



UBA
Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Veterinarias

**ESTUDIO DEL AREA CORTICOTROPA DEL PERRO EN RELACIÓN
AL SEXO Y VARIACIONES ESTACIONALES**

Autor: Vet. Gallelli, María Florencia

Director: Prof. Dr. Castillo, Víctor Alejandro

Co-Director: Dra. Meikle, Ana

Lugar de desarrollo de la tesis: Hospital Escuela de Medicina Veterinaria,
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires y Laboratorio de
Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República,
Montevideo, Uruguay.

Año: 2015

Agradecimientos

A los integrantes del Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República (Uruguay), por su ayuda para realizar las técnicas de inmunohistoquímica, especialmente a la Dra. Paula Pessina y a Isabel Sartore.

A la Dra. Alejandra Quiroga y a la Dra. Natalia Caggiano del Área de Patología Especial, Fac. de Cs. Veterinarias, UNLP; al Dr. Roberto Olivares de la Cátedra de Patología Básica, FCV, UBA, y al Dr. Elber Soler, por su colaboración para la obtención de muestras histológicas.

A la Dra. Norma Monachesi por su incondicional ayuda para el seguimiento de los ciclos estrales de las perras, y por su apoyo en estos años de trabajo.

Al Dr. Lombardo por brindarme un lugar en la Cátedra de Histología para poder realizar los ensayos de inmunohistoquímica y por su ayuda en el aprendizaje de análisis de imágenes; y a los integrantes de esta cátedra que han colaborado para poder llevar adelante esta tesis. Especialmente a Maxi por la ayuda brindada para realizar este trabajo, y por sus consejos y apoyo en estos años.

A los encargados del área de caniles, Silvana y Cristian, por su predisposición y ayuda en el trabajo realizado con los perros.

A los integrantes del DBBE, Fac. de Ciencias Exactas (UBA): Dra. Paula Vissio, Dra. Paula Di Yorio, Lic. Daniela Perez Sirkin y Dr. Dante Paz, por recibirme en su lugar de trabajo y por su invaluable ayuda para realizar la técnica de doble inmunofluorescencia.

A mis compañeros de trabajo y amigos de la cátedra de Física Biológica por su apoyo a lo largo de estos años; especialmente a Pablo, por sus consejos y por estar siempre presente.

A Víctor, mi director, por darme la posibilidad de realizar este proyecto.

A mi familia, por haberme dado la posibilidad de estudiar, y de seguir formándome.

A mi compañero de la vida, Cristian, por haberme acompañado y apoyado en este recorrido.

Los resultados presentados en esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

- “Variación de ACTH, α -MSH y cortisol en relación a los cambios de Estrógenos y Progesterona en el ciclo estral de la perra.” Gallelli, MF ; Cabrera Blatter, MF; Gómez, NV ; Castillo, V. Presentacion de poster en el VIII Congreso de la Federación Iberoamericana de Asociaciones Veterinarias de animales de compañía (FIAVAC). Punta del Este, Uruguay, 2011.
- “Variación de ACTH, α -MSH y cortisol plasmáticos durante el ciclo estral de la perra.” Gallelli, M.F., Monachesi, N., Miceli, D., Cabrera Blatter, M.F., Meikle, A., Castillo, V.A. Comunicación oral presentada en el IX Congreso de la Federación Argentina de Sociedades de Endocrinología. Salta, Argentina, 2012.
- “Dimorfismo sexual de las células corticotropas y zona fascicular de la corteza suprarrenal del perro.” Gallelli, M.F., Lombardo, D., Cabrera Blatter, M.F., Miceli, D., Quiroga, A., Caggiano, N., Meikle, A., Castillo, V.A. Comunicación oral presentada en el IX Congreso de la Federación Argentina de Sociedades de Endocrinología. Salta, Argentina, 2012.
- Plasma ACTH, α -MSH and cortisol variations in the dog during the oestrous cycle in different photoperiods. Gallelli MF, Monachesi N, Miceli D, Cabrera Blatter MF, Gomez N, Meikle A, Castillo V. Veterinarni Medicina 2015, 60, 567-577
- Immunohistochemical analysis of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in dogs: sex-linked and seasonal variation. María F. Gallelli, Daniel Lombardo, Paula Vissio, Alejandra Quiroga, Natalia Caggiano, Elber Soler, Ana Meikle, Víctor A. Castillo. Research in Veterinary Science 2016, 104, 10-16

Índice

I.Abreviaturas	6
II.Resumen	7
II.Summary	10
III.Introducción	13
III.-A. Eje Hipotálamo-hipofisario-adrenal.....	14
III.-A.1-Hipotálamo.....	14
Embriología	14
Anatomía	16
Histología.....	17
Fisiología	20
III.-A.2- Hipófisis	23
Embriología	23
Anatomía	29
Histología.....	33
Fisiología	35
III.-A.3-Glándulas adrenales	39
Embriología	39
Anatomía	40
Histología.....	42
Fisiología	43
III.-B. Eje Hipotálamo-hipofisario-gonadal: regulación hormonal y ciclo estral.....	49
III.-C. Dimorfismo sexual del eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal	55

III.-D. Expresión de receptores a esteroides sexuales en distintas regiones del eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal	57
III.-E. Variaciones estacionales en el eje HHA	58
III.-F. Mecanismos de desarrollo tumoral en la hipófisis	59
III.-G. Consideraciones finales	60
IV. Hipótesis	61
V. Objetivos	63
VI. Materiales y métodos	66
VII. Resultados	78
VIII. Discusión.....	98
IX. Bibliografía	118

Abreviaturas

α -MSH: Melanotrofina alfa

ACTH: Adrenocorticotrofina

AE: Anestro

CRH: Hormona liberadora de corticotrofina

DE: Diestro

E: Estro

E2: Estradiol

HAD: Hormona antidiurética

HHA: Hipotálamo-hipofisario-adrenal

MC2R: Receptor de melanocortina tipo 2

P4: Progesterona

PE: Proestro

POMC: Proopiomelanocortina

RE α : Receptor de estrógenos alfa

T: Testosterona

Ph-: Fotoperiodo negativo

Ph+: Fotoperiodo positivo

PVN: Núcleo Paraventricular

Resumen

El dimorfismo sexual tanto morfológico como funcional del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal ha sido descrito en diversas especies; así como también existen reportes acerca de la influencia de la estacionalidad sobre dicho eje. Sin embargo, no existen estudios que analicen estas características en el perro. Por lo tanto el objetivo del presente estudio fue determinar si en el perro existen variaciones en las hormonas del eje HHA (adrenocorticotrofina [ACTH], melanotrofina-alfa [α -MSH] y cortisol) de acuerdo al sexo, estatus gonadal (castrado o no) y al fotoperiodo (positivo o negativo) en condiciones basales (anestro) y durante el ciclo estral.

Asimismo se propuso evaluar si en el perro existe dimorfismo sexual morfológico del área corticotropa de la hipófisis y de la zona fascicular de la corteza adrenal; y si el mismo se ve afectado por la estacionalidad. Además se evaluó si el receptor de estrógenos alfa (RE α) se expresa en los tejidos mencionados y si el receptor de progesterona (RP) se expresa en la zona fascicular adrenal.

En el caso del análisis hormonal, la población de estudio consistió en perras no castradas (n=11), perros machos no castrados (n=6), machos castrados (n=5) y hembras castradas (n=6).

El estudio morfológico se realizó mediante un análisis inmunohistoquímico en hipófisis y adrenales obtenidas en fotoperiodo negativo (hembras [n=7] y machos [n=7]) y en fotoperiodo positivo (hembras [n=7] y machos [n=7]), para ACTH en hipófisis, y para RE α , el RP y el receptor para ACTH (melanocortin-2-receptor, MC2R) en la glándula adrenal. Se realizó una doble inmunofluorescencia para poder co-localizar al RE α y a la ACTH (para poder identificar si las células corticotropas expresan dicho receptor). En hipófisis se analizó la proporción de células corticotropas por campo, su área celular, citoplasmática y

nuclear, y la densidad óptica de su inmunomarcación. La expresión del RE α y RP se analizó mediante la proporción de células positivas por campo y la del MC2R mediante la densidad óptica.

En condiciones basales (machos castrados y no castrados, hembras castradas y hembras en anestro) la ACTH, la α -MSH y el cortisol no se vieron afectados por el sexo ni el estatus gonadal. Por el contrario, el cortisol se encontró más elevado en el fotoperiodo negativo que en el positivo en todos los grupos ($P<0.05$), excepto en las hembras en anestro. Durante el ciclo estral, todas las hormonas estudiadas presentaron variaciones ($P<0.0001$). Las mayores concentraciones de ACTH se observaron en el proestro, mientras que la α -MSH y el cortisol presentaron las máximas concentraciones en el estro. Las tres hormonas disminuyeron en el diestro. La ACTH y el cortisol se encontraron más elevadas en el fotoperiodo negativo ($P=0.04$ and $P<0.0001$, respectivamente), mientras que la α -MSH fue mayor en el fotoperiodo positivo ($P=0.012$). En el grupo de perras no castradas, el estradiol y la progesterona correlacionaron con la ACTH ($r=0.75$, $P<0.0001$; $r=0.34$, $P<0.01$, respectivamente), α -MSH ($r=0.49$, $P<0.0001$; $r=0.52$, $P<0.0001$, respectivamente) y el cortisol ($r=0.33$, $P<0.01$; $r=0.5$, $P<0.0001$, respectivamente).

A partir del análisis morfológico se encontró que las hembras presentaron mayor cantidad de células corticotropas/totales por campo en ambos fotoperiodos ($p<0.01$). El área celular y citoplasmática de las mismas fue mayor en hembras que en machos en ambos fotoperiodos ($p<0.001$). No se encontraron diferencias significativas en estos parámetros entre estaciones para ninguno de los sexos. La densidad óptica de las células corticotropas fue mayor en hembras que en machos en ambos fotoperiodos ($p<0.001$); así como también fue mayor en fotoperiodo negativo que en fotoperiodo positivo en ambos sexos ($p<0.001$). El RE α fue identificado en la zona fascicular adrenal, siendo su expresión mayor en hembras que en machos ($p<0.001$). La densidad óptica de la

inmunomarcación para MC2R fue mayor en hembras que en machos ($p < 0.001$). No se encontró inmunomarcación para RP. En ambos sexos la expresión de los dos receptores fue mayor en fotoperiodo negativo ($p < 0.001$). El RE α fue identificado en algunas células corticotropas, pero dada su baja expresión no se realizó un análisis cuantitativo.

Estos resultados evidencian que existe dimorfismo sexual tanto morfológico como funcional del eje HHA en el perro. Asimismo es la primera vez que se identifica la expresión del RE α en las corticotropas y corteza adrenal en dicha especie, postulándose un sitio de acción para el estradiol. De esta forma el estradiol podría tener un rol regulador sobre el eje HHA. Asimismo se observaron variaciones morfológicas y hormonales entre fotoperiodos, que podrían relacionarse con adaptaciones climáticas o metabólicas; las cuales quedan pendientes de estudio.

Summary

The morphological and functional sexual dimorphism of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) has been described in various species. There are also some reports about the seasonal variations of this axis. However there are no studies about sexual dimorphism and seasonal variations of this axis in the dog. Thus the objective of this study was to determine whether there are variations in the dog's HPA hormones (adrenocorticotrophin [ACTH], alfa-melanocyte-stimulating hormone [α -MSH] and cortisol) according to the sex, gonadal status (neutered or not) and photoperiod (positive or negative) in basal condition (like anoestrus) and along the oestrous cycle.

Furthermore, this study evaluated if the dog shows morphological sexual dimorphism of the corticotroph area of the pituitary gland and zona fasciculata of the adrenal gland; and determined whether these tissues show seasonal variations. The expression of oestrogen receptor alpha (ER α) in the corticotroph cells and zona fasciculata was also evaluated, as well as the progesterone receptor (PR) in the fasciculate zone.

In the hormonal assay, the population under study consisted in intact females (n=11), intact males (n=6), neutered males (n=5) and neutered females (n=6).

The morphological study was performed by means of an immunohistochemical analysis of pituitary and adrenal glands obtained in negative photoperiod (females [n = 7] and males [n = 7]) and positive photoperiod (females [n = 7] and males [n = 7]) for ACTH in the pituitary gland and for ER α , PR and for the ACTH receptor (melanocortin-2-receptor, MC2R) in the adrenal gland. Double immunofluorescence was performed to identify ER α in corticotrophs. The pituitary gland analysis included the proportion of corticotrophs per field, corticotroph cellular, nuclear, and cytoplasmic area, and their optical density. The

ER α and PR expression was evaluated by the proportion of positive cells per field, and MC2R expression was evaluated through the optical density.

In basal condition (intact males, neutered males, neutered females and intact females in anestrus) ACTH, α -MSH and cortisol were not affected by the sex or the gonadal status. By contrast, cortisol showed greater values in negative photoperiod than in positive in all the studied groups ($P < 0.05$) except for the intact females in anestrus. Along the oestrous cycle, all the studied hormones showed variations ($P < 0.0001$). The greatest concentrations of ACTH were observed at proestrus, while α -MSH and cortisol showed their greatest concentrations at oestrus. The three hormones decreased in diestrus. ACTH and cortisol concentrations were higher at negative photoperiod ($P = 0.04$ and $P < 0.0001$, respectively), while α -MSH concentrations were higher at positive photoperiod ($P = 0.012$). In the group of females oestradiol and progesterone correlated with ACTH ($r = 0.75$, $P < 0.0001$; $r = 0.34$, $P < 0.01$, respectively), α -MSH ($r = 0.49$, $P < 0.0001$; $r = 0.52$, $P < 0.0001$, respectively) and cortisol ($r = 0.33$, $P < 0.01$; $r = 0.5$, $P < 0.0001$, respectively).

The morphological study revealed that females had a greater proportion of corticotroph cells/total cells per field ($p < 0.01$). Both cellular and cytoplasmic areas of these cells were greater in females than in males in both photoperiods ($p < 0.001$). No significant differences were found for these parameters between photoperiods in either sex. Optical density of corticotrophs was greater in females than males in both photoperiods ($p < 0.001$) and greater in negative photoperiod than in positive photoperiod for both sexes ($p < 0.001$). ER α was identified in the adrenal zona fasciculata and expressed at higher levels in females than in males ($p < 0.001$). The optical density of MC2R immunostaining was greater in females than in males ($p < 0.001$). Immunostaining for PR was not found. The expression of both receptors was greater in negative photoperiod in both males and

females ($p < 0.001$). ER α was identified in some corticotrophs; however, a quantitative analysis was not conducted because of low expression.

These results provide evidence that the dog shows both morphological and functional sexual dimorphism of the HPA axis. Furthermore, these findings are the first to demonstrate ER α expression in corticotrophs and the adrenal cortex in this species, suggesting a site for oestradiol action. Binding to its receptor, oestradiol could exert a regulatory action on the HPA axis. There are also hormonal and morphological differences between photoperiods, which could be related to climatic or metabolic adaptations that remain to be studied.

III. INTRODUCCIÓN

I) INTRODUCCIÓN

I.-A. Eje Hipotálamo-hipofisario-adrenal

El eje Hipotálamo- hipofisario-adrenal (HHA) se encuentra constituido por tres tejidos que presentan distintas características embriológicas, anatómicas, histológicas y fisiológicas (Panagiotakopoulos y Neigh, 2014); las cuales es necesario conocer para tener una visión integral del mismo.

I.-A.1-Hipotálamo

Embriología

En el proceso de gastrulación se establecen las tres capas germinales en el embrión: el endodermo, el mesodermo y el ectodermo.

El ectodermo que se encuentra sobre la notocorda (cordón conformado por células prenotocordales derivadas del epiblasto) forma la placa neural; denominándose entonces, neuroectodermo. Los bordes de la placa neural se elevan y pliegan hasta fusionarse, conformando el tubo neural (Sadler, 2005).

A partir del extremo cefálico del tubo neural, se forman las tres vesículas cerebrales primarias: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. Posteriormente el prosencéfalo se subdivide en telencéfalo y diencefalo, mientras que el rombencéfalo se subdivide en metencéfalo y mielencéfalo (Fig.1).

El diencefalo consiste en una placa del techo y dos placas alares, careciendo de placas de piso y basales. A partir de la placa del techo se forma la epífisis; mientras que una

hendidura divide a las placas alares en una porción dorsal, el tálamo; y una porción ventral, el hipotálamo (Altman y Bayer, 1978).

El hipotálamo se diferencia en varios grupos neuronales que actúan como centros de regulación de distintas funciones del organismo.

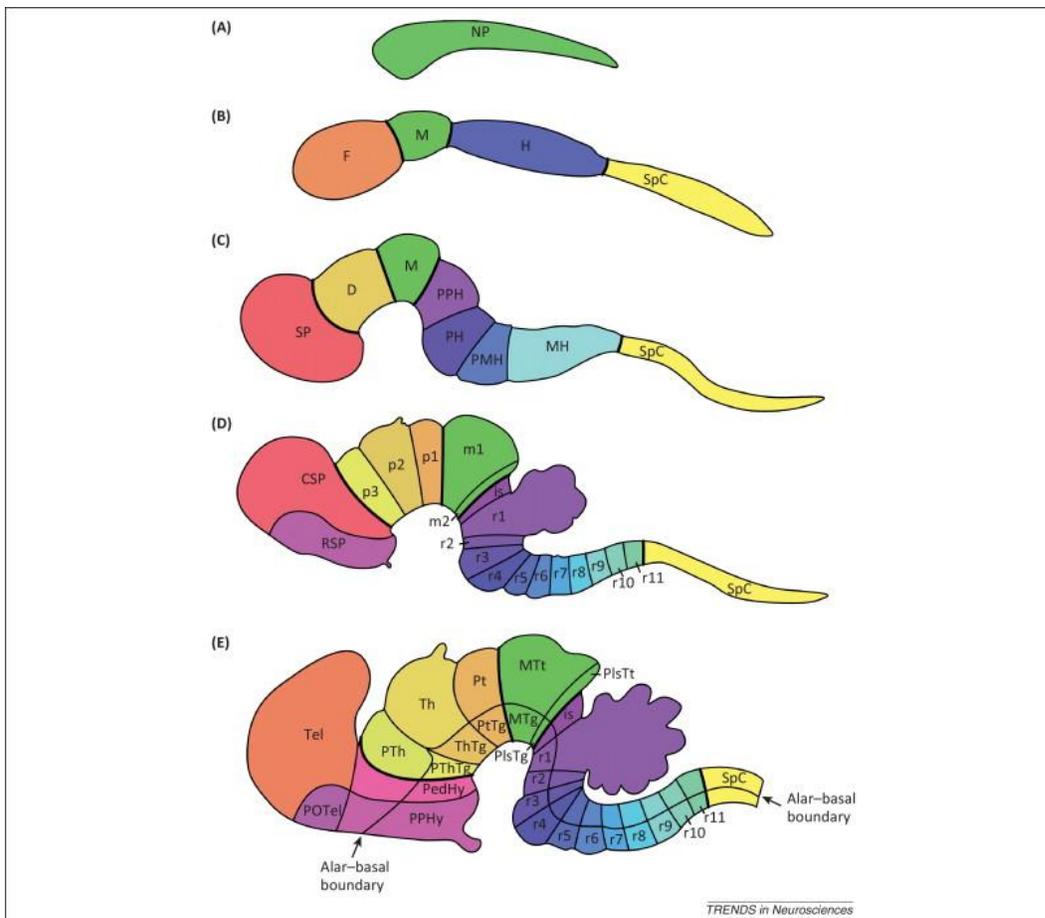


Fig.1. Esquemas del desarrollo del sistema nervioso central en el ratón.

(A) Vista lateral del tubo neural, (B) Divisiones en las primeras vesículas cerebrales (F: cerebro anterior o prosencéfalo, M: cerebro medio o mesencéfalo, H: rombencéfalo, SpC: médula espinal), (C) El prosencéfalo da lugar al diencéfalo (D). (D) Las vesículas cerebrales continúan diferenciándose, (E) El diencéfalo continúa diferenciándose y forma el tálamo (Th) y el hipotálamo (PPHy). (Ref. Puelles et al, 2013)

Anatomía

En mamíferos, el hipotálamo se encuentra ventral al tálamo y forma las paredes laterales y piso del tercer ventrículo. Se encuentra limitado en dirección rostral por el quiasma óptico, hacia ambos lados por las cintillas ópticas y hacia caudal, por los cuerpos mamilares (Fig.2). Se reconocen cuatro regiones rostro-caudales: preóptica (en la que se encuentra el núcleo preóptico), anterior o supraóptica (en la que se encuentran los núcleos supraóptico y paraventricular, y el área hipotalámica anterior) tuberal (en la que se encuentran los núcleos arcuato, tuberal, dorsomedial y ventromedial) y mamilar (en la que se encuentran los núcleos hipotalámico posterior y mamilar); y tres regiones medio-laterales: periventricular, medial y lateral. La región periventricular contiene a los núcleos paraventricular, arcuato, supraquiasmático y periventricular; la región medial contiene a los núcleos preóptico medial, hipotalámico anterior, dorsomedial, ventromedial y mamilar. La región lateral está constituida por el area preóptica y el área hipotalámica lateral (Netter, 2010; Szarek et al., 2010).

La zona que forma el piso del tercer ventrículo se llama eminencia media; la misma constituye la interfase anatómica entre vías nerviosas centrales y la hipófisis. La eminencia media consiste en una franja de tejido que se extiende hacia la pars tuberalis de la adenohipófisis y se comunica con la neurohipófisis a través del tallo infundibular (Palkovitz, 1987; Kobayashi et al., 1999) (Fig.3).

El hipotálamo se encuentra ocupado por una matriz difusa de células que constituyen la sustancia gris central, en la cual se encuentran masas nucleares más o menos diferenciadas, denominadas núcleos o áreas hipotalámicas.

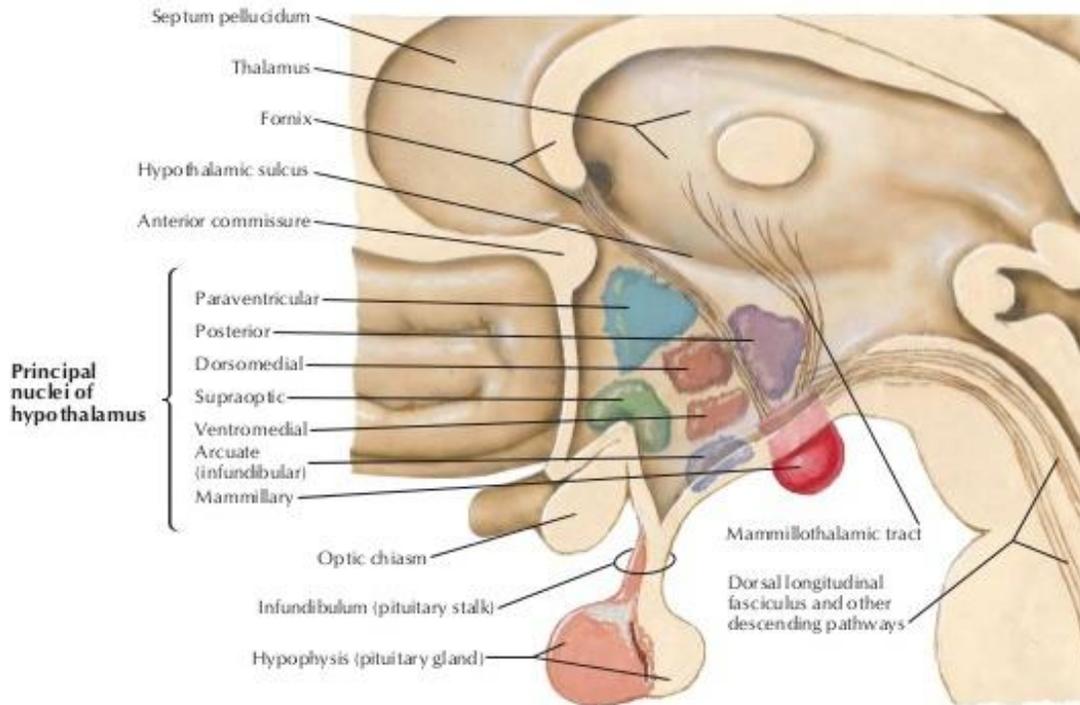


Fig.2. El hipotálamo y los núcleos hipotalámicos en un corte sagital. Se observa su relación con el quiasma óptico (en rostral), el tálamo (en dorsal), el haz mamilo-talámico (en caudal) y la hipófisis (en ventral). (Ref. Netter, 2010).

