	_SEX	_TRATAMIENTO	Adjustment	Adj P
SEX*TRATAMIENTO	Hembra	Con	Hembra	Sin	Tukey-Kramer	0.0472
SEX*TRATAMIENTO	Hembra	Con	Macho	Con	Tukey-Kramer	<.0001
SEX*TRATAMIENTO	Hembra	Con	Macho	Sin	Tukey-Kramer	<.0001
SEX*TRATAMIENTO	Hembra	Sin	Macho	Con	Tukey-Kramer	0.0001
SEX*TRATAMIENTO	Hembra	Sin	Macho	Sin	Tukey-Kramer	0.0006
SEX*TRATAMIENTO	Macho	Con	Macho	Sin	Tukey-Kramer	0.8328

----- TIPO=pre -----

The Mixed Procedure
Model Information

Data Set	WORK.CORTPROM2005
Dependent Variable	CORT
Covariance Structure	Diagonal
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Residual

Class	Class Level Information							
	Levels	Values						
ANIM	10	167	311	415	435	437	438	442
		443	979	988				
SEX	2	Hembra Macho						
TRATAMIENTO	2	Con Sin						
TIPO	1	pre						

Dimensions	
Covariance Parameters	1
Columns in X	9
Columns in Z	0
Subjects	1
Max Obs Per Subject	20
Observations Used	20
Observations Not Used	0
Total Observations	20

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Estimate	Standard Error	Z Value	Pr > Z
Residual	243.69	86.1577	2.83	0.0023

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	139.7
AIC (smaller is better)	141.7
AICC (smaller is better)	142.0
BIC (smaller is better)	142.5

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
SEX	1	16	31.15	<.0001
TRATAMIENTO	1	16	7.75	0.0133
SEX*TRATAMIENTO	1	16	3.44	0.0820

Differences of Least Squares Means

Effect	SEX	TRATAMIENTO	_SEX	_TRATAMIENTO	Adjustment	Adj P
SEX*TRATAMIENTO	Hembra	Con	Hembra	Sin	Tukey-Kramer	0.0386
SEX*TRATAMIENTO	Hembra	Con	Macho	Con	Tukey-Kramer	0.0766
SEX*TRATAMIENTO	Hembra	Con	Macho	Sin	Tukey-Kramer	0.2367
SEX*TRATAMIENTO	Hembra	Sin	Macho	Con	Tukey-Kramer	0.0001
SEX*TRATAMIENTO	Hembra	Sin	Macho	Sin	Tukey-Kramer	0.0004
SEX*TRATAMIENTO	Macho	Con	Macho	Sin	Tukey-Kramer	0.8821