Histología

Como se mencionara previamente, el hipotálamo se encuentra ocupado por los núcleos hipotalámicos; los cuales se encuentran conformados por neuronas. La comunicación entre estos núcleos y la hipófisis se produce mediante el tallo hipofisario (Fig.3). Los núcleos paraventricular y supraóptico contienen neuronas magnocelulares que proyectan sus axones hacia la neurohipófisis liberando oxitocina y hormona antidiurética o vasopresina (HAD) (Swanson y Sawchenko, 1983). Los mismos tienen redes capilares

muy extensas y las neuronas que los conforman se denominan “neuronas neurosecretoras”. Las neuronas parvocelulares (de menor tamaño que las magnocelulares) de éstos y otros núcleos hipotalámicos regulan la secreción de las hormonas hipofisarias, liberando factores de liberación o inhibición en la zona de la eminencia media, en forma contigua a la red capilar primaria del sistema porta hipofisario (Yeung et al., 2006) (Fig.4). La hormona liberadora de corticotrofina (CRH), que estimula la secreción de ACTH en la hipófisis (ver sección “Fisiología”), es producida en el núcleo paraventricular. Este núcleo, además de estar conformado por neuronas parvocelulares y magnocelulares neurosecretoras, contiene neuronas de larga proyección que comunican con regiones del cerebro posterior y médula espinal (Handa y Weiser, 2014).

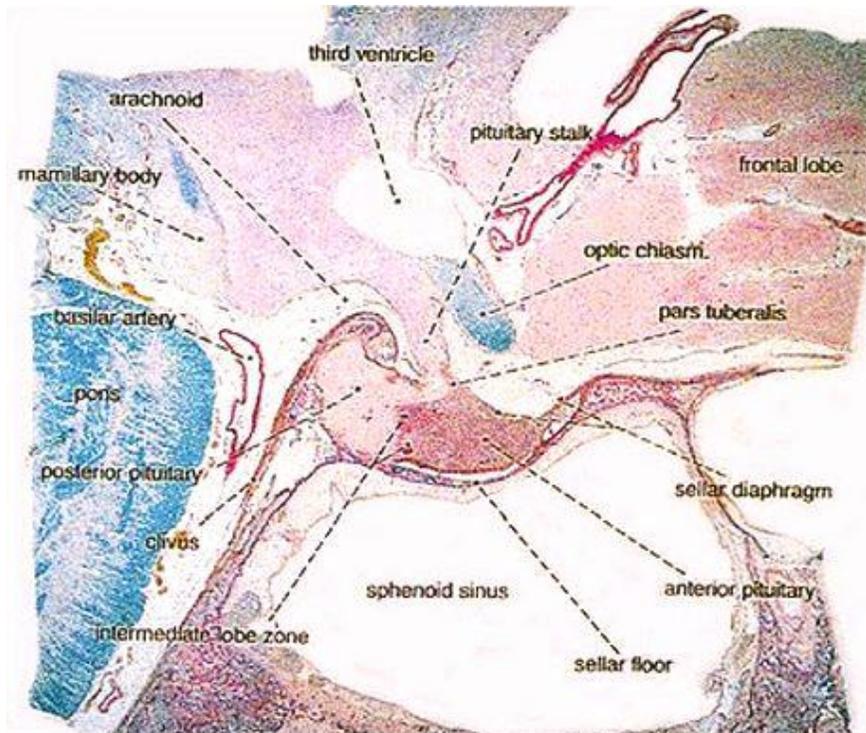


Fig.3. Corte histológico a nivel de hipotálamo, hipófisis y tejidos circundantes (coloración en bloque; Luxol-fast blue-PAS). Se observa al hipotálamo formando el piso del tercer ventrículo, y en relación al quiasma óptico, cuerpo mamilar y a la hipófisis; con la que se comunica mediante el tallo hipofisario (pituitary stalk). (Ref. Mills, 2007)

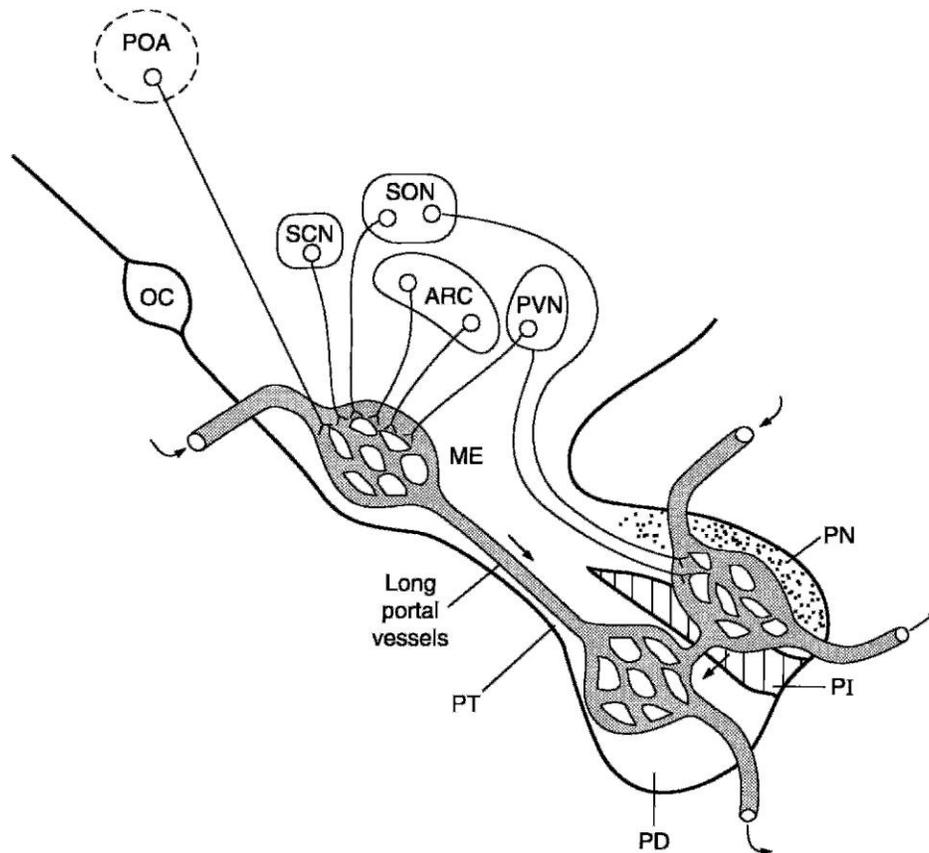


Fig.4. Esquema de la proyección de las neuronas de los núcleos hipotalámicos (PVN: paraventricular, SON: supraóptico, ARC: arcuato, SCN: supraquiasmático, POA: área preóptica) hacia a la eminencia media (ME), donde comunican con los vasos del sistema porta-hipofisario y hacia la pars nervosa (PN). OC: quiasma óptico, PT: pars tuberalis, PD: pars distalis, PI: pars intermedia. (Ref. Norris, 2007)

Fisiología

En los núcleos paraventricular y supraóptico las neuronas magnocelulares producen oxitocina y HAD (Szarek et al., 2010). Estas hormonas se unen a proteínas transportadoras (neurofisinas) y son transportadas en gránulos electrodensos a través de los axones del haz hipotálamo-hipofisario hacia la neurohipófisis. A partir del sistema de

vasos sanguíneos de la neurohipófisis, estas hormonas son secretadas al torrente sanguíneo (Norris, 2007). La oxitocina estimula las contracciones uterinas durante el parto e interviene en el proceso de secreción de la leche durante la lactancia. La misma es secretada en respuesta a la succión del pezón o la distensión del cuello uterino durante el parto.

La HAD tiene distintas funciones según el tipo de receptor al que se una, estimulando la vasoconstricción arteriolar o actuando a nivel renal, favoreciendo la reabsorción de líquido. Esta hormona es secretada en respuesta al aumento de la osmolaridad plasmática o a la disminución marcada de la volemia (mayor al 10%) (Ring, 2005).

Las neuronas parvocelulares de los mencionados núcleos y de otros núcleos hipotalámicos sintetizan las hormonas liberadoras o inhibidoras de las hormonas adenohipofisarias (Szarek et al., 2010). A partir de los somas neuronales, estas hormonas son transportadas mediante los axones hacia la eminencia media, donde son liberadas, ingresando al sistema porta hipofisario. Entre ellas se encuentran: la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH), la hormona inhibidora de la hormona de crecimiento (GHIH) o somatostatina, la hormona liberadora de tirotrófina (TRH), la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), la amina inhibidora de prolactina (dopamina) y la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) (Scanes et al., 2005; Perez castro et al., 2012).

El hipotálamo no sólo regula funciones endócrinas sino que actúa como un centro integrador, recibiendo estímulos sensoriales del ambiente externo (por ejemplo, la luz, temperatura, etc.) y la información sobre el medio interno (por ejemplo, la tensión arterial, la osmolaridad, PH, etc.) generando respuestas autónomas.

A fines de comprender la fisiología del eje HHA, se detallará el funcionamiento del núcleo paraventricular en relación a dicho eje.

El núcleo paraventricular recibe e integra la información relacionada al stress, proveniente de distintas fuentes. La CRH es la hormona que inicia la respuesta del eje HHA frente a estos estímulos estresores; estimulando a su vez al área corticotropa de la hipófisis para secretar adrenocorticotrofina (ACTH) (Bousquet et al., 1997). Los efectos de la CRH en la hipófisis son mediados por los receptores de tipo 1 (CRH-R1) (Chen et al., 1993). La cantidad de receptores disponibles en la hipófisis puede modificarse en condiciones fisiológicas, generando variaciones en la respuesta de dicha glándula frente al estímulo de la CRH (por ejemplo, la CRH misma y la HAD, entre otros, disminuyen la expresión de estos receptores) (Panagiotakopoulos y Neigh, 2014).

El núcleo paraventricular, también sintetiza HAD, la cual junto a la CRH estimula la síntesis y secreción de ACTH en la hipófisis, mediante su unión a receptores de tipo 3 (V3) (Schlosser et al., 1994; Aguilera y Rabadan-Diehl, 2000). El gen que codifica para la HAD, presenta elementos de respuesta para el estradiol, el cual estimula la síntesis de dicha hormona, favoreciendo la activación del eje HHA (Shapiro et al., 2000). Asimismo, la oxitocina, producida en este núcleo, estimula la secreción de ACTH (Handa y Weiser, 2014).

Las neuronas productoras de CRH se encuentran conectadas a células adrenérgicas del núcleo del tracto solitario (Kitazawa et al., 1987; Plotsky et al., 1989). Los estímulos estresores aumentan la liberación de noradrenalina en el PVN, favoreciendo la secreción de CRH y consecuentemente, de ACTH (Terrazzino et al., 1995; Itoi et al., 1999; Pacak, 2000; Cole y Sawchenko, 2002).

La serotonina también tiene un rol regulador sobre el núcleo paraventricular; expresándose distintos tipos de receptores para este neuropéptido en las neuronas parvocelulares. Según el tipo de receptor, los efectos de la serotonina son estimuladores o inhibidores del eje HHA (Zhang et al., 2002; Heisler et al., 2007; Lee et al., 2008; Garcia-

Iglesias et al., 2013). Además, el efecto de la serotonina sobre el PVN puede ser modificado por el estradiol (Rossi et al., 2010).

El núcleo paraventricular también se encuentra regulado, mediante sinapsis intermedias, por estructuras como el hipocampo, la corteza prefrontal, la amígdala y el septum (Herman et al., 2003; Ulrich-Lai and Herman, 2009)

Finalmente, el cortisol, hormona efectora del eje HHA, ejerce un efecto inhibitor sobre la secreción de CRH al unirse a sus receptores en el núcleo paraventricular (Herman y Cullinan, 1997), o en forma indirecta, mediante su acción en el hipocampo (Handa y Weiser, 2014).

En resumen, existen diversos factores reguladores del eje HHA que ejercen su acción a nivel hipotalámico, pudiendo estimular o inhibir a dicho eje, ya sea en forma directa o indirecta.

1.-A.2- Hipófisis

Embriología

La hipófisis se desarrolla en dos partes distintas: la bolsa de Rathke, que consiste en una evaginación ectodérmica del techo del estomodeo (cavidad oral primitiva); y el infundíbulo, una prolongación o evaginación del diencéfalo proveniente del neuroectodermo (Gilbert, 2000). La bolsa de Rathke, a partir de su origen en el estomodeo, crece hacia dorsal hasta perder su conexión con la cavidad bucal y quedar en pleno contacto con el infundíbulo (Fig.5). Las células de la pared anterior de la bolsa de Rathke proliferan y conforman la adenohipófisis; paralelamente una prolongación de la misma crece a lo largo

del tallo del infundíbulo y lo rodea, conformando la pars tuberalis (Sasaki y Nishioka, 1998). La pared posterior de la bolsa de Rathke da lugar a la pars intermedia. Por otra parte, el infundíbulo origina el tallo infundibular y la pars nervosa (neurohipófisis) (Fig.5). La misma queda conformada por células de la glía y fibras nerviosas provenientes del hipotálamo. Dado de que el hipotálamo también tiene su origen en el diencefalo, el mismo y la hipófisis desarrollan una relación vascular y neural estrecha.

Cabe aclarar que, en forma más reciente, algunos autores proponen que la región glandular de la hipófisis se formaría a partir de una placoda adenohipofisaria (células de la cresta neural) que se desprendería del neuroectodermo, migraría antero-posteriormente y finalmente se adheriría al extremo del infundíbulo (Kawamura et al., 2002).

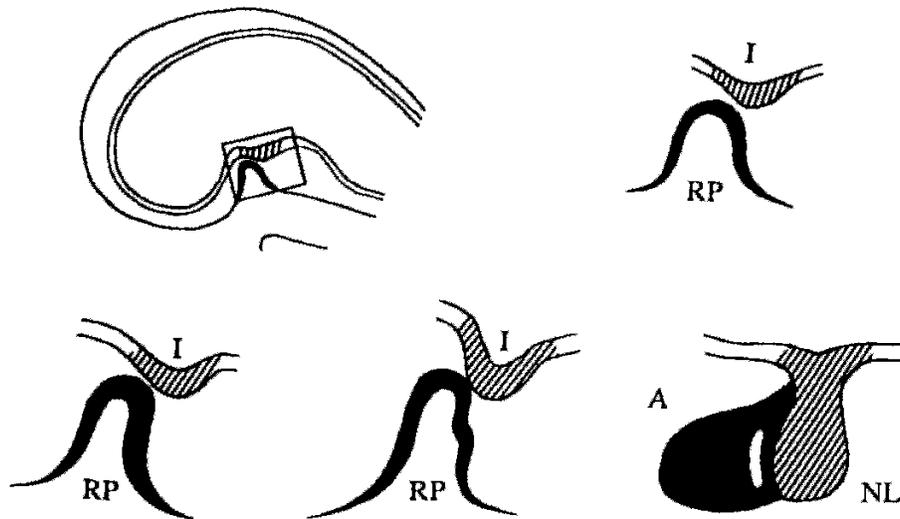


Fig.5. Desarrollo de la glándula hipofísis. Desarrollo de la adenohipofísis (A) a partir del ectodermo del estomodeo, mediante la formación de la bolsa de Rathke (RP). Desarrollo de la neurohipofísis (NL) a partir del infundíbulo (I). La pars intermedia se desarrolla en el punto de contacto entre la bolsa de Rathke y el infundíbulo (Ref. Dubois y El Amraouri, 1995).

El desarrollo de los distintos tipos celulares de la hipofísis requiere de la interacción de numerosos factores de transcripción y de factores de crecimiento que se expresan tanto en la bolsa de Rathke como en la región ventral del diencefalo (Perez Castro et al., 2012). En el proceso de morfogénesis intervienen factores como la proteína morfogénica ósea 4 (BMP4), necesaria para la invaginación de la bolsa de Rathke, y el factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF-8), entre otros (Ericson et al., 1998; Takuma et al., 1998; Treier et al., 1998; Davis y Camper, 2007; Zhu et al., 2007; Brinkmeier, 2009). Los factores de transcripción y de crecimiento juegan un papel esencial tanto en el desarrollo de la hipofísis como en la síntesis de hormonas (Suh et al., 2002; Davis et al., 2010); por lo que defectos en los genes que los codifican pueden ocasionar alteraciones tanto en el desarrollo hipofisario como en su funcionamiento (Ellsworth et al, 2009). Es importante

remarcar que el desarrollo de las células corticotropas involucra la acción de factores de transcripción distintos al resto de las líneas celulares hipofisarias (Taniguchi et al., 2002; Melmed, 2003) (Fig.6). Asimismo, son el primer tipo celular hipofisario en completar su desarrollo. En el humano, las células corticotropas pueden ser identificadas a partir de la sexta semana de vida intrauterina (Dubois y Hemming, 1991), mientras que en el perro lo son a partir del día 30 (Sasaki y Nishioka, 1998).

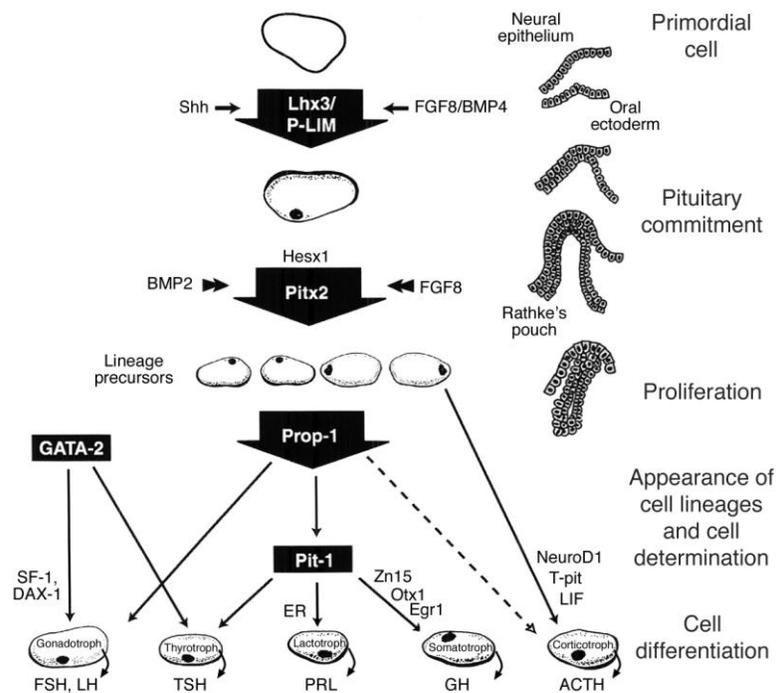


Fig.6. Desarrollo hipofisario. A medida que se produce la ontogénesis de la hipófisis, las células precursoras, mediante la acción de distintos factores de transcripción se van diferenciando y dando lugar a los distintos linajes celulares. Nótese que las células corticotropas se desarrollan a partir de la acción de factores diferentes al resto de las líneas celulares (Ref. Melmed, 2003).

Conjuntamente al desarrollo celular, se produce el desarrollo de la vascularización de la hipófisis y del sistema porta hipofisario; distribuyéndose las células en relación a los capilares (Sasaki and Nishioka, 1998; Mollard et al., 2012) (Fig 7 y 8). Una vez que se completa la organogénesis, la hipófisis queda diferenciada en adenohipófisis y neurohipófisis (ver sección anatomía).

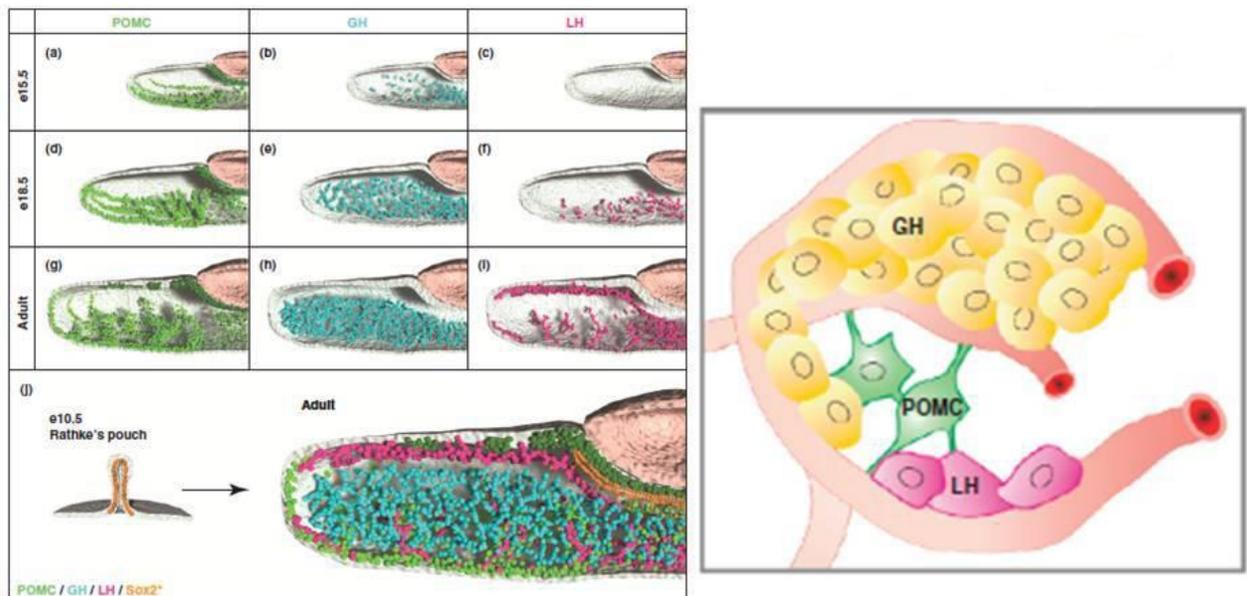


Fig.7. Vascularización de la hipófisis. En la imagen de la izquierda se observa un esquema de la progresión en la distribución de las células secretoras de POMC, GH y LH en la hipófisis. En la imagen de la derecha se observa su distribución respecto a los capilares sanguíneos (Ref. Mollard et al., 2012)

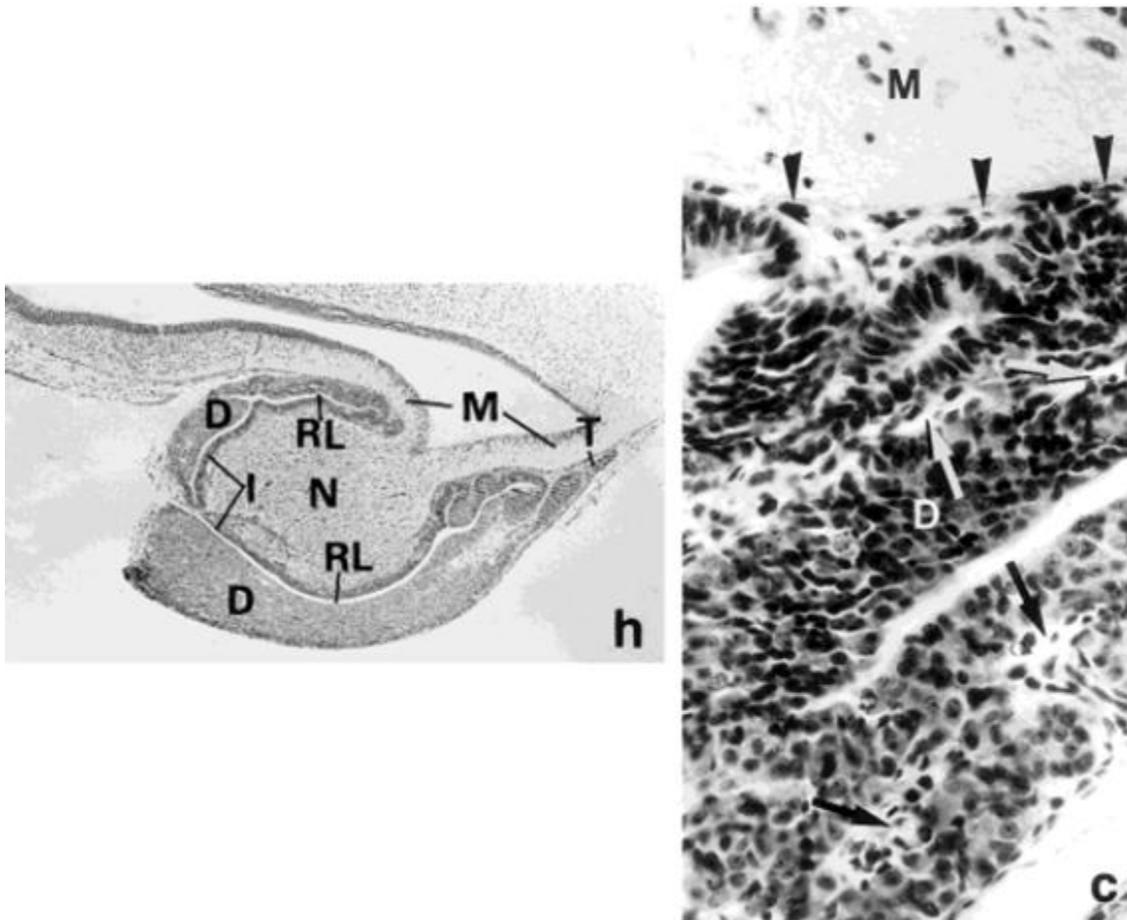


Fig.8. Desarrollo de la hipófisis y vascularización en el perro. En la imagen de la izquierda se observa un corte histológico de la hipófisis de un feto de 45 días, coloreado con hematoxilina/eosina, 30X. La bolsa de Rathke (RL) todavía persiste y los lóbulos hipofisarios se están organizando (D: pars distalis, I: pars intermedia, N: neurohipófisis, T: pars tuberalis, M: eminencia media). En la imagen de la derecha se observa a mayor aumento (300X) la vascularización de la hipófisis a los 38 días de vida fetal. Las cabezas de flecha muestran los vasos portales entre la eminencia media y pars distalis. Las flechas indican capilares sanguíneos en la pars distalis (Sasaki and Nishioka, 1998)

Anatomía

La hipófisis ocupa una depresión central del cuerpo del hueso esfenoides, llamada silla turca. Su techo es una extensión de la duramadre denominado diafragma de la silla turca, el cual se encuentra atravesado por el tallo hipofisario.

Rostral a la hipófisis se encuentra el quiasma óptico (Fig.9), mientras que hacia dorsal se encuentra el hipotálamo; al cual se conecta mediante el tallo hipofisario.

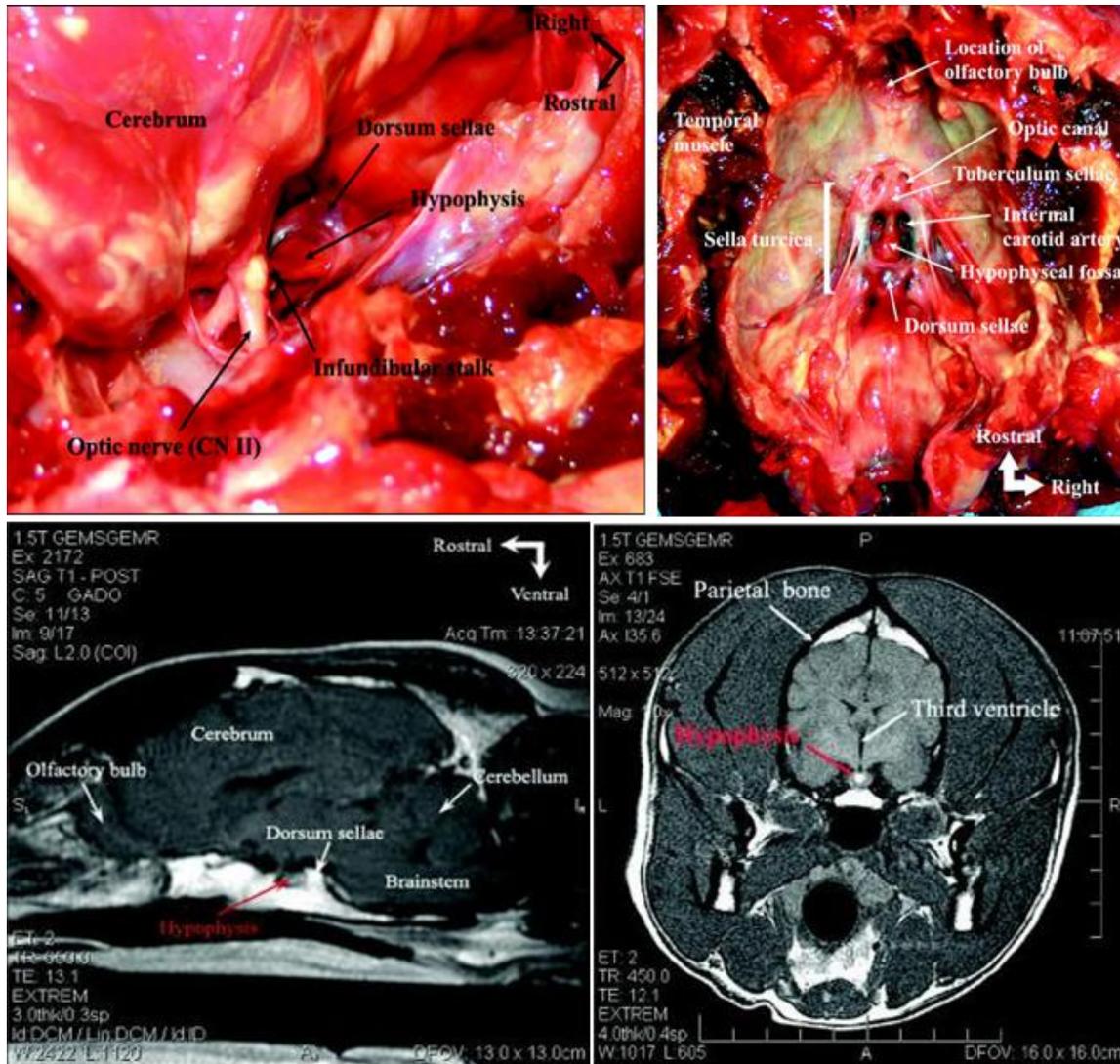


Fig.9. Vista dorsal de la hipófisis del perro (imágenes superiores). Obsérvese su ubicación en la silla turca y su relación con el nervio óptico (rostral). También se observa la vascularización por parte de la arteria carótida interna. En las imágenes inferiores, se observa un corte sagital (izquierda) y un corte transversal (derecha) de una resonancia magnética nuclear, mostrando la ubicación anatómica de la hipófisis (flecha roja). (Ref. Mayer y Treuil, 2007)

La hipófisis puede dividirse, de acuerdo a un criterio embriológico, en dos grandes partes: la adenohipófisis y la neurohipófisis (Fig.10). La adenohipófisis consta de tres partes denominadas *pars distalis*, *pars intermedia* y *pars tuberalis* (Page, 1994; Amar and Weiss, 2003). Cabe aclarar que la *pars intermedia* se encuentra presente en el perro, pero no así en muchos otros mamíferos. A su vez, la neurohipófisis está conformada por la *pars nervosa*, *eminencia media* y el *tallo infundibular*. La *pars tuberalis* de la adenohipófisis y el *tallo infundibular* de la neurohipófisis forman el mencionado *tallo hipofisario* (Page, 1994). La hipófisis se encuentra irrigada por las arterias hipofisarias que derivan de las arterias carótidas internas (Fig.9). En el *tallo infundibular* las arterias hipofisarias (superiores) forman la *red capilar primaria*. La misma confluye en varias *venas porta*, las cuales conectan a la *red capilar secundaria* a nivel de la *pars distalis*. Estos vasos drenan en las *venas hipofisarias* (Halasz, 1994) (Fig.4).

En la neurohipófisis se encuentra la *red capilar posterior*, que también deriva de las arterias hipofisarias (inferiores) y drena en las *venas homónimas*. A su vez, la *red capilar posterior* se conecta a la *red capilar secundaria* de la *pars distalis*.

La *pars intermedia* de la adenohipófisis carece de irrigación directa (Holmes and Ball, 1974; Bosje et al., 2002; Perez Castro et al., 2012).

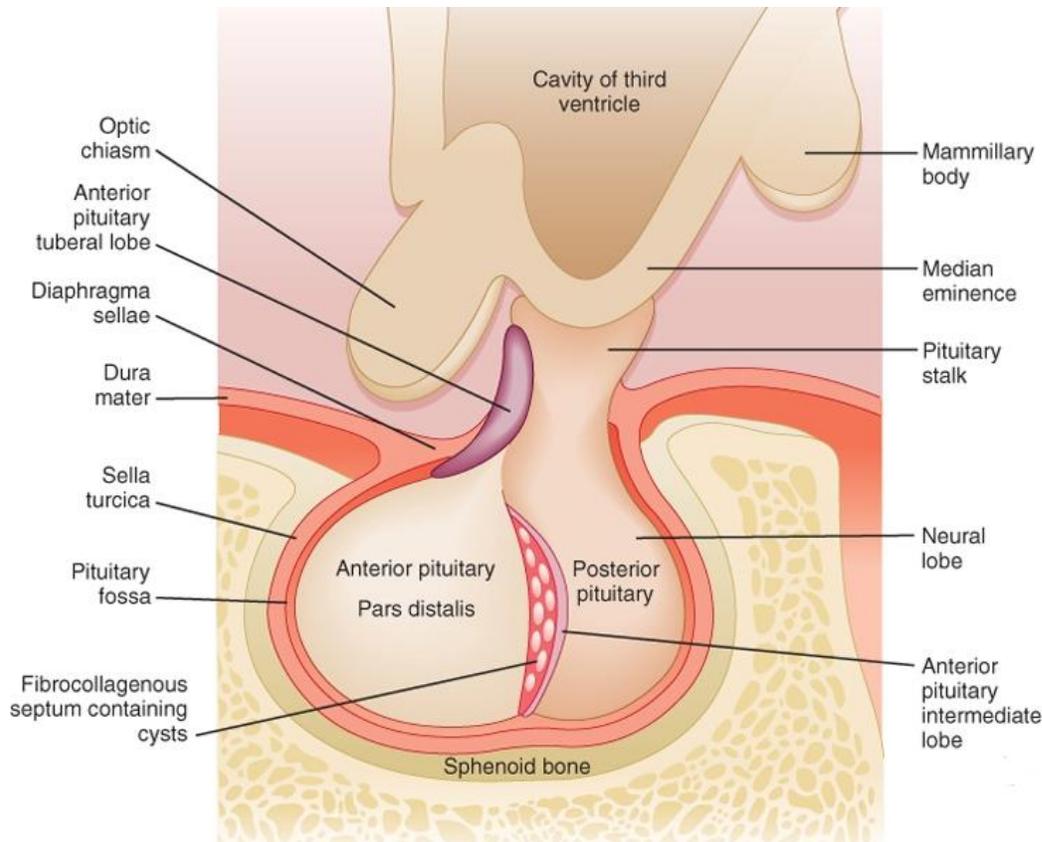


Fig.10 Esquema de la hipófisis, ubicada en la silla turca del hueso esfenoides. Se observa su relación con el hipotálamo mediante el tallo hipofisario (pituitary stalk) y su organización en un lóbulo anterior y posterior. (Ref. Koeppen and Stanton, 2010).

Histología

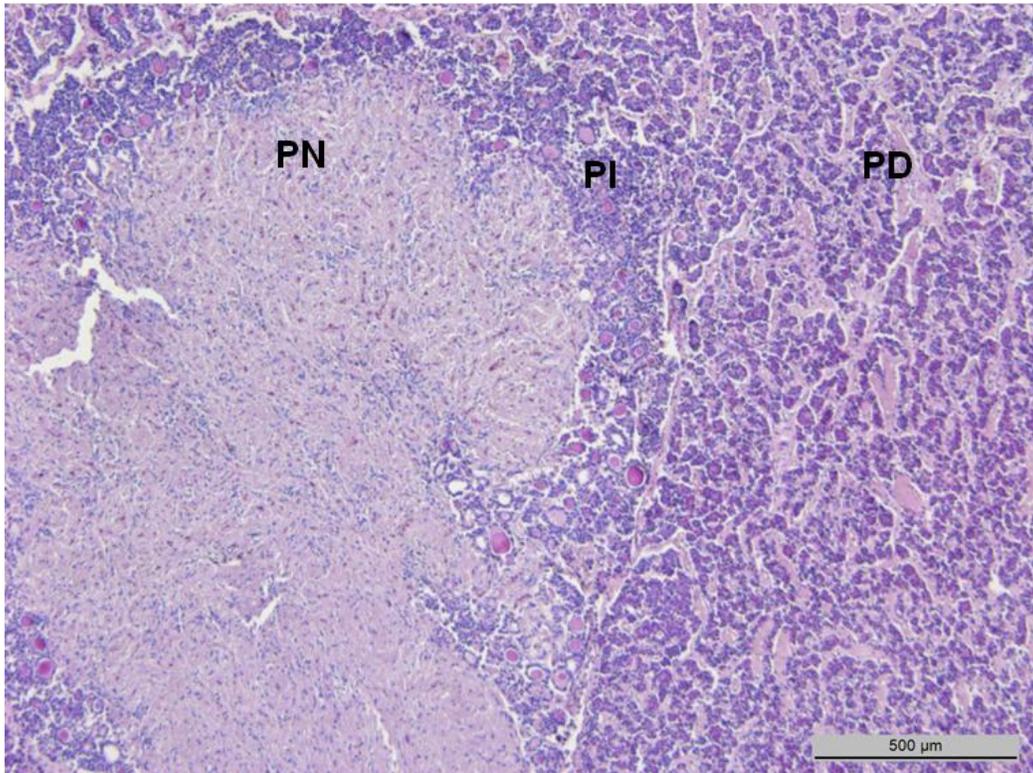


Fig.11. Corte histológico de la hipófisis de un perro, coloreado con hematoxilina/eosina. Se observan la *pars nervosa* (PN), *pars intermedia* (PI) y *pars distalis* (PD).

La *pars distalis* (Fig. 11) se compone de células glandulares dispuestas en cordones o acúmulos, en contacto con una red de capilares fenestrados (Scanes et al., 2005). El tejido conectivo es escaso y se compone principalmente de una red de fibras reticulares y células de sostén epiteliales (células folículoestrelladas) (Inoue et al., 1999). Las células glandulares se clasifican en cromófilas y cromófobas. Las células cromófilas pueden subdividirse en acidófilas (eosinófilas), aquellas que se tiñen intensamente con eosina al utilizar una coloración de hematoxilina/eosina; y basófilas, aquellas que se tiñen con

hematoxilina (Norris, 2007). Al utilizarse la coloración tricrómica de Mallory, el citoplasma de las células acidófilas se tiñe de rojo, y el de las basófilas, de azul. Asimismo, las células basófilas se tiñen intensamente con la coloración de Ácido periódico de Schiff (PAS), dado que las hormonas que producen son glicoproteínas.

Dentro del grupo de las células acidófilas se encuentran las células somatotropas y lactotropas (productoras de hormona de crecimiento y de prolactina, respectivamente); mientras que en el grupo de las basófilas se encuentran las tiotropas, gonadotropas y corticotropas (células productoras de tirotrófina [TSH], hormonas folículoestimulante y luteinizante [FSH y LH], y ACTH, respectivamente).

Las células cromóforas son consideradas células acidófilas o basófilas que se encuentran en un periodo de inactividad, luego de la liberación de los gránulos que contienen hormonas; y deben su nombre a la falta de afinidad por los colorantes mencionados previamente.

En mamíferos la *pars tuberalis* se encuentra en ventral de la eminencia media y se continúa con la pars distalis y pars intermedia; a su vez se encuentra conectada con el tercer ventrículo mediante procesos citoplasmáticos de los tanicitos (Wittkowski et al., 1999; Norris, 2007). Se encuentra constituida por células específicas de la pars tuberalis, células foliculares y células similares a las de la pars distalis, rodeadas de tejido conectivo. Estas células están en contacto con los vasos del sistema porta hipofisario y con las terminales nerviosas de la eminencia media (Norris, 2007). Las células similares a las de la pars distalis se encuentran principalmente en la región distal de la pars tuberalis, identificándose células gonadotropas y tiotropas. Las células foliculares son células pequeñas dispuestas en grupos de tipo no secretor, mientras que las células específicas son células glandulares propias que difieren en sus características ultraestructurales de otros tipos celulares de la adenohipófisis (Wittkowski et al., 1999). Se

desconoce la naturaleza del/de los producto/s secretado/s por estas células, aunque se ha reportado que al menos uno de estos productos estimularía la secreción de prolactina (Lafarque et al., 1998)

La *pars intermedia* se encuentra conformada por una capa de cordones celulares, algunos de los cuales invaden la *pars nervosa*. Las células presentes en esta región son similares a las corticotropas y se denominan melanotropas. Las mismas sintetizan la hormona melanocitoestimulante o melanotrofina alfa (α -MSH) a partir de la proopiomelanocortina (POMC) (ver sección fisiología) y reciben terminales axonómicas del sistema dopaminérgico (Bosje et al., 2002; Perez Castro et al., 2012).

La neurohipófisis está constituida por células gliales denominadas pituicitos, fibras nerviosas amielínicas que provienen de las neuronas secretoras del hipotálamo y un gran entramado de capilares. Las fibras nerviosas representan el haz hipotálamo-hipofisario, proviniendo los axones de las neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular (Swanson and Sawchenko, 1983; Perez castro et al., 2012).

Fisiología

Como se mencionara previamente, los estímulos estresores conducen a la liberación de CRH por parte del hipotálamo, la cual se une a su receptor hipofisario, estimulando la secreción de ACTH. La ACTH a su vez, estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides en la glándula adrenal (Herman et al., 2003). Finalmente los glucocorticoides, ejercen su efecto en distintos tejidos, incluyendo a la hipófisis e hipotálamo, donde inhiben al eje HHA (feedback negativo) (Tsigos y Chrousos, 2002; Bosje et al., 2002; de Bruin y col., 2008).

La CRH es la principal hormona reguladora de la síntesis y secreción de ACTH. Sin embargo, se ha demostrado que la HAD y la oxitocina, también son secretagogos de dicha hormona (Herman et al., 1990; Schlosser et al., 1994). Asimismo, la producción de ACTH es estimulada por citoquinas como las interleuquinas 1, 2 y 6, y el factor inhibidor de leucemia (LIF); y la Angiotensina II (Rivier y Vale, 1983; Mandrup-Poulsen et al., 1995; Bousquet et al., 1997; Li et al., 1999; Hanson et al., 2010); e inhibida por la dopamina, a través del receptor dopaminérgico D2, y la somatostatina (ss) por medio de sus receptores sst2, 3 y 5 (Saiardi y et al., 1997; de Bruin et al., 2009; Ferone et al., 2009; Theodoropoulou y Stalla, 2013).

La ACTH es sintetizada por las células corticotropas, en la *pars distalis* de la adenohipófisis. Esta hormona deriva de un precursor, una macromolécula denominada POMC. La POMC es una prohormona, que según el tipo celular en el que se encuentre, es metabolizada por distintos sistemas enzimáticos, dando lugar a distintas hormonas o péptidos (Bosje et al., 2002; Tanaka et al., 2003). En las células corticotropas, la POMC sufre un clivaje por acción de la enzima convertasa tipo 1 (PC1), generando la lipotropina beta (β -LPH) y un fragmento intermediario, el cual es clivado nuevamente por la mencionada enzima para generar la ACTH (Tanaka, 2003) (Fig.12). La molécula de ACTH se encuentra constituida por 39 aminoácidos, de los cuales los primeros 24 aminoácidos son comunes a todas las especies. Frente a los estímulos previamente mencionados, las células corticotropas liberan ACTH a la circulación sanguínea, para ejercer su acción en la glándula adrenal mediante su unión al receptor de melanocortina tipo 2 (MC2R) (Panagiotakopoulos y Neigh, 2014).

En la *pars intermedia* se encuentran las células melanotropas, las cuales también sintetizan POMC. En estas células, la existencia de la enzima convertasa tipo 2 (PC2), permite realizar el clivaje de la ACTH en α -MSH (hormona estimulante de melanocitos o

melanotrofina) y CLIP (péptido intermedio semejante a corticotrofina; sin función conocida) (Tanaka, 2003) (Fig.12). La α -MSH es una hormona que estimula a los melanocitos (células presentes en la piel) a sintetizar melanina; lo cual genera un incremento en la coloración de la piel y el pelo. La secreción de α -MSH es estimulada por la CRH. El principal factor regulador de la síntesis de α -MSH es la dopamina, quien tiene un efecto inhibitorio sobre la misma (Kemppainen et al., 1989; Castillo et al., 2008). Disminuciones en los niveles de dopamina se asocian con menor actividad de la enzima PC2, y conducen al aumento en la concentración de ACTH, debido al menor clivaje y síntesis de α -MSH.

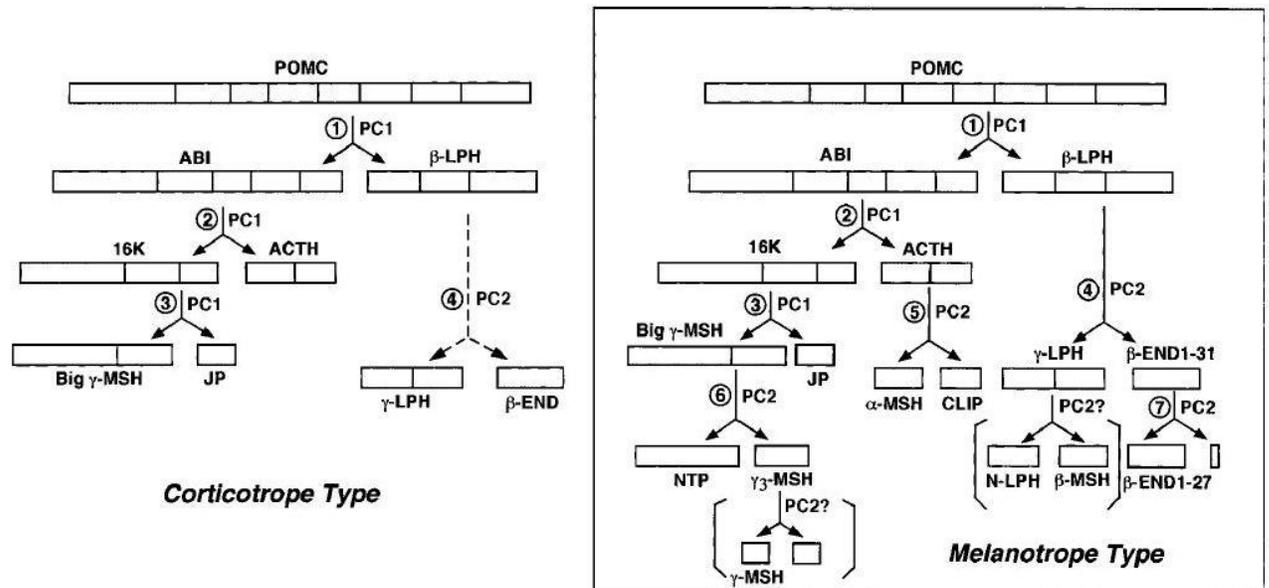


Fig. 12. Diferente procesamiento de la proopiomelanocortina (POMC), según el sistema enzimático presente en cada tipo celular. En las células corticotropas se sintetiza ACTH, mientras que en las melanotropas se sintetiza α -MSH debido a la presencia de la convertasa tipo 2 (PC2) (Ref. Tanaka, 2003).

Finalmente, es importante considerar que en el perro el ritmo secretor de ACTH y de cortisol no muestra el mismo patrón circadiano observado en otras especies, siendo la secreción de ACTH de forma esporádica en vez de pulsátil y rítmica (Kempanien y Sartin, 1984; Castillo et al., 2009), del mismo modo que sucede con el cortisol.

I.-A.3- Glándulas adrenales

Embriología

Las glándulas adrenales se desarrollan en el mesodermo intermedio correspondiente al polo craneal del mesonefros. Durante la embriogénesis, las mismas se originan a partir de dos componentes distintos: el mesodermo que da lugar a la corteza, y el ectodermo, que da lugar a la médula (Panagiotakopoulos y Neigh, 2014).

Las células mesoteliales ubicadas entre la raíz del mesenterio y las gónadas proliferan y se introducen en el mesénquima. Allí se diferencian en células de citoplasma acidófilo que forman la corteza fetal de la glándula. Posteriormente, se produce una segunda oleada de células mesoteliales que rodean a la masa inicial y conforman la corteza adrenal definitiva (Fig.13). Esta última se diferencia en la zona glomerular y fascicular a partir del día 45 de la gestación (Sasaki y Nishioka, 1998). El desarrollo y la diferenciación de la corteza adrenal en las distintas zonas está regulada por la expresión de factores de transcripción como el Pref-1/ZOG, y el factor esteroideogénico-1 (Luo et al., 1994; Okamoto et al., 2000). Luego del nacimiento, la corteza fetal sufre una regresión, quedando sólo su capa externa, la cual se diferencia en la zona reticular. Por otra parte, a medida que se desarrolla la corteza adrenal, algunas células derivadas de la cresta neural, invaden a la misma, organizándose en cordones y acúmulos. Estas células originan a la médula adrenal (Mesiano y Jaffe, 1997).

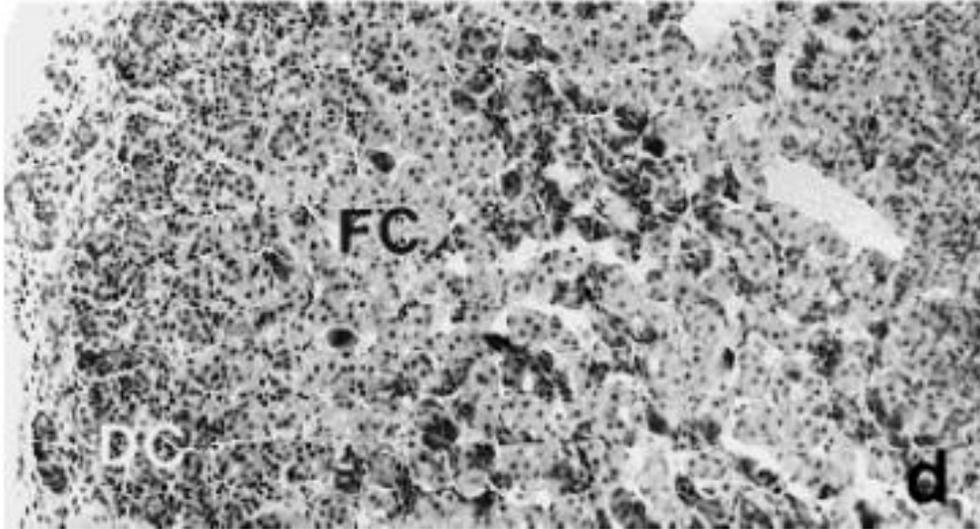


Fig.13. Desarrollo de la glándula adrenal del perro. Imagen de un corte histológico de la glándula adrenal a los 38 días de vida fetal (100x). Se observa la corteza definitiva en la periferia (DC) y la corteza transitoria o fetal (FC) hacia el centro (Ref. Sasaki y Nishioka, 1998)

Anatomía

En el perro, las glándulas adrenales se ubican en el tejido retroperitoneal a lo largo de los polos craneales medios de los riñones (Evans y de Lahunta, 2013). Se encuentran craneal a los vasos renales y dorsolateral a la aorta o vena cava (según se trate de la glándula izquierda o derecha, respectivamente); encontrándose la adrenal derecha más hacia craneal que la izquierda. La glándula adrenal izquierda se encuentra ventral al proceso transversal de la segunda vértebra lumbar y el músculo psoas menor. Se relaciona hacia medial con la arteria aorta abdominal, hacia lateral con el riñón, hacia ventral con el bazo y caudalmente con la arteria y vena renales. La glándula adrenal derecha se encuentra próxima al hilio renal, debajo de la última costilla. Se relaciona

medialmente con la vena cava caudal, ventrolateralmente se encuentra cubierta por el riñón, y cranealmente se encuentra cubierta por el hígado (Kealy et al., 2011) (Fig. 14).

Las glándulas adrenales se componen de corteza y médula. La primera es de color amarillento debido a su alto contenido en lípidos, mientras que la segunda es de color rojizo debido a la presencia de una abundante red de venas.

Las glándulas adrenales son irrigadas por ramas de vasos sanguíneos adyacentes como la arteria aorta, arterias renales, la arteria frenicoabdominal, las arterias lumbares y la arteria mesentérica craneal (Evans y de Lahunta, 2013).

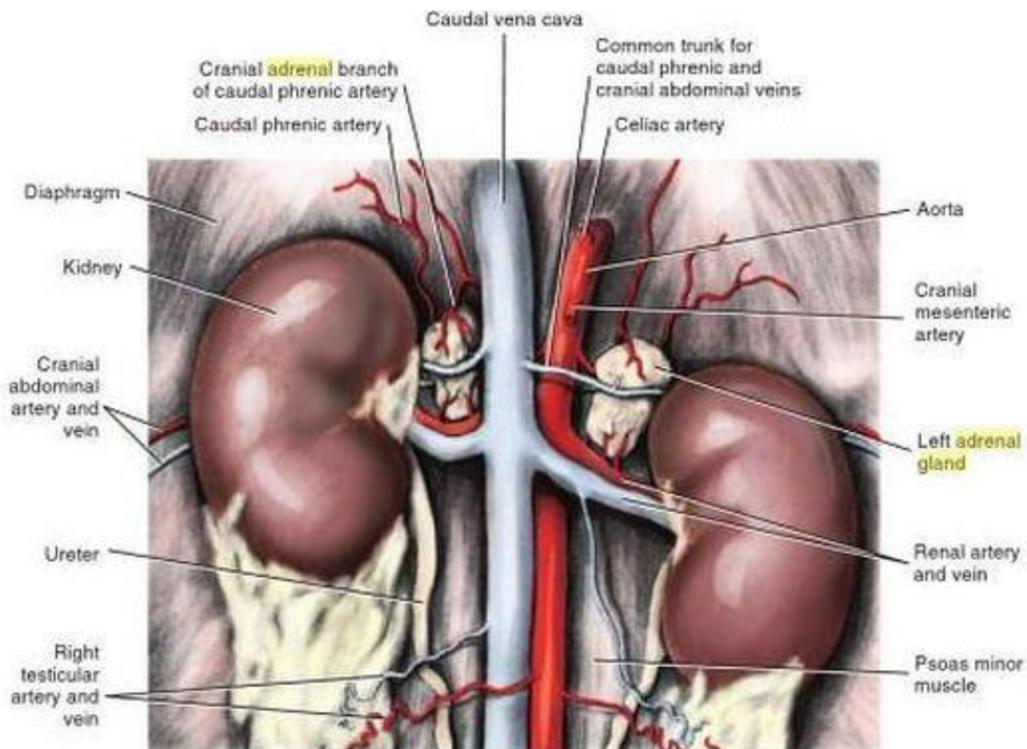


Fig. 14. Esquema de la ubicación anatómica de las glándulas adrenales, vista ventral (Ref. Evans y de Lahunta, 2013).

Histología

Las glándulas adrenales se encuentran rodeadas de una cápsula de tejido conectivo, a partir de la cual nacen trabéculas que se dirigen hacia la corteza adrenal. Por las mismas discurren vasos sanguíneos y fibras nerviosas hacia la médula.

La corteza adrenal se encuentra dividida en tres zonas concéntricas: la zona glomerular, la zona fascicular, y la zona reticular (Ehrhart-Bornstein et al., 1998) (Fig. 15).

La zona glomerular se encuentra conformada por células pequeñas organizadas en grupos redondeados o arcos.

La zona fascicular es la más extensa de las tres. Se organiza en cordones o columnas celulares. Entre estos cordones se encuentran capilares fenestrados con disposición radial. Las células son grandes y poliédricas, con un citoplasma levemente acidófilo y gran cantidad de espacios vacuolares, debido al alto contenido lipídico (el cual se pierde durante la preparación histológica). Es por esto que las células presentan un aspecto “esponjoso” y se denominan “espongiocitos”.

La zona reticular está compuesta por un retículo de cordones celulares anastomosados, separados por sinusoides. Las células son redondeadas o poliédricas, con citoplasma eosinófilo y escasas gotas de lípidos.

No existe un límite bien definido entre la corteza y la médula adrenal. Esta última se compone de cordones celulares, entre los que se encuentran capilares y vénulas (Fig. 15). El citoplasma contiene gránulos que se tiñen de color pardo luego de la fijación para métodos de coloración con tinciones dicrómicas (debido a la oxidación de las catecolaminas presentes en estas células). Dicha reacción se denomina cromafin, y por lo tanto, las células se denominan cromafines (Evans y de Lahunta, 2013). Asimismo se encuentran células ganglionares simpáticas, aisladas o en pequeños grupos.

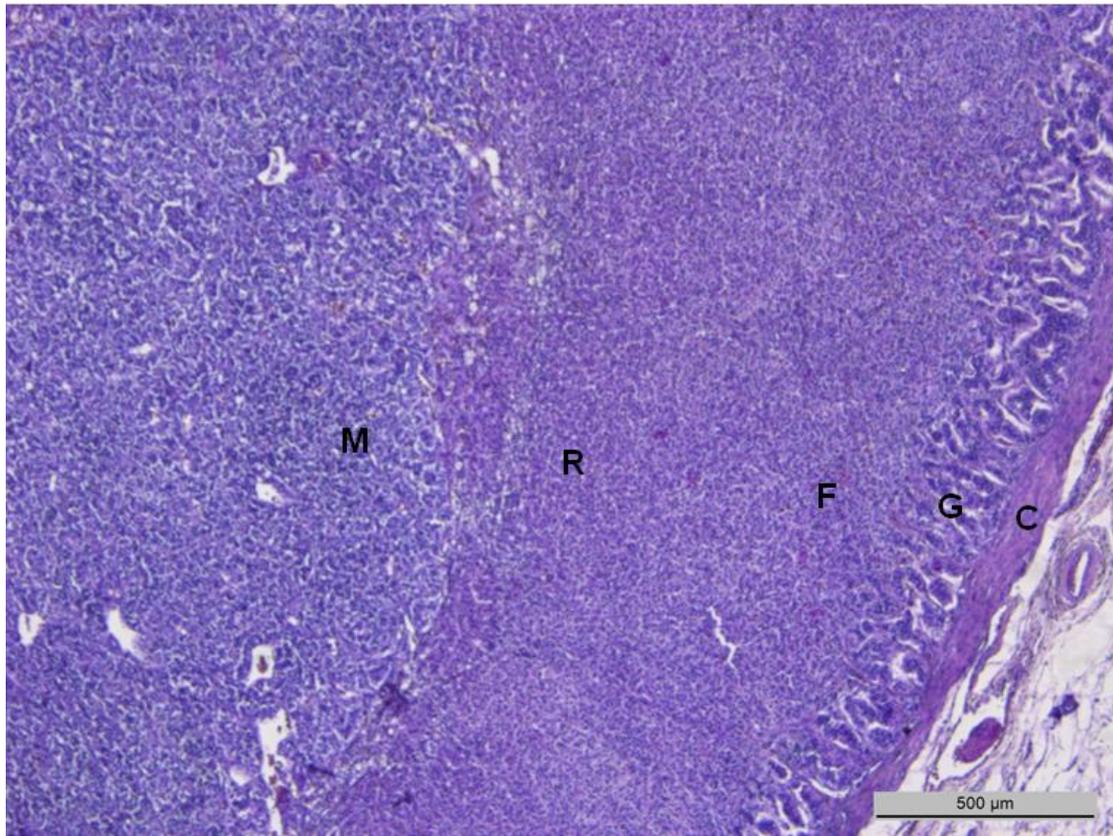


Fig. 15. Corte histológico de la glándula adrenal del perro, coloreado con hematoxilina/eosina. Se observan la cápsula (C), zona glomerular (G), zona fascicular (F), zona reticular (R) y médula (M).

Fisiología

Cada una de las zonas de la corteza adrenal (glomerular, fascicular y reticular) posee distintos sistemas enzimáticos que permiten sintetizar hormonas con diferentes mecanismos de regulación (Hough et al., 2015).

En la zona glomerular se sintetiza la aldosterona, un mineralocorticoide involucrado en el balance hidroelectrolítico del organismo. La síntesis de aldosterona es estimulada por la

angiotensina II y en menor medida por la ACTH (Miller y Auchus, 2011). En la zona reticular se sintetizan esteroides sexuales, principalmente andrógenos, también en respuesta a la ACTH. En la zona fascicular, se sintetizan los glucocorticoides; como el cortisol y la corticosterona (Young et al., 2003; Pattison et al., 2007). El cortisol predomina en el hombre, el perro y los rumiantes, entre otros; mientras que la corticosterona predomina en roedores (Romeo, 2010). El principal estímulo para la síntesis de glucocorticoides es la ACTH. Esta hormona ejerce su acción al unirse a su receptor adrenal denominado MC2R. La estimulación de la secreción de cortisol por parte de la ACTH se encuentra dada por distintos mecanismos. La ACTH aumenta el ingreso de colesterol a las células fasciculares y estimula la síntesis de las enzimas intervinientes en la esteroideogénesis fascicular, entre otras (Faust et al., 1977; Brown et al., 1979; Chung et al., 1997; Ariyoshi et al., 1998; Hu et al., 2001; Hough et al., 2015).

Asimismo, la regulación de la función de la glándula adrenal está dada por la interacción entre corteza y médula, el suministro vascular, la inervación autonómica, el sistema inmune y factores de crecimiento (Ehrhart-Bornstein et al., 1998). Es por esto que las variaciones plasmáticas de cortisol no siempre son un reflejo exacto de los niveles de ACTH (Wood et al. 1982a, b; Nicholson et al., 1985; Bornstein et al., 2008; Castillo et al., 2009) (Fig. 16).

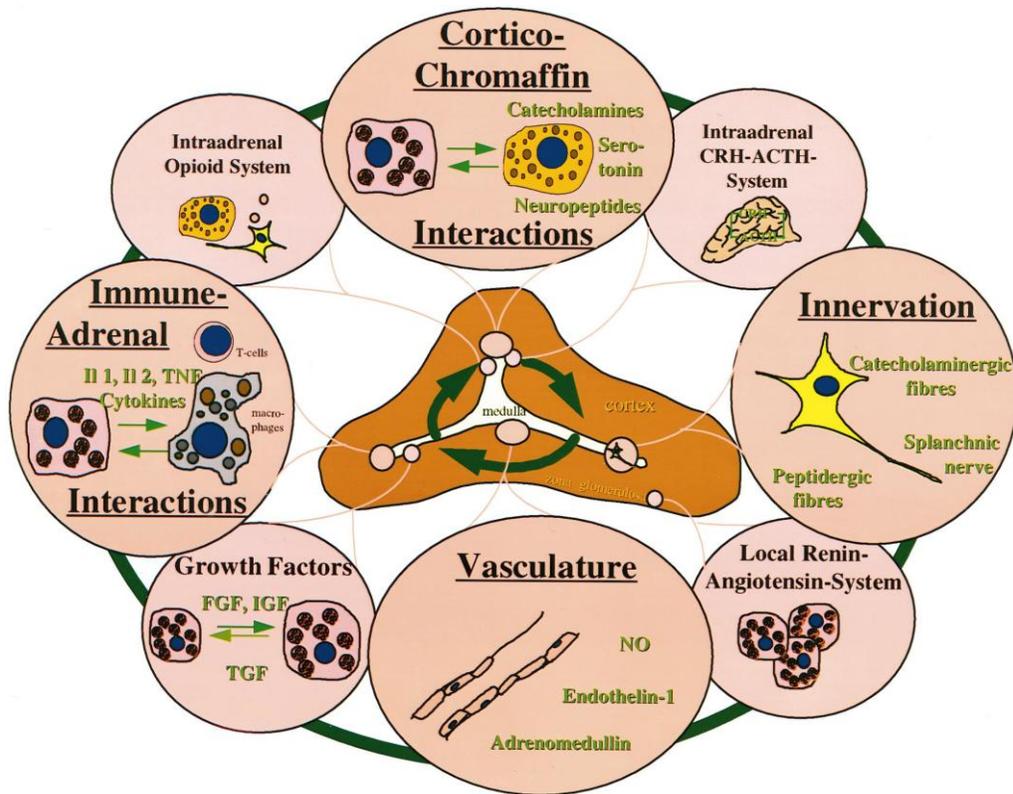


Fig. 16. Factores que actúan sobre la glándula adrenal, regulando su función, además del estímulo de la ACTH (Ref. Ehrhart-Bornstein et al., 1998).

El proceso de esteroidogénesis se inicia con la escisión de la cadena lateral de colesterol en el interior de la membrana mitocondrial. Posteriormente se forma el primer esteroide de síntesis en todos los tejidos esteroideogénicos, pregnenolona (C21). Esta reacción es catalizada por el citocromo P450, enzima de escisión de la cadena lateral (P450_{scc}), que es parte del sistema de escisión de la cadena lateral del colesterol (Stocco y Clark, 1996). Los pasos metabólicos subsiguientes dependerán de las enzimas presentes en cada zona de la corteza adrenal (Fig. 17). Así, sólo en las zonas fascicular y reticular se produce la 17- α -hidroxilación de la pregnenolona o de la progesterona, dado que sólo allí se encuentra la enzima 17- α -hidroxilasa, responsable de

este proceso (Miller y Auchus, 2011). Del mismo modo, sólo en la zona glomerular se sintetiza aldosterona, ya que es la única zona que cuenta con la 18- α -hidroxilasa, enzima que interviene en su síntesis.

La proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR) es un elemento clave en la síntesis de las hormonas esteroideas, ya que regula el transporte de colesterol hacia la membrana mitocondrial interna. La síntesis de esta proteína es estimulada por la ACTH (Stocco, 2001; Miller, 2007).

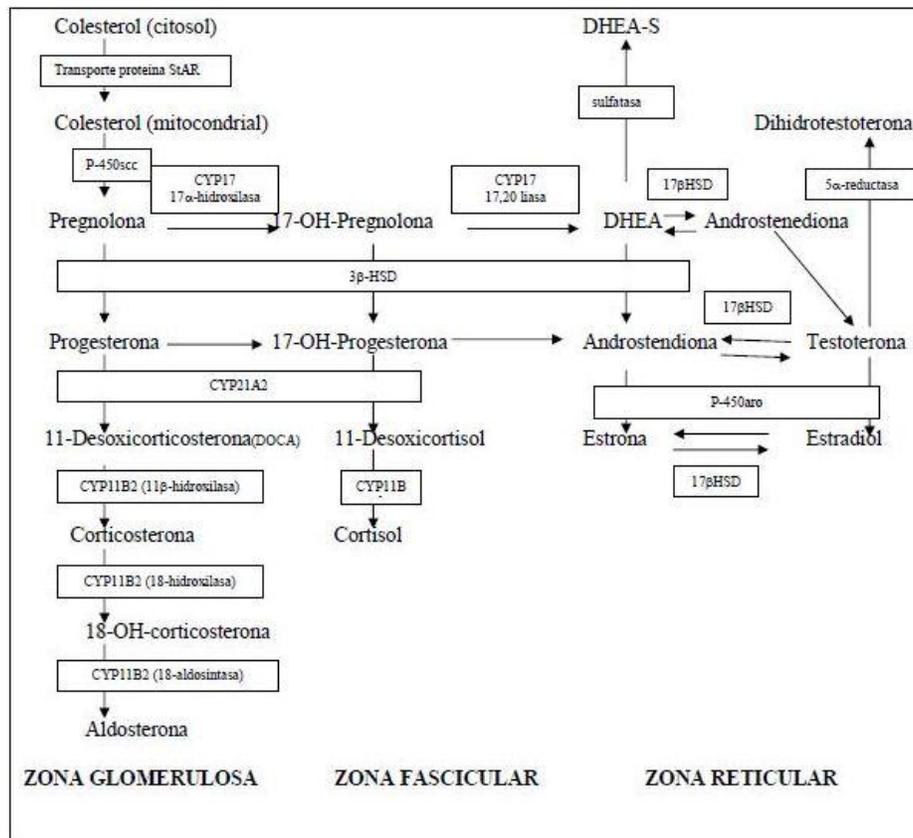


Fig. 17. Esteroidogénesis adrenal. Se observan las distintas enzimas que intervienen en cada capa de la corteza adrenal, obteniéndose los diferentes productos (Ref. Fernández, 2010).

Una vez sintetizados los glucocorticoides, son liberados a la circulación, para ejercer su efecto en distintos tejidos. Los efectos de los glucocorticoides se producen sobre el metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasa, el sistema endócrino, el sistema músculo esquelético, el sistema hematopoyético, el sistema inmune y el sistema cardiovascular, entre otros. Las acciones del cortisol son mediadas por dos tipos de receptores intracelulares: receptores de corticosteroides tipo I y de tipo II; también denominados receptores de mineralocorticoides (MR) y receptores de glucocorticoides (GR), respectivamente (Ahima y Harlan, 1990; Ahima et al., 1991; McGimsey et al., 1991; Cintra et al., 1994; Morimoto et al., 1996; McCormick et al., 1998). A nivel central estos receptores se expresan en el hipocampo, hipotálamo e hipófisis. De este modo el cortisol puede ejercer su feedback negativo a nivel de las neuronas productoras de CRH y HAD en el núcleo paraventricular, a nivel de las células corticotropas en la hipófisis o en distintas regiones del cerebro que se comunican con el hipotálamo (Sawchenko, 1987; Burgess y Handa, 1992; Bradbury et al., 1994) (Fig.18).

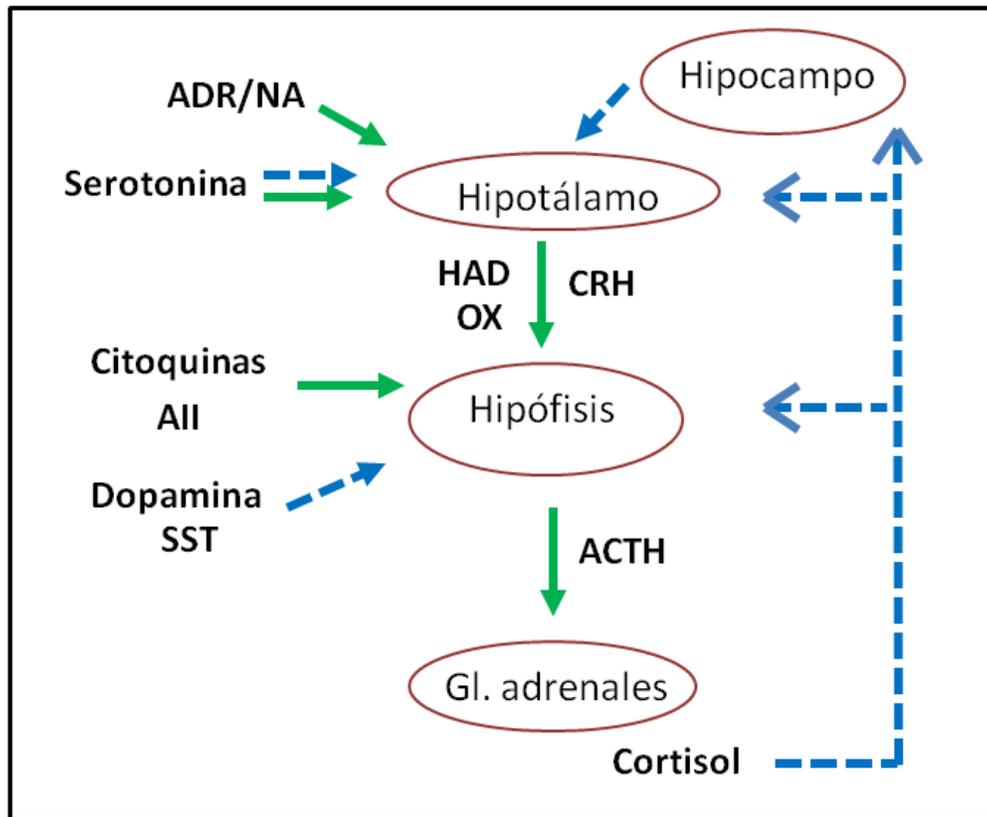


Fig. 18. Esquema de regulación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal. Las flechas continuas indican estimulación, y las discontinuas, inhibición. ADR/NA: adrenalina/noradrenalina, All: angiotensina II, SST: somatostatina, HAD: hormona antidiurética, OX: oxitocina. El cortisol tiene un efecto inhibitorio sobre el eje a nivel hipofisario, y a nivel hipotalámico en forma directa y a través de sus receptores en hipocampo (y en otros sitios del sistema nervioso central, no graficados).

I.-B. Eje Hipotálamo-hipofisario-gonadal: regulación hormonal y ciclo estral

Las perras presentan ciclos monoéstricos no estacionales, con períodos interestrales (anestros) de una duración de entre 5 y 12 meses; aunque los mismos suelen tener una duración promedio de 6-7 meses (Concannon, 2011).

La GnRH es secretada a partir de núcleos hipotalámicos y liberada en la eminencia media, donde ingresa al sistema porta hipofisario y estimula la secreción de las gonadotrofinas: FSH y LH. Ambas hormonas son sintetizadas por las células gonadotropas, y ejercen su efecto en las gónadas; estimulando la esteroideogénesis ovárica o testicular (Handa y Weiser, 2014). En el caso de la hembra, la FSH y LH intervienen en el desarrollo folicular y en la ovulación, mientras que en el macho intervienen en la espermatogénesis. Los esteroides gonadales producidos (estradiol y progesterona en la hembra, y testosterona en el macho) tienen a su vez un efecto regulador sobre el hipotálamo e hipófisis. La progesterona y testosterona tienen un efecto inhibitorio, mientras que el estradiol puede ser estimulador o inhibidor según su concentración, acorde a la fase del ciclo (Shupnik, 1996; Concannon, 2009).

El ciclo estral de la perra se divide en anestro, proestro, estro y diestro. El anestro es la fase del ciclo reproductivo que transcurre entre el fin del diestro y el inicio del proestro del siguiente ciclo; el cual, como se mencionara previamente, tiene una duración variable. En esta fase el útero involuciona y las concentraciones de los esteroides gonadales permanecen basales, excepto por algunas ondas estrogénicas que se producen durante la misma, en respuesta a fluctuaciones de la FSH. Antes del comienzo del proestro, las ondas estrogénicas dejan de presentarse y el estradiol se mantiene en niveles basales al igual que la progesterona (Olson et al., 1982; Johnston et al., 2001). En la citología

vaginal correspondiente al anestro se observan células epiteliales parabasales e intermedias, hay ausencia de glóbulos rojos, y puede o no haber leucocitos (Fig. 19).

Hacia el final del anestro, se producen pulsos secretores de FSH y LH que continúan hacia el proestro con un aumento sostenido en sus concentraciones. Esto da lugar al desarrollo folicular, la síntesis de estradiol y su incremento en sangre (Kooistra y Okkens, 2000). El aumento en la concentración de estradiol en el proestro determina la presentación de los signos clínicos y los cambios en los genitales característicos de esta fase. La progesterona en cambio, se mantiene en niveles basales hasta el final del proestro, momento en el que comienza a incrementarse. El proestro tiene una duración variable de entre 6 a 11 días. Esta fase inicia el primer día del sangrado vaginal y finaliza cuando la hembra acepta al macho (inicio del estro). Los signos clínicos se caracterizan por la atracción del macho con rechazo de la monta, tumefacción vulvar y el mencionado sangrado vaginal. Al examen vaginoscópico, se observa la mucosa vaginal rosada, edematosa, lisa y brillante (Fig. 20). En la citología vaginal correspondiente a esta fase se observan glóbulos rojos, ya no se observan leucocitos, y comienzan a aparecer células superficiales. En la medida que el proestro avanza, el fondo del frotis deja de ser granular o "sucio" para volverse claro, y además aumenta marcadamente la presencia de células superficiales, llegando a representar más del 80% de la totalidad de las células presentes (Schutte 1967a, b) (Fig.19).

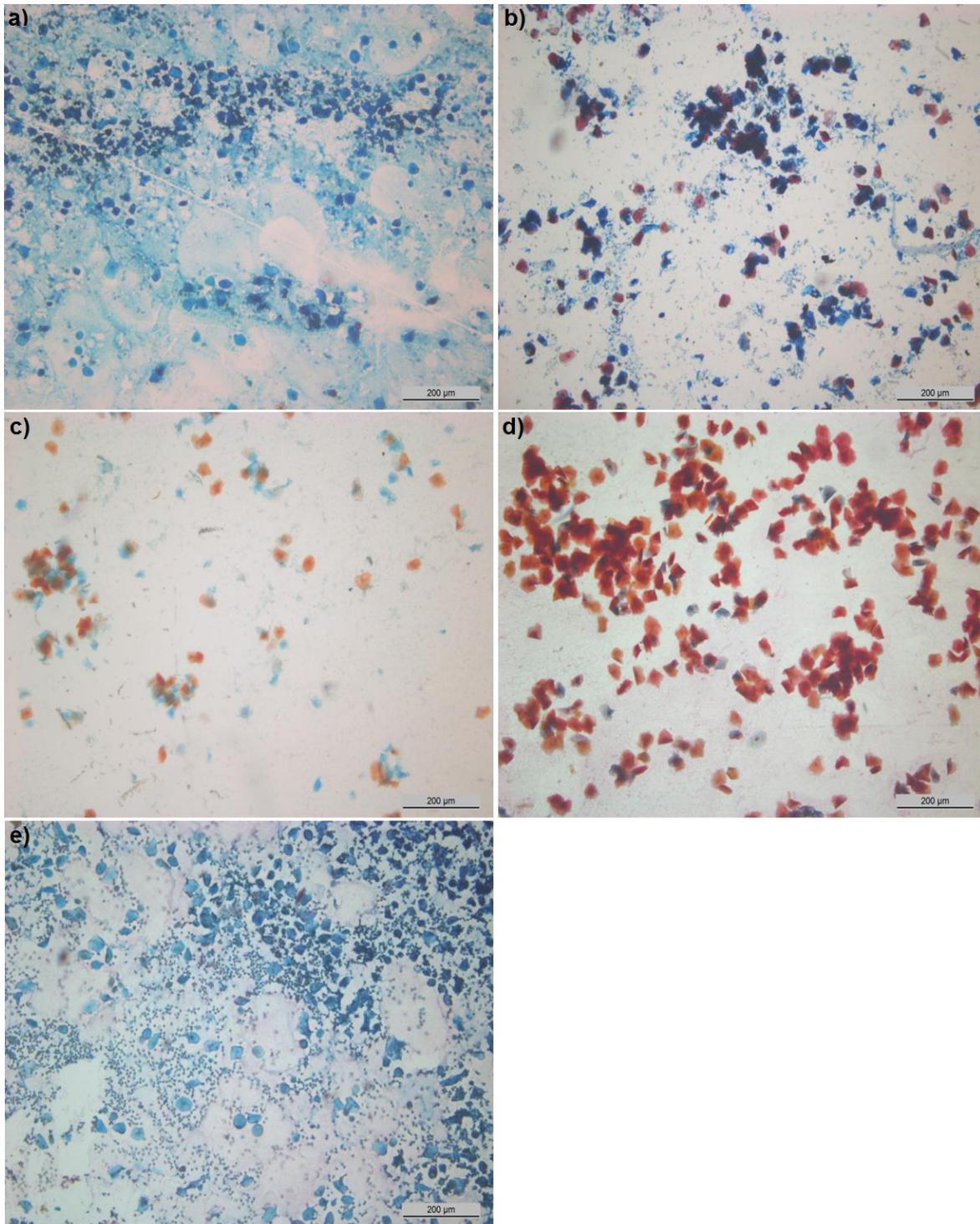


Fig. 19. Citologías vaginales de una perra en anestro (a), proestro temprano (b), proestro avanzado (c), estro (d) y diestro (e) (Coloracion de Shorr modificada por Schutte).

Uno o dos días antes del comienzo del estro el estradiol alcanza un pico y luego comienza a descender, mientras que la progesterona comienza a aumentar. Así, en el estro se encuentran concentraciones de estradiol en descenso, y de progesterona en aumento; lo que trae como consecuencia una onda secretora de FSH y LH (DeGier et al., 2006). El rápido aumento de la LH da lugar a la ovulación en 24-48hs, con la consecuente formación del cuerpo lúteo y un mayor aumento en los niveles de progesterona producidos por el mismo (Fig.21). Los signos clínicos característicos del estro se relacionan con la aceptación de la monta y disminución de la tumefacción vaginal. Esta fase tiene una duración promedio de 5 a 9 días. En la vaginoscopia se observan pliegues en la mucosa vaginal, los cuales se subdividen, dando un aspecto “arrugado”. Este aspecto es consecuencia de la disminución del edema de la mucosa vaginal. Asimismo, la mucosa empieza a perder brillo (Schaeffers-Okkens y Kooistra, 2010) (Fig. 20). En la citología vaginal se observa que las células epiteliales superficiales alcanzan cerca del 100%, siendo el resto de las características similares al final del proestro (Fig. 19).

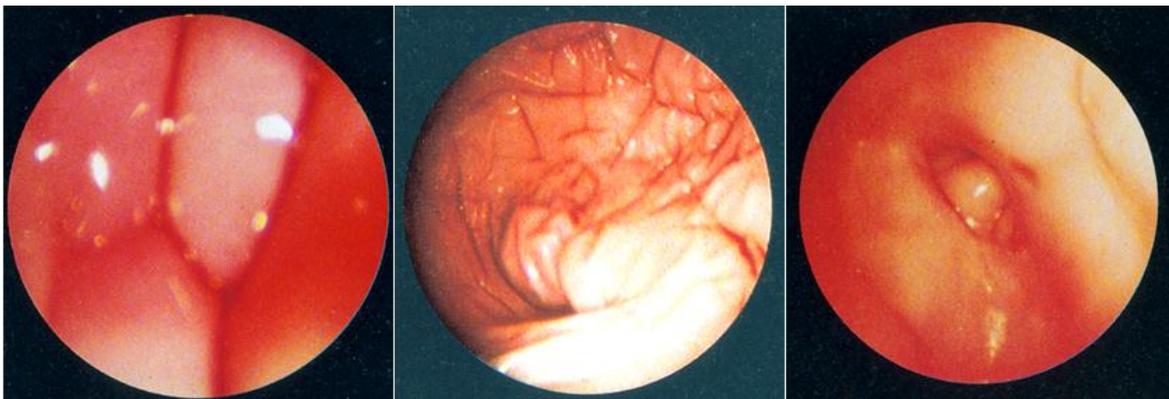


Fig.20. Imágenes de la mucosa vaginal a la observación con el vaginoscopio. En la figura de la izquierda se observa una imagen típica del proestro (mucosa edematizada y brillante), en la imagen del centro se observa la imagen característica del estro (mucosa arrugada, plegada) y en la derecha se observa una imagen característica del diestro (mucosa moteada) (Ref. Lindsay, 1983)

El diestro inicia al finalizar la aceptación de la monta, y se caracteriza por concentraciones de progesterona en aumento; alcanzando un pico alrededor de las 2-3 semanas desde su comienzo. La progesterona se mantiene en una meseta durante 1 a 2 semanas más y luego desciende hasta valores menores a 1 ng/ml, considerándose un nuevo inicio de anestro (Concannon, 2011). A la vaginoscopía se observa la pérdida de los pliegues de la mucosa, tomando la misma un aspecto moteado, debido a la descamación no uniforme del epitelio (Fig. 20). En la citología vaginal de finales del estro se observa que las células superficiales comienzan a disminuir, aumentando las células intermedias y parabasales. Ya en el diestro comienzan a aparecer leucocitos y detritus, y se pueden observar células epiteliales con neutrófilos en su interior (metaestrales) (Fig. 19). En la medida que el diestro avanza, las citologías se asemejan a aquellas del anestro (Nelson y Feldman, 2004).

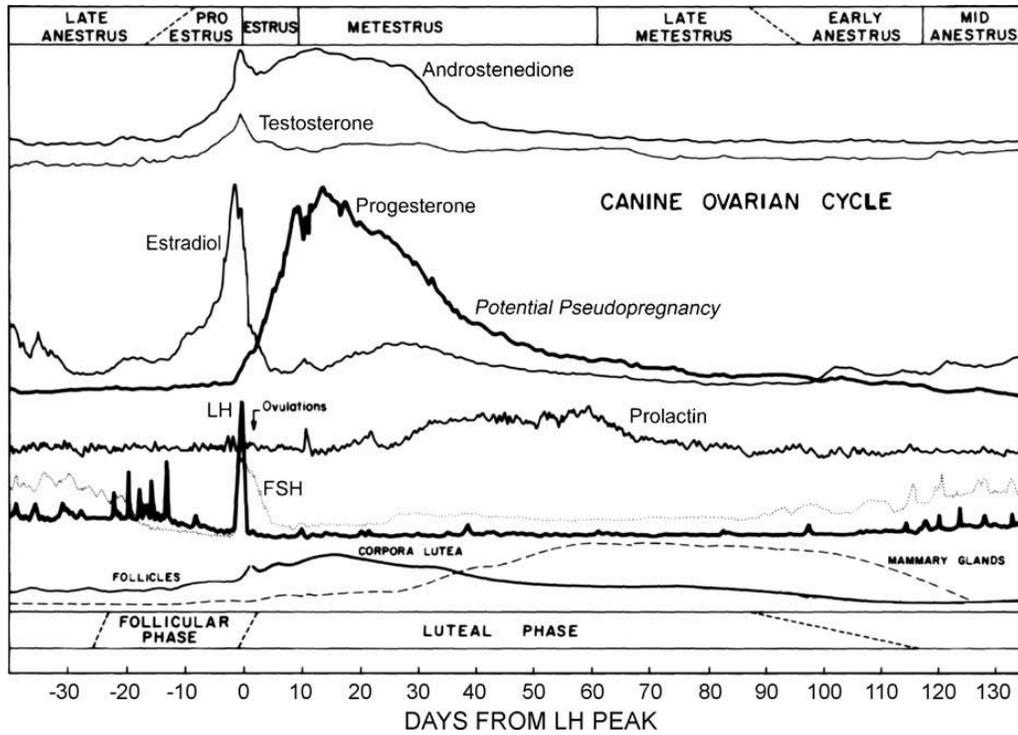


Fig. 21. Variaciones hormonales a lo largo del ciclo estral de la perra. Se puede observar el pico del estradiol al final del proestro, la caída del mismo al iniciar el estro y el aumento progresivo de la progesterona desde el estro hacia el diestro (Metestrus y late metestrus refieren al diestro) (Ref. Concannon, 2011).

I.-C. Dimorfismo sexual del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal

El dimorfismo sexual del eje HHA ha sido descrito en diversas especies en condiciones fisiológicas (Seale et al. 2005; Romeo 2010; Panagiotakopoulos y Neigh, 2014). Tanto en ratas como en primates y ovinos se ha observado que las concentraciones basales de corticosterona o de cortisol, como aquellas inducidas por el stress, son mayores en hembras que en machos (Kitay 1961, Viau y Meaney 1991; Handa y Weiser 2014; van Lier et al., 2014). Asimismo, en roedores, la secreción de ACTH basal y post-stress es mayor en hembras que en machos (McCormick et al., 1998). En ovinos la concentración de cortisol post-ACTH es mayor en hembras que en machos, y estas diferencias entre géneros desaparecen al comparar animales gonadectomizados (Van Lier, 2003a). En el perro, Pessina et al (2009) reportaron un efecto del género sobre las pruebas diagnósticas para síndrome de cushing en animales sanos, observándose que la variación del cortisol en respuesta a la estimulación con ACTH e inhibición con dexametasona es mayor en hembras respecto a los machos. Asimismo, Atkinson y Waddell (1997) reportaron diferencias en las concentraciones plasmáticas de corticosterona entre ratas en proestro (pico estrogénico) y machos. Estas diferencias sugieren un posible impacto del estradiol sobre el eje HHA. De hecho, en un estudio con glándulas adrenales in vitro se observó un aumento en la secreción de corticosterona en respuesta a la ACTH, en roedores a los que se había administrado previamente benzoato de estradiol (Lo et al, 2000). Al contrario, tanto la castración como el uso de antagonistas del estradiol en ratas, disminuyen la secreción de ACTH y corticosterona inducidas por el stress (Viau y Meaney, 1991; Burgess y Handa, 1992; Handa et al., 1994a; Lund et al., 2006; Weiser y Handa, 2009; Serova et al., 2010; Liu et al., 2012).

Las diferencias entre géneros no sólo se han evidenciado a nivel hormonal, sino también en las características morfológicas del eje HHA. Vidal et al. (1995) y Filippa y Mohamed (2006) han reportado características morfológicas diferenciales entre géneros en vizcachas y visones; proponiendo que los hallazgos observados se deberían al efecto de los esteroides sexuales sobre el área corticotropa.

Aunque existen muchos reportes acerca del efecto del estradiol sobre el eje HHA (Handa y Weiser 2014), los mecanismos de acción no han sido completamente elucidados. Se ha propuesto que ejercería un efecto estimulador a nivel central o en la glándula adrenal (Burgess y Handa 1993; Carey et al 1995; Lo et al. 2000; van Lier et al. 2003b; Kageyama y Suda 2009; Weiser y Handa 2009). Se postula que podría disminuir la expresión de los receptores MR en hipocampo o alterar su unión a los glucocorticoides (Burgess y Handa, 1993; Carey et al, 1995; Patchev y Almeida, 1996); al igual que también podrían afectar la expresión de los receptores GR (Burgess y Handa, 1993; Weiser y Handa, 2009), o inducir defectos post-transcripcionales en los mismos (Burgess y Handa, 1992). De hecho, en un estudio realizado en ratas, se observó que la castración aumenta la expresión de ARNm del receptor GR en la adenohipófisis; mientras que la suplementación con estradiol revierte este efecto (Peiffer y Barden, 1987). Asimismo se ha propuesto que el estradiol actuaría a nivel del núcleo paraventricular y células adyacentes afectando la síntesis y secreción de CRH y de HAD (McCormick et al., 1998; Lund et al, 2006; Ogura et al, 2008; Kageyama y Suda, 2009; Weiser y Handa, 2009). Ochedalski et al (2007) refirieron que en ratas el estradiol aumenta la producción de ARNm de POMC. Se ha propuesto además que el estradiol estimularía la síntesis de IL-6, la cual consecuentemente aumentaría la transcripción de CRH (Ogura et al, 2008).

Por el contrario, hay pocos datos acerca de la influencia de la progesterona en la célula corticotropa o en la glándula adrenal. Si bien se encontró que en la preñez tardía tanto en

mujeres como en ovejas los niveles de cortisol aumentaban, no se pudo determinar la implicancia de la progesterona en este acontecimiento (Goland et al. 1994; Keller-Wood 1998; Keller-Wood y Wood 2001). Por otra parte, no se observaron variaciones en las concentraciones de ACTH y α -MSH en perras a las que se les administró progesterona exógena (Beijerink et al. 2007).

Respecto a los andrógenos, en estudios realizados en roedores, monos y humanos, se postula que los mismos tendrían acción inhibitoria sobre el eje HHA (Handa et al., 1994b; Rubinow et al., 2005; Williamson y Viau, 2008; Toufexis y Wilson, 2012; Kalil et al., 2013). En ratas macho gonadectomizadas, la administración de testosterona disminuye las concentraciones de corticosterona (McCormick et al. 2002; Lund et al. 2004; Viau et al., 2005; Handa et al. 2009; Evuarherhe et al. 2009). Asimismo, se ha descrito que la testosterona disminuiría la síntesis de CRH y HAD (Seale et al., 2005; Bao et al., 2006).

I.-D. Expresión de receptores a esteroides sexuales en distintas regiones del eje HHA

Mitchner et al. (1998) comprobaron la presencia de receptores de estrógenos alfa (RE α) en las células corticotropas, tanto en el lóbulo anterior como en la pars intermedia de la rata; los cuales mediarían la acción del estradiol en la hipófisis. Asimismo, el grupo de González et al (2008) observó que la expresión de dichos receptores en la hipófisis varía en las distintas etapas del ciclo estral en relación a los cambios en las concentraciones plasmáticas de estradiol. El RE α también fue identificado a nivel hipotalámico, en tejidos cercanos al núcleo paraventricular, postulándose otro sitio de acción para el estradiol (Weiser y Handa, 2009).

Asimismo, tanto en ratas como en ovejas se ha identificado la presencia del RE α a nivel de la zona fascicular adrenal (Cutler 1978; van Lier et al., 2003b). Mediante este receptor, el estradiol podría ejercer un efecto estimulador de la esteroideogénesis (Nowak et al., 1995). Del mismo modo, algunos autores sugieren que el estradiol actuaría en la glándula adrenal modificando la sensibilidad de la misma a la ACTH (Figueiredo et al., 2007; van Lier et al., 2014).

Se ha reportado que el receptor de andrógenos se encuentra presente en glándula adrenal, hipocampo y núcleo paraventricular (Michael y Rees, 1982; Handa et al., 1994a; Bentvelsen et al., 1996; van Lier et al., 2014). En ovinos se ha identificado al receptor de progesterona en hipófisis e hipotálamo (Scott et al., 2000; Tasende et al., 2002), al igual que en la corteza adrenal (van Lier et al., 2014). Este receptor también fue identificado en la corteza y médula adrenal de la yegua (Alm et al., 2009).

1.-E. Variaciones estacionales en el eje HHA

En diversas especies se ha reportado que existen variaciones estacionales en las concentraciones de las hormonas del eje HHA (Cordero et al., 2012). Romero (2002) refiere que las variaciones anuales en la concentración de glucocorticoides descritas en las distintas especies estarían asociadas a eventos como la migración, la reproducción o la muda de pelo o plumas. Asimismo, los carneros en estación reproductiva presentan menor concentración de cortisol post ACTH que en la estación no reproductiva (van Lier et al., 2003a). Por el contrario, en un estudio realizado en ciervos, se encontró que la respuesta del cortisol a la estimulación con ACTH era máxima en primavera (estación reproductiva) y mínima en el otoño (Ingram et al., 1999).

Las variaciones estacionales en el eje HHA también se observaron a nivel morfológico. En sapos se reportaron diferencias en las características de las células corticotropas en distintas épocas del año (Pramoda y Saidapur, 1991). También se observaron diferencias en características histomorfológicas de dichas células en roedores; sugiriendo que las mismas responderían al efecto de la melatonina sobre la hipófisis (Hira et al., 2001; Filippa y Mohamed 2006).

Hasta el momento no se han reportado estudios acerca de las variaciones estacionales del eje HHA en perros.

1.-F. Mecanismos de desarrollo tumoral en la hipófisis

El hipercortisolismo dependiente de la hipófisis o Enfermedad de Cushing en el perro es más frecuente en hembras que en machos (74% de los casos); y mientras su prevalencia es similar en perras adultas y gerontes, en los machos la misma es mayor en perros adultos (Gallelli et al. 2010). Asimismo, el tamaño del corticotropinoma se ve afectado por el sexo de los animales, ya que las hembras presentan predominantemente tumores extraselares, mientras que en los machos predominan los tumores intraselares (Gallelli et al. 2010). Del mismo modo, en humanos la patología presenta mayor prevalencia en mujeres (Pecori Giraldi et al., 2003). Estos hallazgos sugieren que las hormonas sexuales podrían tener un efecto sobre el eje HHA, en condiciones patológicas.

A diferencia de lo que sucede en las células corticotropas, en las lactotropas el rol de los estrógenos está mucho más definido, reportándose su influencia en el desarrollo del prolactinoma, mediante su unión al RE α (Lee et al, 2001; Paez Pereda et al 2003; Christin-Maître et al, 2007; Giacomini et al, 2009). La importancia de estos hallazgos radica en que estos mecanismos de desarrollo tumoral podrían presentarse en otros

tumores hipofisarios, como el corticotropinoma, dado que comparten vías moleculares involucradas en su desarrollo (Paez Pereda et al 2003; Giacomini et al 2006; Labeur et al., 2010). El origen de este tumor es aún desconocido, postulándose dos teorías: la hipotalámica y la monoclonal. La primera, propone que la sobreestimulación de la corticotropa conduciría a la hiperplasia celular, y que la mayor proliferación haría a estas células más susceptibles a mutar, dando lugar a la presentación del tumor (Asa y Ezzat, 1998; Dahia y Grossman, 1999). La teoría monoclonal, postula que el adenoma se desarrollaría a partir de una mutación somática en la célula corticotropa, con la consiguiente expansión clonal (Levy y Lightman, 2003; Melmed, 2003). Se desconocen cuál/cuáles mutación/nes estarían involucradas en el desarrollo del corticotropinoma, pero dada la gran cantidad de factores reguladores del área corticotropa, se proponen múltiples mecanismos (van Wijk et al., 1998; Lidhar et al, 1999; Levy and Lightman, 2003; Giacomini et al, 2006; Hanson et al, 2008).

I.-G.Consideraciones finales

El eje HHA es un sistema complejo, regulado por múltiples factores. El dimorfismo sexual de este eje ha sido descrito en diversas especies en condiciones fisiológicas; proponiéndose que los esteroides sexuales tendrían un impacto sobre el mismo y determinarían estas diferencias. De igual modo, el fotoperiodo podría tener un rol regulador sobre este eje. Son pocos los reportes acerca de las variaciones del eje HHA en relación al sexo y la estacionalidad en el perro, por lo que estos hallazgos permitirían ampliar el conocimiento acerca de su regulación, y abrirían un camino hacia el estudio de la asociación entre el dimorfismo sexual del mismo y el desarrollo del corticotropinoma en esta especie.

V. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

a) General

Habría dimorfismo sexual del área corticotropa en el perro, tanto morfológico como funcional, con variaciones estacionales (otoño-invierno y primavera-verano). Dicho dimorfismo se vería reflejado asimismo a nivel de la glándula adrenal.

b) Particulares

1) Las hormonas sexuales (estradiol, progesterona y testosterona) estarían asociadas a concentraciones plasmáticas diferenciales de ACTH, α -MSH y cortisol en machos, hembras castradas y hembras no castradas; presentando diferencias estacionales.

2) En las hembras no castradas habría variación de ACTH, α -MSH y cortisol según la fase del ciclo estral y la estación del año.

3) La morfología de las células corticotropas (área celular, nuclear y citoplasmática, y la densidad óptica) y su proporción en la hipófisis variaría entre machos y hembras, al igual que en las distintas estaciones.

4) Habría expresión diferencial del receptor MCR2 en la zona fascicular en machos y hembras, al igual que en las distintas estaciones.

Hipótesis surgidas durante la investigación:

1) Habría expresión diferencial del RE α y del receptor para progesterona (RP) en la zona fascicular adrenal en machos y hembras, al igual que en las distintas estaciones.

2) El RE α se expresaría en las células corticotropas.

V. OBJETIVOS

OBJETIVOS

a) Generales

- 1) Determinar si hay dimorfismo sexual del área corticotropa en el perro.
- 2) Evaluar si las diferencias de horas luz (otoño-invierno y primavera-verano) del año tienen influencia sobre la morfología y función del área corticotropa.
- 3) Determinar si hay dimorfismo sexual a nivel de la zona fascicular de la glándula adrenal y si la misma se ve afectada por las diferencias de horas luz anuales.

b) Particulares

- 1) Determinar si hay diferencias en las concentraciones plasmáticas de cortisol, ACTH y α -MSH entre machos, hembras castradas y hembras no castradas en anestro; y en las distintas etapas del ciclo estral; al igual que en distintas estaciones del año.
- 2) Determinar si hay diferencias entre machos y hembras, y en distintas estaciones del año en: el área celular, nuclear y citoplasmática, y en la densidad óptica de las células corticotropas; al igual que en la proporción en que se encuentran en la hipófisis.
- 3) Determinar si hay expresión diferencial de MCR2 en la zona fascicular de las glándulas adrenales entre sexos, y en distintas estaciones del año.

Objetivos propuestos durante la investigación:

- 1) Determinar si existe expresión del receptor de estrógenos alfa (RE α) en las células fasciculares adrenales y en las células corticotropas.

- 2) Determinar si la expresión del RE α en las células fasciculares adrenales difiere según el sexo y la estación del año.
- 3) Determinar si existe expresión del RP en las células fasciculares adrenales, y si la misma difiere según el sexo y la estación del año.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Métodos

El presente estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) y la Secretaría de Ciencia y Técnica (proyectos V006, 20020100100246 y 20720130100004BA), de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. El mismo cumple con las normas nacionales e internacionales vigentes sobre el uso de animales en ensayos clínicos.

Experiencia 1: Evaluación hormonal

a) *Población de estudio*

Grupo perras no castradas (n=11): 5 Beagle, 2 Ovejero Alemán, 2 Schnauzer mini y 2 mestizos (Mediana= 6 años [5-9 años]); sin patologías preexistentes, que habitan en criaderos de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y en caniles de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

Las extracciones de sangre se realizaron entre octubre y febrero (primavera-verano) (período con horas luz mayor o igual a 12hrs; con promedio de 14 h 15 min, con una heliofanía efectiva media de 8.1 h/d y una temperatura media de 22.3 °C), y entre mayo y agosto (otoño-invierno) (periodo con horas luz menor a 12hs, con promedio de 10 h 04 min, con una heliofanía efectiva media de 4.2 h/d y una temperatura media de 12.5 °C); denominándose a estos períodos, “fotoperíodo positivo” (Ph+) y “fotoperíodo

negativo” (Ph-), respectivamente. Por los registros de caniles y de los criaderos, se sabía que las perras tienen su ciclo estral entre noviembre y febrero y luego repiten entre mayo y agosto. Por este motivo se comenzó con la toma de muestras correspondiente al anestro 15 días antes de la fecha prevista en que comenzarían su ciclo. Las perras fueron monitoreadas cada 48hs por citología vaginal y vaginoscopía para la detección de las etapas del ciclo estral. Junto a estos métodos, se tuvieron en cuenta las concentraciones plasmáticas de estradiol y progesterona. De este modo, las extracciones de sangre se realizaron en anestro (AE) (21 ± 5 días previos al inicio del sangrado vaginal), fin del proestro (PE) (promedio de 7 ± 1 días de inicio del sangrado vaginal), inicio del estro (E) (2-3 días posteriores al pico de LH) y diestro (DE) (3 semanas de finalizado el estro).

Grupo de *perros machos y perras castradas* ($n=20$): constituido por 9 perros machos (6 Beagle y 3 mestizos) no castrados, 5 machos castrados (2 Beagle y 3 mestizos) y 6 perras castradas (4 mestizas y 2 Schnauzer mini); (Mediana= 6 años [5-10 años]); sin patologías preexistentes provenientes de criaderos de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y de caniles de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. En este grupo las extracciones de sangre se realizaron en el mismo momento que para las perras en anestro, en ambos fotoperíodos, con el objetivo de comparar los valores obtenidos con aquellos de las perras en AE. A este grupo se lo consideró en “condiciones basales” (machos castrados y no castrados, hembras castradas y hembras no castradas en anestro). El fin de este análisis fue evaluar el impacto del sexo y de la presencia/ausencia de las gónadas (estatus gonadal), sobre las concentraciones plasmáticas de las hormonas estudiadas.

b) *Citología vaginal*

Las citologías se realizaron con hisopos embebidos en solución fisiológica y fijados con alcohol PVP-VA spray. Se realizó la coloración de Shorr modificada por Schutte del siguiente modo:

- 1- Pasaje en alcohol 70°
- 2- Pasaje en agua destilada
- 3- Tinción con hematoxilina ácida de Erlich durante 2 minutos
- 4- Pasaje en agua corriente
- 5- Tinción con escarlata de Biebrich durante 2 minutos
- 6- Pasaje en agua corriente
- 7- Baño en ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico durante 2 minutos
- 8- Baño en agua corriente durante 2 minutos
- 9- Baño en Fast green durante 2 minutos
- 10- Baño en agua corriente durante 2 minutos
- 11- Pasaje del preparado por diluciones de alcohol (96°-100°) y xilol
- 12- Montaje con Bálsamo de Canadá

Las observaciones se realizaron con un microscopio óptico, teniendo en cuenta la presencia de los distintos tipos celulares del epitelio vaginal, de leucocitos, eritrocitos y de detritus.

c) *Extracción y procesamiento de muestras*

Las extracciones de sangre se realizaron cada 24hs. Todas las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos plásticos (con o sin EDTA, según fuera necesario), centrifugadas y congeladas a -80°C hasta el momento de su uso. Particularmente las muestras obtenidas para determinación de ACTH, fueron recolectadas en tubos refrigerados, con EDTA y Aprotinina.

d) *Análisis hormonal*

1- Se midió ACTH plasmática mediante enzimoimmunoanálisis (ELISA) con el kit comercial "ACTH Alpc Diagnostics", Alpc Diagnostics. El coeficiente de variación intra e interensayo fue de 6,7 y 7,1% respectivamente; y la sensibilidad de 5 pg/ml.

2- Se midió α -MSH plasmática mediante ELISA, con el kit " α -MSH EIA kit", Phoenix Pharmaceuticals Inc. El coeficiente de variación intra e interensayo fue de 6% y 10% respectivamente; y la sensibilidad de 1 ng/ml.

3- Se midió cortisol sérico mediante ELISA con el kit "Cortisol Alpc Diagnostics", Alpc Diagnostics. El coeficiente de variación intra e interensayo fue de 7% y 8,1% respectivamente; y la sensibilidad de 0,5 μ g/dl.

4- Se midió estradiol sérico (E2) mediante quimioluminiscencia con el kit “Immulite” (Siemens). El coeficiente de variación intra e interensayo fue de 6,3% y 9,3% respectivamente; y la sensibilidad de 5 pg/ml.

5- Se midió progesterona sérica (P4) mediante quimioluminiscencia con el kit “Immulite” (Siemens). El coeficiente de variación intra e interensayo fue de 6,3% y 7,9% respectivamente; y la sensibilidad de 0,2 ng/ml.

6- Se midió Testosterona sérica (T) mediante ELISA con el kit “Testosterone ELISA”, Alpc Diagnostics. El coeficiente de variación intra e interensayo fue de 7,7 y 8,5% respectivamente; y la sensibilidad de 0,02 ng/ml.

Experiencia 2: Evaluación morfológica de las células corticotropas y expresión de Receptor para ACTH (MC2R), Receptor para Estradiol (RE α) y Receptor para Progesterona (RP) en zona fascicular de la glándula adrenal. Analisis de co-localizacion del RE α en las células corticotropas.

a) *Material de estudio*

Hipófisis (n=28) y glándulas adrenales (n=28): En cada fotoperiodo se obtuvieron hipófisis y glándulas adrenales de hembras (n=7) y de machos (n=7). En el fotoperiodo positivo, se obtuvieron muestras de hembras mestizas (n=5), labradores (n=2); mientras que los machos incluidos en el estudio fueron mestizos (n=5) y Bóxer (n=2). En el fotoperiodo negativo se obtuvieron muestras de perras mestizas (n=4) y Golden Retriever (n=3); y de

perros machos mestizos (n=5) y Doberman (n=2). El rango etario de los perros fue de 5-10 años.

Las hipófisis y glándulas adrenales fueron obtenidas de perros eutanasiados por razones humanitarias, siguiendo una indicación veterinaria (ej. trauma medular, politraumatismo). Previo a la eutanasia se realizó una evaluación clínica de todos los animales. Los perros sospechosos de padecer enfermedades infecciosas o que pudieran afectar al eje HHA (ej. enfermedades oncológicas) fueron excluidos del estudio, al igual que los perros que recibieron algún tratamiento previo a la eutanasia. Asimismo, luego de realizar la necropsia, los perros diagnosticados con alguna de las enfermedades previamente mencionadas, fueron excluidos del estudio.

b) *Ensayo inmunohistoquímico*

Hipófisis

Las hipófisis de todos los perros fueron fijadas en formol bufferado al 4% e incluidas en parafina. Se realizaron cortes sagitales (5 μ m), los cuales fueron colocados en portaobjetos silaneados y luego hidratados mediante pasajes en xilol y alcoholes graduados, hasta un buffer fosfato salino (PBS, 0.01M, pH 7.4). Los cortes fueron incubados durante 20 min en una solución al 3% de H₂O₂ en agua destilada, para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena. Se realizaron lavados con PBS y luego se bloquearon los sitios de unión no específica mediante la incubación con un suero normal de cabra, durante 10 min (“Immunoperoxidase secondary detection system”, DAB 150, Millipore, Temecula, CA, USA). Se realizó un lavado con PBS y luego los cortes fueron incubados durante 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente con una dilución

1:400 en PBS del anticuerpo primario anti ACTH (mouse monoclonal, sc-52980, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Luego de lavar los cortes con PBS, se utilizó el sistema “Immunoperoxidase secondary detection system” (DAB 150, Millipore, Temecula, CA, USA). De este modo, los cortes fueron incubados durante 10 min con un anticuerpo anti-ratón biotinilado. Se realizaron lavados con PBS y se incubaron los cortes durante 10 min con la peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina. Finalmente los cortes fueron lavados con PBS y los sitios de reacción fueron revelados con una solución cromógena de 3,3´ diaminobenzidine (DAB). Todos los cortes se procesaron en un mismo ensayo y con el mismo tiempo de revelado. Los cortes fueron levemente contrastados con hematoxilina, deshidratados mediante pasajes en alcoholes graduados y xilol, y posteriormente montados. Los controles negativos se realizaron mediante la omisión del anticuerpo primario, colocando en su lugar IgG de ratón (normal mouse IgG, sc-2025, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) en concentración equivalente a la del anticuerpo primario.

Glándulas adrenales

Las glándulas adrenales de todos los perros fueron fijadas, embebidas en parafina, cortadas e hidratadas tal como lo descrito para hipófisis. Se realizó recuperación antigénica sólo para los cortes utilizados para inmunomarcación de RE α y RP; para lo cual los cortes fueron colocados en un buffer citrato (0.01 M, pH = 6.0) en microondas (potencia 900 W) durante 10 min. Los cortes se dejaron enfriar a temperatura ambiente y luego fueron lavados con PBS. Luego, todos los cortes fueron incubados durante 20 min con una solución al 3% de H₂O₂ en agua destilada y lavados con PBS. El bloqueo de los sitios de unión no específica se realizó mediante la incubación con un suero normal de caballo durante 30 min (Vectastain ABC-Kit, Elite, PK-6102, Burlingame, CA, USA).

Luego, los cortes fueron incubados en una cámara húmeda durante 2 horas a temperatura ambiente con una dilución 1:100 en PBS del anticuerpo primario anti-MC2R (rabbit polyclonal; sc-13107, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) o con una dilución 1:25 en PBS del anticuerpo primario anti-RE α (mouse monoclonal, sc-787, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) o con una dilución 1:50 en PBS del anticuerpo monoclonal de ratón contra la región N-terminal de RP (Zymed, PR-2C5). Luego de ser lavados con PBS, los cortes fueron incubados durante 1 hora con una dilución 1:200 del anticuerpo biotinilado anti-conejo (BA-1000, Vector, Burlingame, CA, USA) o del anticuerpo biotinilado anti-ratón (BA-200, Vector, Burlingame, CA, USA), acorde al anticuerpo primario previamente utilizado. Los cortes fueron lavados con PBS y luego se utilizó el sistema de detección "Vectastain Elite ABC Kit" (Vector, Burlingame, CA, USA). Los siguientes pasos se realizaron tal como lo descrito en hipófisis. En todos los casos, los controles negativos se realizaron mediante la omisión del anticuerpo primario, colocando en su lugar IgG de ratón o de conejo, según correspondiera (normal mouse IgG, sc-2025, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA o normal rabbit IgG, sc-2027, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), en concentración equivalente a la del anticuerpo primario.

c) *Co-localización del RE α en las células corticotropas mediante inmunofluorescencia*

Se realizó un análisis de co-localización para ACTH y RE α . Las hipófisis de todos los animales fueron fijadas, incluidas en parafina, cortadas e hidratadas tal como lo descrito previamente. Se realizó recuperación antigénica para la detección del RE α , tal como lo descrito para glándulas adrenales. Se realizaron lavados con PBS y luego se bloquearon los sitios de unión no específica mediante la incubación con un suero normal

de cabra, durante 10 min (“Immunoperoxidase secondary detection system”, DAB 150, Millipore, CA, USA). Luego los cortes fueron incubados toda la noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda con una dilución 1:25 en PBS del anticuerpo primario anti-RE α (mouse monoclonal, sc-787, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Los cortes fueron lavados con PBS e incubados durante 1 hora con una dilución 1:125 en PBS de un anticuerpo biotinilado anti-ratón (E0354, DAKO). Los cortes fueron lavados con PBS e incubados durante 1 hora con dilución 1:100 en PBS del conjugado estreptavidina-FITC (SA 100-02, Molecular Probes, Invitrogen). Luego de ser lavados con PBS, los cortes fueron incubados toda la noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda con una dilución 1:100 en PBS del anticuerpo primario anti-ACTH (rabbit-anti human ACTH-IC-3, NIDDK)(este anticuerpo fue elegido por ser de una especie distinta a la del anticuerpo anti-RE α , otorgando así mayor validez a la técnica) . Los cortes fueron lavados con PBS e incubados durante 1 hora con una dilución 1:100 en PBS del anticuerpo anti-conejo rodamina (AP132R; Chemicon International). Los cortes fueron montados con PBS-glicerol (1:1). Los controles negativos se procesaron siguiendo el mismo protocolo, reemplazando los anticuerpos primarios por PBS.

d) *Análisis de imágenes*

Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Leica DCC-380X adjunta a un microscopio trinocular (Leica, DM4000B Led), con el software de captura Las Leica Inc., con una magnificación de 1000X. Luego se trabajó con el software Qwin Plus Leica Inc. Corp.

En las muestras de hipófisis, se analizaron las imágenes de 40 campos no consecutivos por corte, seleccionados aleatoriamente, para determinar la cantidad de

células inmunomarcadas/células totales por campo (proporción de células corticotropas por campo) (campo= 12262 μ^2). Las células corticotropas fueron caracterizadas utilizando los siguientes parámetros: área celular, área nuclear y citoplasmática y densidad óptica. Con este objetivo, se analizaron 100 células inmunomarcadas por corte.

La expresión del RE α y de RP en la zona fascicular adrenal, fue evaluada mediante la cantidad de células inmunomarcadas/células totales por campo, en base a imágenes de 40 campos no consecutivos, seleccionados aleatoriamente (la zona glomerular y reticular fueron excluidas de este estudio) (campo= 12262 μ^2).

La expresión del MC2R fue evaluada mediante el análisis de la densidad óptica de 100 células inmunopositivas por corte.

En ambos casos (hipófisis y glándula adrenal), el análisis de densidad óptica se realizó luego de transformar las imágenes a 8-bit (escala de grises). La calibración de la densidad óptica se realizó mediante una tabla calibrada de escala de grises (“step tablet”). La curva de calibración se extendió entre 0 y 2.6 (valores de densidad óptica). De este modo, a medida que aumenta la intensidad de inmunomarcación, también lo hace la densidad óptica (Oberholzer et al., 1996; Optical density calibration).

Las imágenes del estudio de co-localización fueron analizadas mediante un microscopio laser confocal (Olympus FV-30 adjunto a un microscopio Olympus Bx-61).

Análisis estadístico

Las hormonas en las distintas fases del ciclo dentro del mismo fotoperíodo y entre fotoperiodos fueron evaluadas por medio de ANOVA repetitivo, seguido por el test de Tukey-Kramer. La comparación entre los perros machos (castrados y no castrados),

hembras castradas y las perras en anestro al igual que la comparación de cada grupo entre fotoperíodos, se realizó mediante ANOVA, seguido por el test de Tukey-Kramer.

El análisis de la interacción entre las fases del ciclo estral y el fotoperiodo, o el sexo y el fotoperiodo se realizó mediante ANOVA de doble vía, seguido por el test de Bonferroni (Graph Pad 5, USA). Para el análisis de correlación se utilizó el test de Pearson. Las variables se expresan como promedio y SEM. El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$.

Las variables morfológicas (proporción de células inmunomarcadas por campo, área celular, área nuclear, área citoplasmática, y densidad óptica) se analizaron por medio de ANOVA de doble vía, seguido por el test de Bonferroni; teniendo en cuenta el efecto del sexo, el fotoperiodo y la interacción entre ambos factores (Graph Pad 5, USA). Las variables se expresan como promedio y SEM. El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$.

VII. RESULTADOS

Resultados

Experiencia 1: Análisis hormonal

a) Concentraciones hormonales en perros de distinto sexo y estatus gonadal (castrados o no castrados)

a.1. Estradiol, progesterona y testosterona

El E2 y la T se vieron afectados por el sexo y el estatus gonadal, ya que ambas hormonas se encontraron más elevadas en hembras no castradas en AE y en machos, respectivamente, respecto al resto de los grupos ($P < 0.0001$), pero no se vieron afectados por el fotoperíodo (Tabla 1).

La P4 no se vio afectada por el sexo ni por el fotoperíodo.

Hormona	Fotoperíodo Positivo				Fotoperíodo negativo			
	AE	Hc	M	Mc	AE	Hc	M	Mc
E2	9,2±0,27*	7,7±0,17	8±0,23	7,8±0,4	8,6±0,28*	7,5±0,13	7,6±0,18	7,5±0,3
P4	0,51±0,04	0,49±0,09	0,36±0,04	0,42±0,06	0,48±0,08	0,45±0,07	0,41±0,05	0,31±0,05
T	0,04±0,005	0,03±0,004	4,9±0,5*	0,06±0,01	0,037±0,003	0,035±0,005	5,4±0,5*	0,04±0,008

Tabla 1. Concentraciones de estradiol (E2)(pg/ml), progesterona (P4)(ng/ml) y testosterona (T) (ng/ml) en hembras no castradas en anestro (AE), perras castradas (Hc), machos (M) y machos castrados (Mc), en distintos fotoperíodos.

*Indica diferencias significativas entre las hembras y el resto de los grupos para la concentración de estradiol (en ambos fotoperíodos), y entre los machos y el resto de los grupos para la concentración de testosterona (en ambos fotoperíodos) ($P < 0.0001$).

Los valores se expresan como promedio \pm SEM.

a.2. ACTH, α -MSH y cortisol

La ACTH y α -MSH no se vieron afectadas por el sexo ni el estatus gonadal; así como tampoco se encontraron diferencias significativas entre fotoperíodos para estas hormonas (Tabla 2).

El Cortisol fue afectado por el fotoperíodo, observándose que las hembras castradas, y los machos castrados y no castrados, en el fotoperíodo negativo presentaron mayores concentraciones de cortisol respecto al fotoperíodo positivo ($p < 0,05$) (Tabla 2). Si bien en AE, las concentraciones de cortisol fueron mayores en el fotoperíodo negativo (Ph-: $1.7 \mu\text{g/dl} \pm 0.6 \mu\text{g/dl}$ vs. Ph+: $1.3 \mu\text{g/dl} \pm 0.7 \mu\text{g/dl}$), estas diferencias no fueron significativas. No se observaron diferencias significativas entre animales de distinto sexo o estatus gonadal dentro del mismo fotoperíodo.

Hormona	Fotoperíodo Positivo				Fotoperíodo negativo			
	AE	Hc	M	Mc	AE	Hc	M	Mc
ACTH	14,3 \pm 0,4	13,2 \pm 0,8	12,2 \pm 0,5	13 \pm 0,8	12,7 \pm 0,7	13 \pm 0,8	12,6 \pm 0,8	12,3 \pm 0,7
α -MSH	9,8 \pm 0,2	9,9 \pm 0,2	10 \pm 0,3	9,9 \pm 0,4	9,9 \pm 0,4	10,1 \pm 0,5	10,3 \pm 0,6	9,7 \pm 0,7
Cort	1,3 \pm 0,2	1 \pm 0,13*	1,2 \pm 0,2*	1 \pm 0,1*	1,7 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2	1,9 \pm 0,24	1,8 \pm 0,3

Tabla 2. Concentraciones de ACTH (pg/ml), α -MSH (ng/ml) y cortisol (Cort)($\mu\text{g/dl}$) en hembras no castradas en anestro (AE), hembras castradas (Hc), machos (M) y machos castrados (Mc), en distintos fotoperíodos.

* Indica el efecto del fotoperíodo sobre las concentraciones de cortisol para todos los grupos ($p < 0,05$) excepto las hembras no castradas en anestro.

Los valores se expresan como promedio \pm SEM

b) Concentraciones hormonales durante el ciclo estral en fotoperiodo positivo y negativo

b.1. Estradiol y progesterona

Las concentraciones de estradiol se vieron afectadas por la fase del ciclo estral ($P<0.0001$; F: 47.26), al igual que por el fotoperiodo ($P=0.011$); tomando mayores valores en el Ph-. No se encontró interacción entre el fotoperiodo y la fase del ciclo estral.

El E2 alcanzó un pico máximo en el PE y luego disminuyó en el E y DE en ambos fotoperiodos (Fig. 22). Se observaron diferencias significativas entre fotoperiodos en el PE ($P<0.01$).

La progesterona no se vio afectada por el fotoperíodo ($P=0.9$), pero sí por la fase del ciclo estral ($P<0.0001$; F: 354.9). Las concentraciones de esta hormona aumentaron progresivamente durante el ciclo hasta alcanzar su pico en el DE, de forma similar en ambos fotoperiodos (Fig. 22).

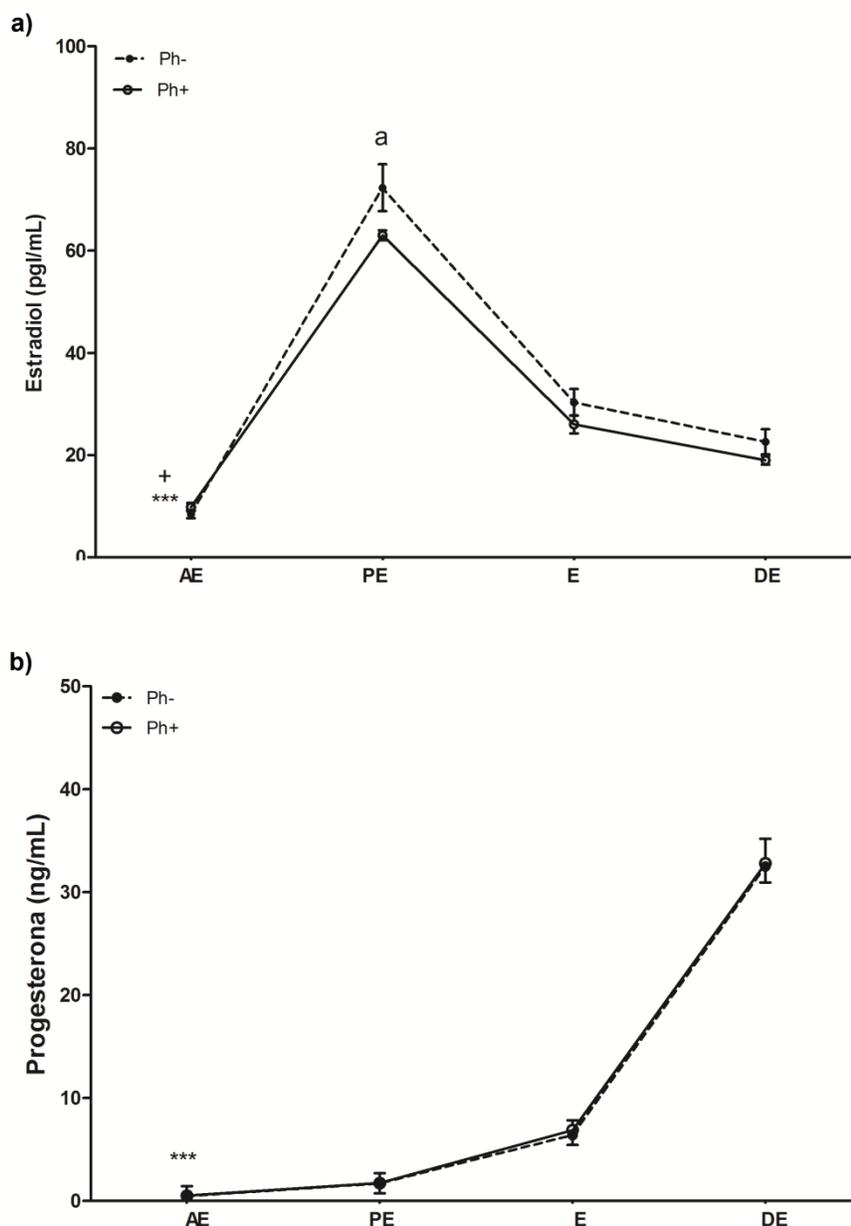


Fig. 22. Concentraciones de estradiol (a) y progesterona (b) durante el ciclo estral de la perra, en el fotoperiodo negativo (Ph-) y positivo (Ph+).

*** Indica el efecto de la fase del ciclo estral sobre la concentración de E2 y P4 ($P < 0.0001$). En la curva de la Figura 1a. (E2), la letra "a" indica diferencias significativas entre fotoperiodos en el PE ($P < 0.01$).

El efecto del fotoperiodo sobre las concentraciones hormonales se indica como "+" ($P = 0.011$).

b.2. ACTH, α -MSH y cortisol

Las concentraciones de ACTH se vieron afectadas por la fase del ciclo ($P < 0.0001$; F: 18.54), el fotoperiodo ($P = 0.04$), y la interacción entre ambos factores ($P = 0.0004$). El perfil hormonal en ambos fotoperiodos fue similar al del E2. La ACTH alcanzó su mayor concentración en el PE ($P < 0.001$ vs. AE), y disminuyó en el E (E vs. AE; $P < 0.001$ Ph-, $P < 0.01$ Ph+); pero se mantuvo en el DE, permaneciendo más elevada que en el AE (DE vs. AE; $P < 0.01$ Ph- , $P < 0.001$ Ph+) (Fig. 23). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre fotoperiodos solo en el PE; encontrándose mayores concentraciones en el Ph- respecto al Ph+ ($P < 0.001$).

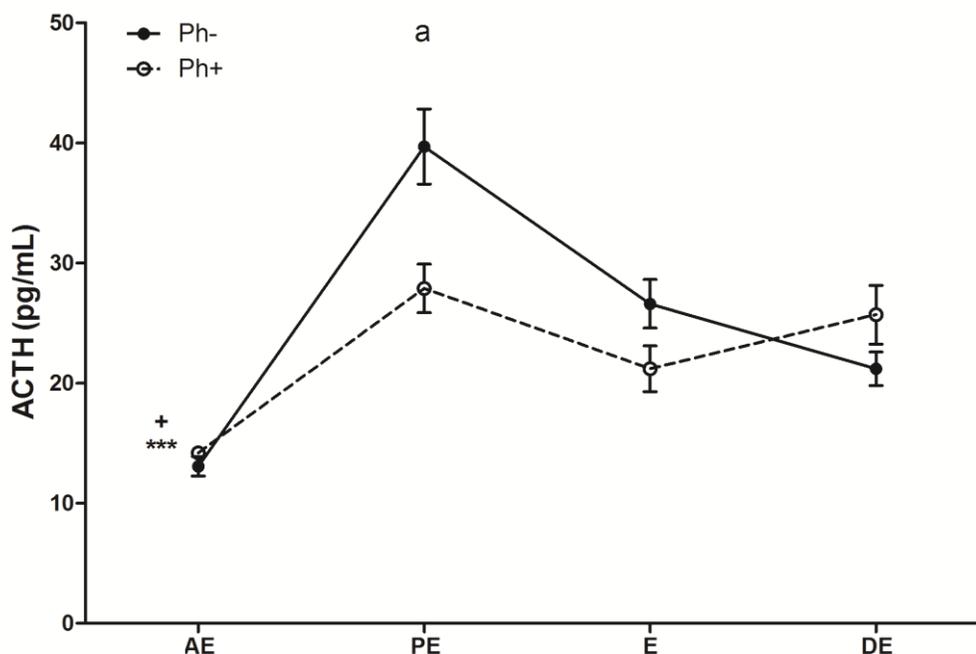


Fig. 23. Concentraciones de ACTH durante el ciclo estral de la perra en el fotoperiodo negativo (Ph-) y positivo (Ph+).

*** Indica el efecto de la fase del ciclo sobre la concentración de ACTH ($P < 0.0001$). La letra "a" indica diferencias significativas entre fotoperiodos en el PE ($P < 0.001$). El efecto del fotoperiodo se indica como "+" ($P = 0.0004$).

Las concentraciones de α -MSH (Fig.24) se vieron afectadas por la fase del ciclo ($P < 0.0001$, F: 22.04), el fotoperiodo ($P = 0.012$), y la interacción entre ambos factores ($P < 0.0001$). En ambos fotoperiodos, la α -MSH aumentó en el PE, alcanzó sus máximas concentraciones en el E, y luego disminuyó en el DE, permaneciendo más elevada que en el AE ($P < 0.001$). Sin embargo, la disminución entre el E y el DE fue más pronunciada en el Ph+. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre fotoperiodos solo en el E; encontrándose mayores concentraciones en el Ph+ respecto al Ph- ($P < 0.001$).

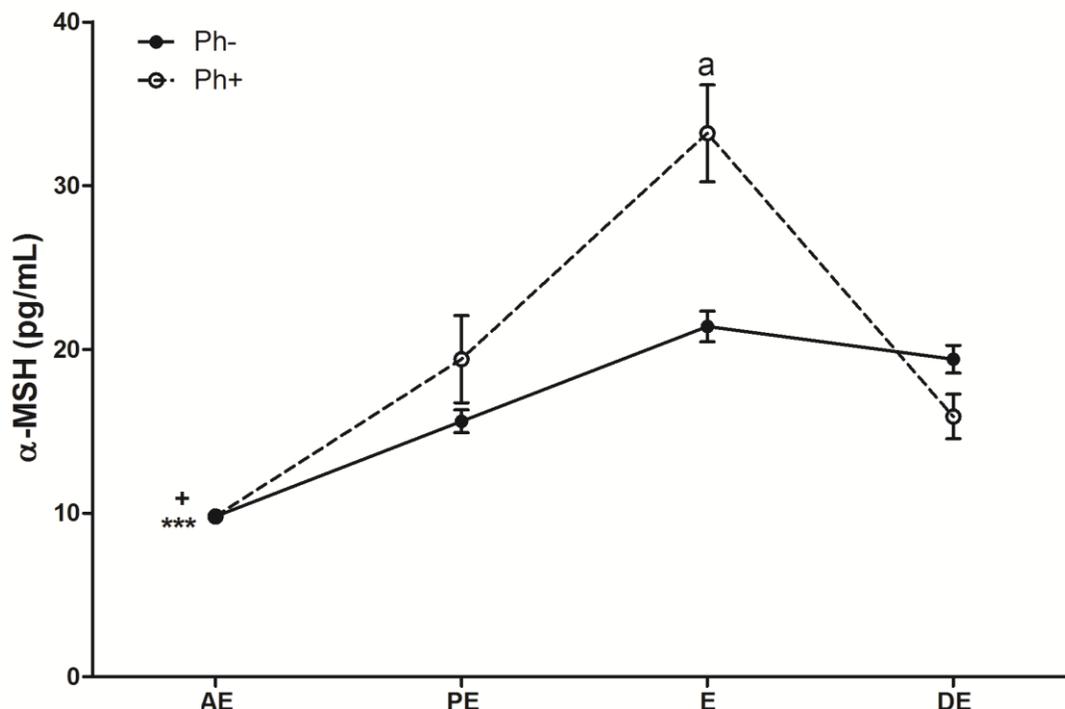


Fig. 24. Concentraciones de α -MSH durante el ciclo estral de la perra en el fotoperiodo negativo (Ph-) y positivo (Ph+).

*** Indica el efecto de la fase del ciclo sobre la concentración de α -MSH ($P < 0.0001$). La letra "a" indica diferencias significativas entre fotoperiodos en el E ($P < 0.0001$). El efecto del fotoperiodo se indica como "+" ($P = 0.012$).

Las concentraciones de cortisol se vieron afectadas por la fase del ciclo ($P < 0.0001$, F: 19.1), el fotoperiodo ($P < 0.0001$), y la interacción entre ambos factores ($P = 0.02$) (Fig. 4). En el Ph+, el cortisol aumentó linealmente, alcanzando sus máximas concentraciones en el E y manteniéndose en el DE. En el Ph-, el cortisol alcanzó sus máximas concentraciones en el E y disminuyó en el DE, permaneciendo más elevado que en el AE y en el PE (Fig.25). En el Ph- se observaron mayores concentraciones de cortisol que en el Ph+, tanto en el E ($P = 0.0001$) como en el DE ($P < 0.05$).

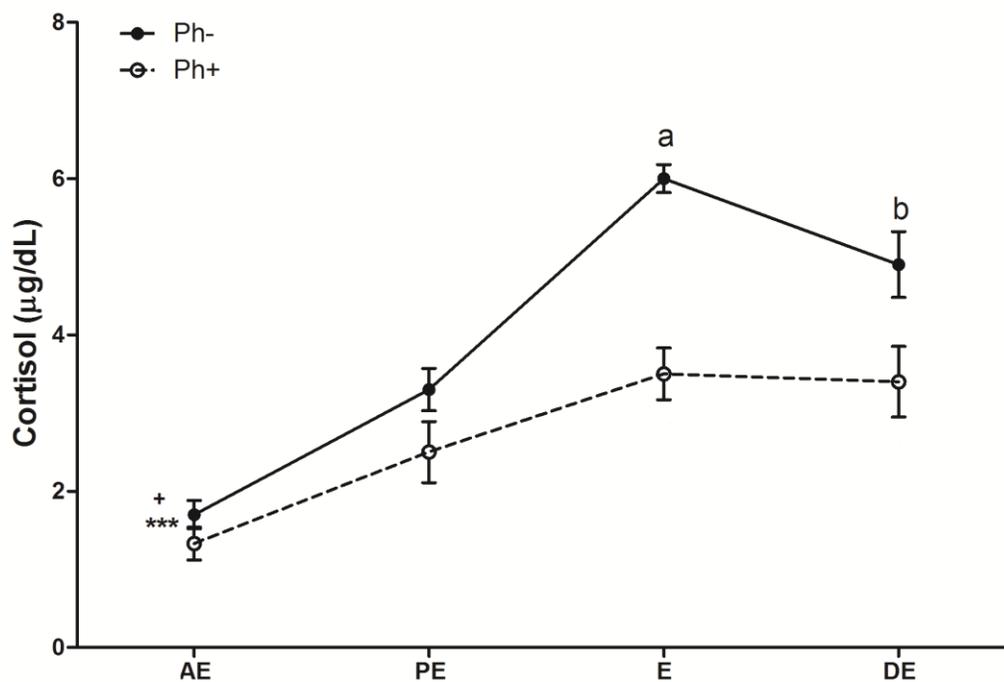


Fig. 25. Concentraciones de Cortisol durante el ciclo estral de la perra en el fotoperiodo negativo (Ph-) y positivo (Ph+).

*** Indica el efecto de la fase del ciclo sobre la concentración de cortisol ($P < 0.0001$). Las letras indican diferencias significativas entre fotoperiodos en el E ($P < 0.001$) y DE ($P < 0.05$). El efecto del fotoperiodo se indica como “+” ($P < 0.0001$).

c) Análisis de correlación

En el grupo de perras no castradas, durante el ciclo estral, el E2 correlacionó con la ACTH ($r=0.75$, $P<0.0001$), α -MSH ($r=0.49$, $P<0.0001$) y cortisol ($r=0.33$, $P<0.01$). Se encontró correlación entre la P4 y ACTH ($r=0.34$, $P<0.01$), α -MSH ($r=0.52$, $P<0.0001$) y cortisol ($r=0.5$, $P<0.0001$).

En “condiciones basales” (perras no castradas en AE, machos castrados o no, y hembras castradas) no se encontró correlación entre las hormonas estudiadas.

Experiencia 2: Análisis morfológico y de expresión de receptoresa) Hipótesis*a.1. Células inmunopositivas/células totales por campo (proporción de células corticotropas)*

Se observó inmunomarcación para ACTH a nivel del citoplasma, sin evidenciarse inmunomarcación en el control negativo (Fig. 26).

Se encontró un efecto del género ($p < 0.0001$), pero no del fotoperiodo sobre la proporción de células positivas por campo. No se encontró interacción entre los factores analizados (sexo y fotoperiodo). La cantidad de células positivas/totales por campo fue mayor en las hembras respecto a los machos en ambos fotoperiodos ($p < 0.01$) (Fig.26). En el fotoperiodo positivo, la proporción de células corticotropas por campo en las hembras fue de 0.32 ± 0.006 , mientras que en los machos fue de 0.22 ± 0.014 . En el fotoperiodo negativo, la proporción de células corticotropas por campo en las hembras fue de 0.34 ± 0.012 , mientras que en los machos fue de 0.21 ± 0.004 .

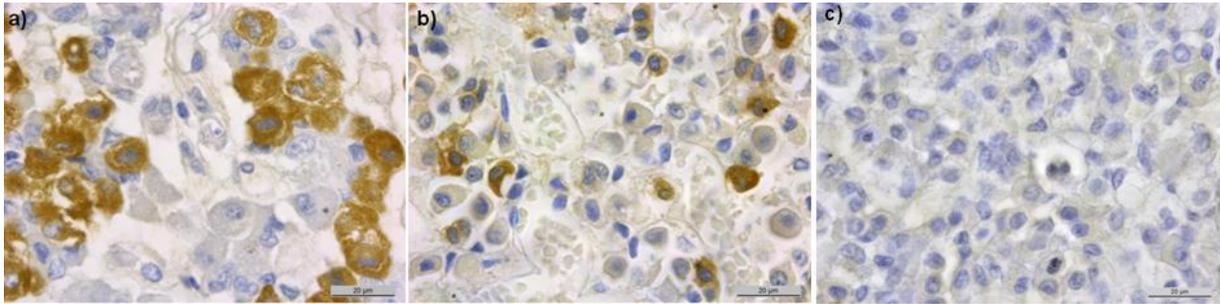


Fig. 26. Inmunomarcación para ACTH en la hipófisis del perro en una hembra (a) y un macho (b). Los citoplasmas marrones corresponden a las células corticotropas. En el control negativo (c) no se observa inmunomarcación. La barra de escala equivale a 20 μm .

a.2. Área celular

Se encontró un efecto del género ($p < 0.0001$), pero no del fotoperiodo sobre el área celular. No se encontró interacción entre los factores analizados. El área celular total fue mayor en hembras respecto a los machos en ambos fotoperiodos ($p < 0.001$) (Fig.27)

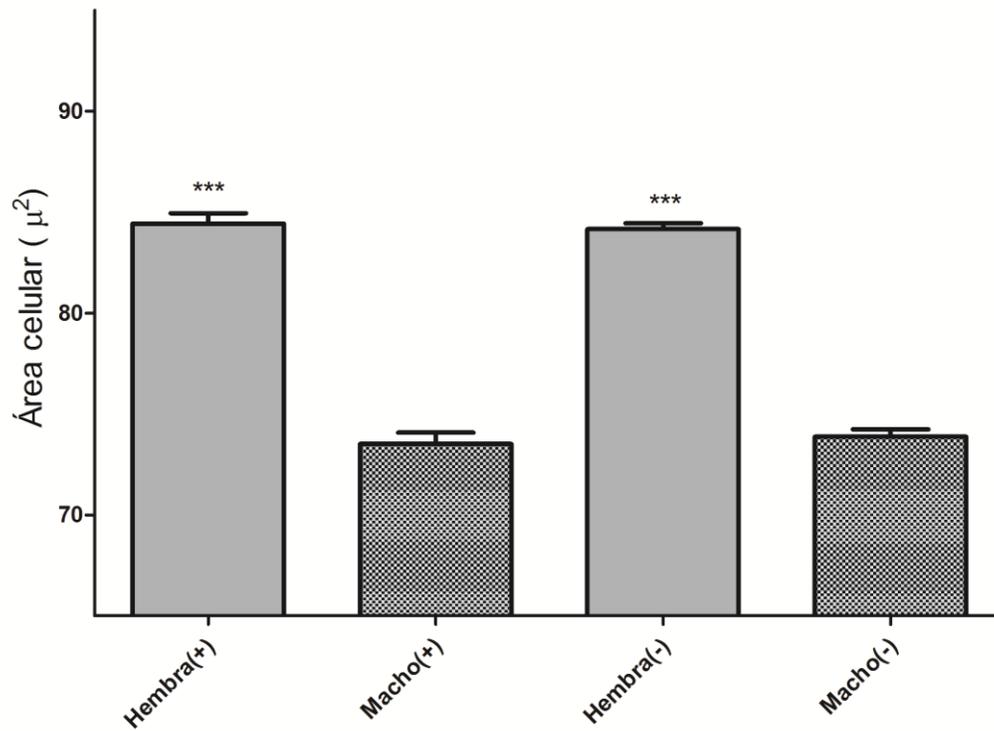


Fig. 27. Área celular de las células corticotropas en hembras y machos en los distintos fotoperiodos. *** Indica diferencias estadísticamente significativas entre géneros en cada fotoperiodo ($p < 0.001$).

Hembra (+): hembras en fotoperiodo positivo, Macho (+): machos en fotoperiodo positivo, Hembra(-): hembras en fotoperiodo negativo, Macho(-): machos en fotoperiodo negativo.

a.3. Área nuclear y citoplasmática

El área nuclear no presentó diferencias entre géneros o entre fotoperiodos; sin encontrarse tampoco interacción entre ambos factores. Al contrario, el área citoplasmática se vio afectada por el género ($p < 0.0001$), aunque no por el fotoperiodo; sin encontrarse interacción. El área citoplasmática fue mayor en hembras respecto a los machos ($p < 0.001$) en ambos fotoperiodos. En el Ph+, el área citoplasmática en las hembras fue de $68 \mu^2 \pm 0.5 \mu^2$, mientras que en los machos fue de $58 \mu^2 \pm 0.5 \mu^2$. En el Ph-, el área citoplasmática en las hembras fue de $68,7 \mu^2 \pm 0.3 \mu^2$, mientras que en los machos fue de $57 \mu^2 \pm 0.4 \mu^2$.

a.4. Densidad óptica

La densidad óptica de las células corticotropas se vio afectada por el género ($p < 0.0001$) y por el fotoperiodo ($p < 0.0001$); sin haber interacción entre ambos factores. La densidad óptica fue mayor en hembras respecto a los machos en ambos fotoperiodos ($p < 0.001$). Asimismo la densidad óptica de estas células fue mayor en el Ph- respecto al Ph+ en ambos sexos ($p < 0.001$) (Fig.28).

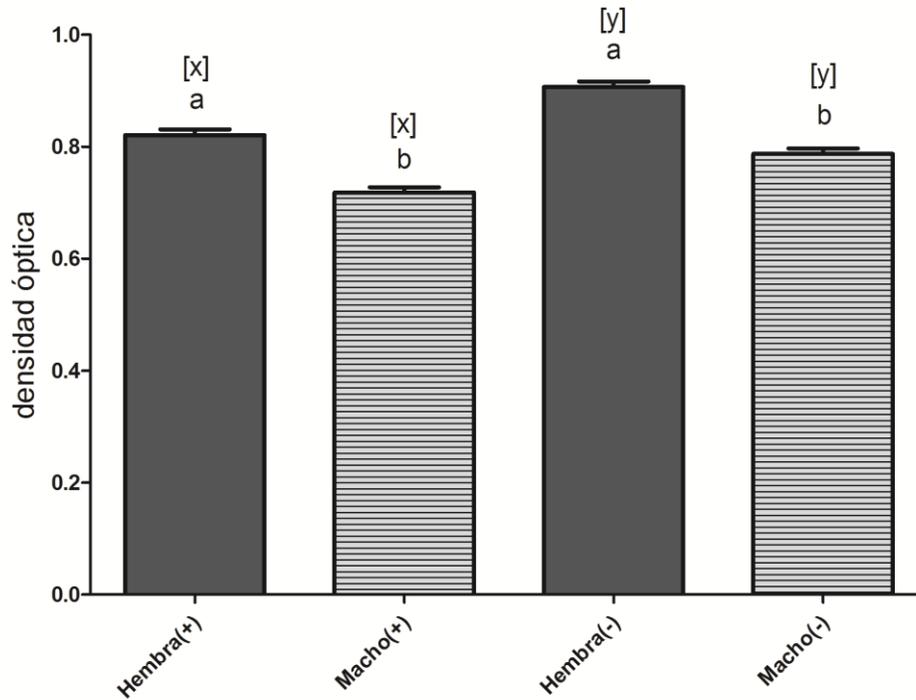


Fig. 28. Densidad óptica de las células corticotropas en hembras y machos en los distintos fotoperiodos.

a vs. b Indica diferencias estadísticamente significativas entre sexos dentro de cada fotoperiodo ($p < 0.001$).

[x] vs. [y] Indica diferencias estadísticamente significativas entre fotoperiodos para cada sexo ($p < 0.001$).

Hembra (+): hembras en fotoperiodo positivo, Macho (+): machos en fotoperiodo positivo, Hembra (-): hembras en fotoperiodo negativo, Macho(-): machos en fotoperiodo negativo.

b) Corteza adrenal

b.1. *Expresión del RE α*

El RE α fue identificado en la zona fascicular de todas las glándulas adrenales (Fig. 29), sin evidenciarse inmunomarcación en el control negativo (Fig. 30).

La proporción de células inmunomarcadas por campo se vio afectada por el sexo ($p < 0.0001$) y por el fotoperiodo ($p < 0.0001$), sin encontrarse interacción entre ambos factores.

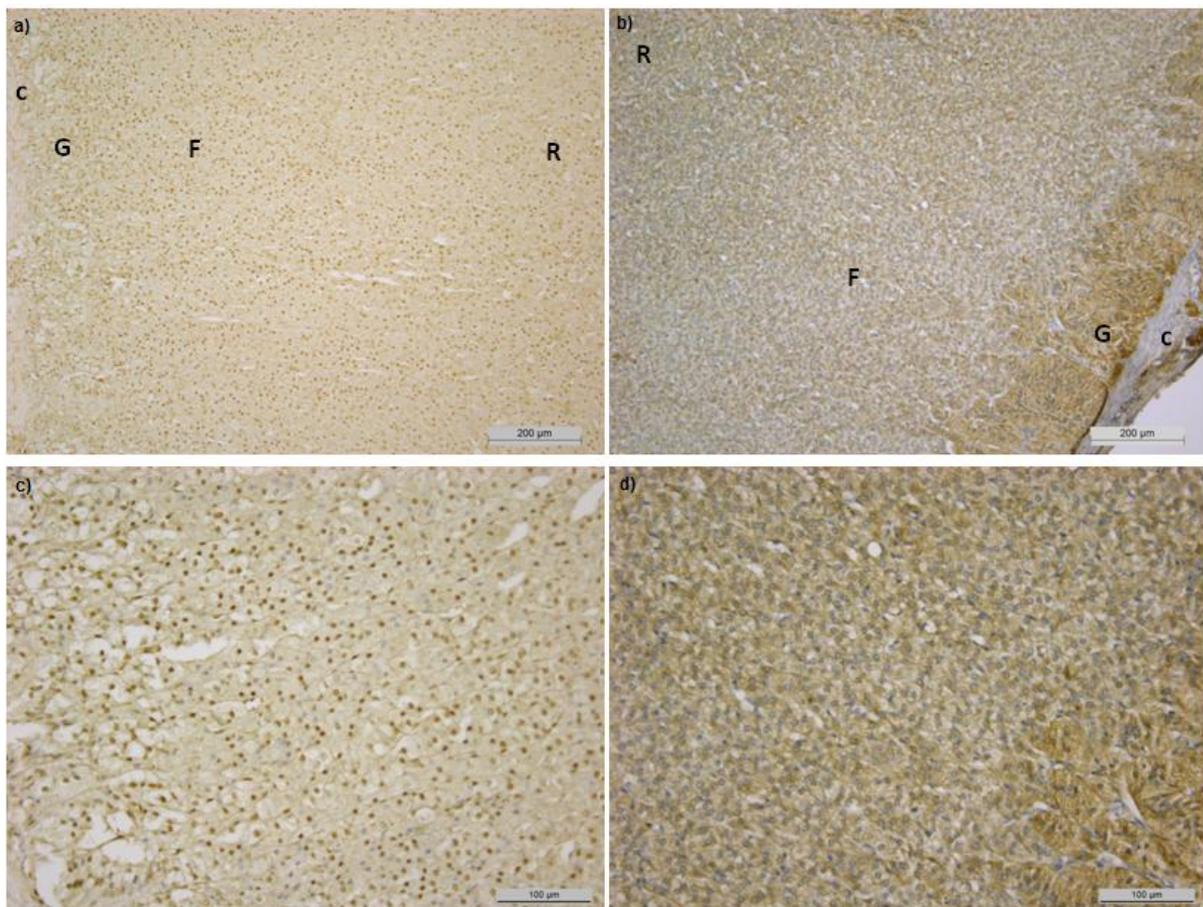


Fig. 29. Inmunomarcación para RE α (a, c) y MC2R (b, d) en la corteza adrenal del perro. Los núcleos marrones (a, c) y los citoplasmas marrones (b, d) indican marca positiva. La barra de escala indica 200 μm (a, b) o 100 μm (c, d). [C]: cápsula, [G]: zona glomerular, [F]: zona fascicular, [R]: zona reticular.

En ambos fotoperiodos las hembras presentaron mayor expresión de este receptor (mayor cantidad de células inmunomarcadas/células totales por campo) que los machos ($p < 0.001$) (Fig.30).

La proporción de células inmunomarcadas por campo fue mayor en el Ph- que en el Ph+ en ambos géneros ($p < 0.001$) (Tabla 3).

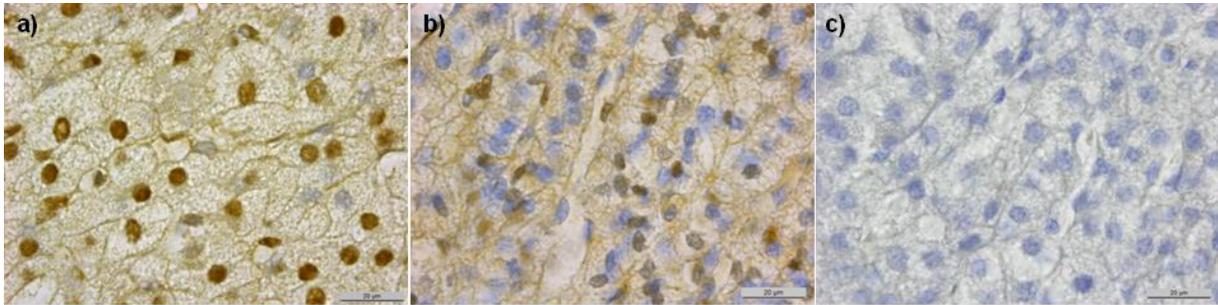


Fig. 30. Inmunomarcación para el RE α en la corteza adrenal del perro en una hembra (a) y un macho (b). Los núcleos marrones indican marca positiva, mientras que los núcleos azules son negativos (hematoxilina). En el control negativo (c) no se observa inmunomarcación. La barra de escala equivale a 20 μ m.

b.2. Expresión del MC2R

Se observó inmunomarcación para MC2R en todas las glándulas adrenales estudiadas (Fig. 29), sin observarse inmunomarcación en el control negativo (Fig. 31). La densidad óptica se vio afectada por el sexo ($p < 0.0001$) y por el fotoperiodo ($p < 0.0001$), sin encontrarse interacción entre ambos factores.

En ambos fotoperiodos las células de la zona fascicular presentaron mayor densidad óptica en hembras que en machos ($p < 0.001$) (Fig. 31). Asimismo, la densidad óptica fue mayor en el Ph- que en el Ph+ en ambos géneros ($p < 0.001$) (Tabla 3).

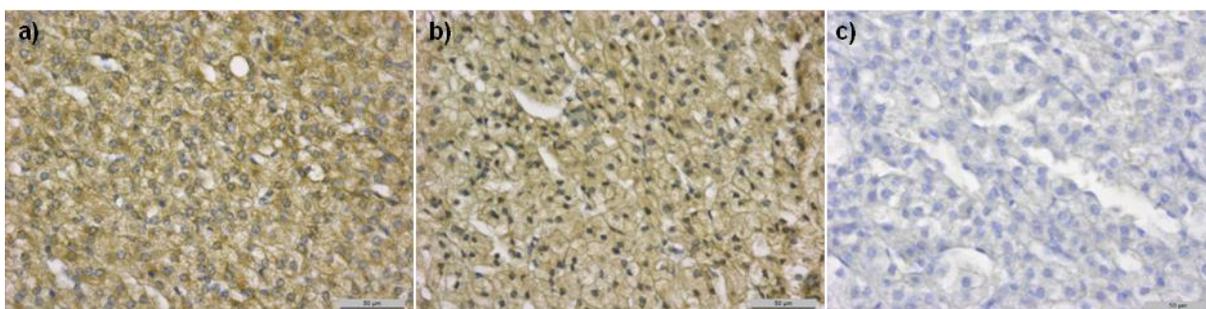


Fig. 31. Inmunomarcación para MC2R en la corteza adrenal del perro en una hembra (a) y un macho (b). Los citoplasmas marrones indican inmunomarcación positiva. Obsérvese la diferente intensidad de marcación entre ambas muestras. En el control negativo (c) no se observa inmunomarcación.

Tabla 3. Expresión de receptores en la zona fascicular adrenal del perro en hembras (H) y machos (M), en distintos fotoperiodos.

Receptor	Hembra		Macho		P-valor	
	Ph+	Ph-	Ph+	Ph-	Sexo	Ph
ER α (IP/T cel)	0.51 \pm 0.006	0.56 \pm 0.008	0.13 \pm 0.003	0.17 \pm 0.006	<0.001	<0.001
MC2R (D.O.)	0.63 \pm 0.007	0.75 \pm 0.01	0.54 \pm 0.008	0.63 \pm 0.02	<0.001	<0.001

En ambas estaciones las hembras presentan mayor expresión del RE α como del MC2R. Ambos receptores presentan mayor expresión en invierno.

IP/T cel.: células inmunopositivas/totales por campo

D.O.: densidad óptica

Ph+: Fotoperíodo positivo, Ph-: Fotoperíodo negativo

Los valores se expresan como promedio y SEM.

b.3. Expresión del Receptor de progesterona

No se encontró inmunomarcación para este receptor en glándula adrenal.

b.4. Doble inmunofluorescencia

Se encontró inmunomarcación para ACTH en el citoplasma de numerosas células, identificándose como células corticotropas.

Se identificó el RE α en el núcleo de las células corticotropas de ambos sexos. Las células corticotropas que expresaban dicho receptor fueron pocas, y se encontraron dispersas en la *pars distalis*. Asimismo, en la proximidad de las células corticotropas se observó gran cantidad de núcleos inmunomarcados para RE α , los cuales corresponderían a células no corticotropas ya que su citoplasma no inmunomarcó para ACTH (corresponderían a otro tipo celular) (Fig.32).

No se realizó un análisis cuantitativo de la expresión de este receptor en las células corticotropas dada su baja expresión.

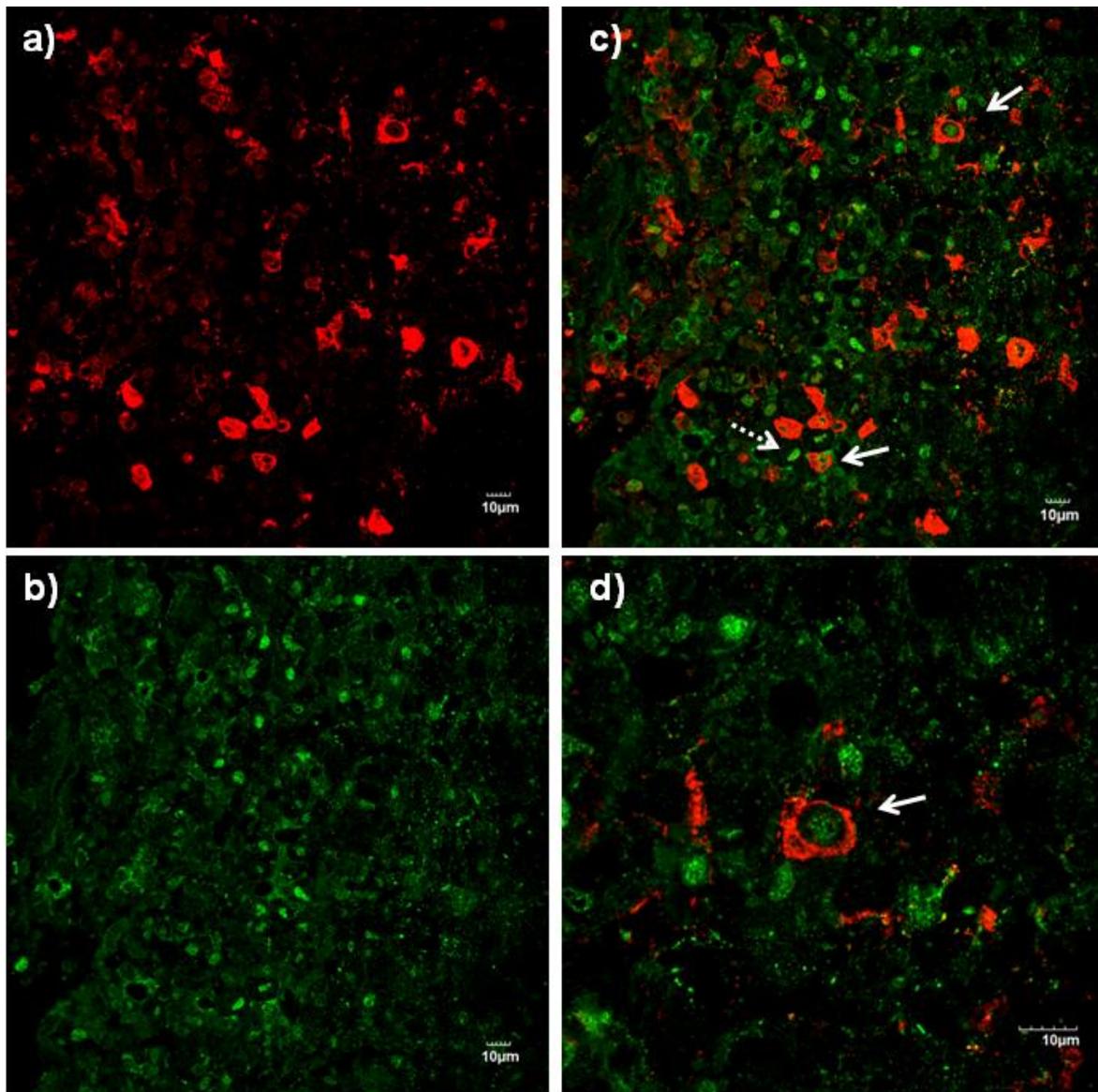


Fig. 32. Co-localización del RE α en las células corticotropas del perro, detectadas mediante doble inmunofluorescencia. Imágenes obtenidas en microscopio confocal. (a) Inmunomarcación de ACTH en las células corticotropas (rojo), (b) inmunomarcación de núcleos positivos a RE α (verde), (c) Co-localización de ambos antígenos (núcleos en verde y citoplasmas en rojo), (d) Mayor magnificación de una de las células que presenta co-localización de RE α y ACTH. La flecha continua indica co-localización, la flecha discontinua indica una célula no corticotropa con núcleo positivo a RE α . Barra de escala: 10 μ m.

VIII. DISCUSIÓN

En el presente estudio se pudo comprobar que existe dimorfismo sexual del eje HHA entre las perras cíclicas y los perros machos, aunque este dimorfismo no se presenta en condiciones basales, en un aspecto funcional. Sin embargo sí existe un dimorfismo sexual morfológico en condiciones basales. Las diferencias observadas estarían determinadas por el impacto de las hormonas sexuales sobre la hipófisis y la glándula adrenal. Particularmente, el E2 tendría un rol importante sobre estos tejidos, ya que tanto en las células corticotropas como en la zona fascicular adrenal se identificó al RE α , por primera vez en el perro. Mediante la unión a su receptor el E2 puede ejercer un efecto modulador sobre los mencionados tejidos. El rol de la P4 es más controversial, pudiendo tener un efecto distinto de acuerdo a su concentración (Carey et al., 1995). Además, en este estudio no se encontró expresión del RP en la glándula adrenal.

Diversos estudios han establecido una asociación entre las características morfológicas de las células corticotropas y su función (Sasaki et al., 1990; Childs, 1992); observándose, por ejemplo, que una mayor área de dichas células se acompaña de aumentos en la ACTH plasmática (Westlund et al., 1985). Asimismo, Rhodes et al (1999) proponen que las diferencias bioquímicas o funcionales del eje HHA en animales de distinto sexo serían consecuencia de diferencias morfológicas del mismo. De este modo, las características morfológicas de las células corticotropas de las hembras observadas en el presente estudio (distintas a las del macho), o el hecho de tener una mayor expresión del MC2R o del RE α , podrían favorecer una mayor actividad de dicho eje en este sexo. Si bien estas diferencias funcionales no se observaron en condiciones basales en este estudio, sí se pusieron de manifiesto durante el ciclo estral; al igual que al desafiar al eje mediante el uso de ACTH o dexametasona, en base a lo referido por Pessina et al. (2009).

En resumen, el estradiol, mediante la unión a su receptor en las glándulas estudiadas, podría determinar no sólo las diferencias histológicas observadas, sino que a su vez, podría estimular la síntesis y/o secreción de ACTH y cortisol (ya sea en forma directa o indirecta). En consecuencia, se presentarían las diferencias funcionales entre géneros (que se ponen de manifiesto en condiciones de mayor actividad del eje gonadal o frente a un estímulo del eje HHA, como se mencionara previamente).

Asimismo, en este estudio se observó que el fotoperiodo también influye sobre las características morfológicas evaluadas, al igual que en los perfiles hormonales de las perras cíclicas; mientras que sólo afecta al cortisol en condiciones basales. Al igual que lo expuesto respecto al dimorfismo sexual, habría una relación entre las características morfológicas y los perfiles hormonales observados en cada fotoperiodo.

A continuación se realizará un análisis más detallado de los resultados hallados en este estudio.

Hormonas del eje HHA y esteroides sexuales en “condiciones basales”

En el presente estudio se observó que el sexo y el estatus gonadal no afectan las concentraciones de ACTH, α -MSH y cortisol, en “condiciones basales”. El estradiol se encontró más elevado en las perras en anestro respecto al resto de los grupos en “condiciones basales”, sin embargo este grupo no presentó diferencias en las concentraciones de las hormonas del eje HHA, como sí se observa durante el ciclo estral (ver más adelante). La progesterona no presentó diferencias entre estos grupos, ni tampoco correlacionó con las hormonas del eje HHA, al igual que el estradiol. Estos hallazgos sugerirían que en condiciones basales las hormonas sexuales no afectarían la

producción hormonal del mencionado eje. Por el contrario, y en base a lo reportado por Pessina et al. (2009), al estimular el eje HHA, las diferencias entre géneros se ponen en evidencia.

En este estudio no se observaron diferencias en las concentraciones de ACTH, α -MSH y cortisol entre los perros machos (que presentaron mayores concentraciones de testosterona) y el resto de los grupos; así como tampoco la testosterona correlacionó con las mencionadas hormonas. Por el contrario, se ha observado en diversas especies que las concentraciones de glucocorticoides y de ACTH tanto basales como inducidas por el stress son menores en los machos (Handa et al., 1994a; Rubinow et al., 2005; Williamson y Viau, 2008). En ratas macho, las concentraciones de dichas hormonas aumentan con la castración, y disminuyen cuando se los suplementa con testosterona (Handa et al., 1994b; Viau y Meaney, 1996). Esta evidencia sugiere que la testosterona tendría un rol inhibitorio sobre el eje adrenal (McCormick et al., 2002, Viau et al., 2005; Romeo 2010). En nuestro estudio, el estatus gonadal no influyó sobre las concentraciones de las hormonas del eje HHA, ya que tanto los perros machos castrados como aquellos sin castrar presentaron un perfil hormonal similar. Sin embargo, considerando lo observado en otras especies, sería interesante evaluar si existen diferencias al someter a los animales a un estímulo estresor; o en condiciones que no sean “basales”, como durante la actividad reproductiva, o en perros con comportamiento agresivo.

Hormonas del eje HHA y esteroides sexuales durante el ciclo estral

Al contrario de lo que sucede en “condiciones basales”, en las perras no castradas las hormonas del eje HHA se vieron afectadas por los cambios hormonales producidos durante las fases del ciclo estral. El perfil de las hormonas sexuales durante este ciclo fue

similar al descrito para la especie (Concannon, 2011). El estradiol aumentó su concentración durante el proestro, hasta alcanzar un pico al final de esta fase, para luego disminuir durante el estro y diestro. La progesterona, en cambio, aumentó progresivamente desde el final del proestro hasta alcanzar los máximos valores en el diestro, y luego descender. La ACTH, la α -MSH y el cortisol modificaron sus concentraciones durante este ciclo, siguiendo a las variaciones del E2 y P4. Asimismo, estas hormonas se encontraron correlacionadas, sugiriendo que la actividad del eje HHA variaría a lo largo del ciclo estral en relación a las variaciones de los esteroides gonadales.

ACTH, E2 y P4

Teniendo en cuenta el perfil hormonal observado para la ACTH, y considerando el hecho de que el RE α se expresa en las células corticotropas (ver “Análisis morfológico en función del sexo”), es factible que los cambios en la concentración de E2 durante el ciclo estral, y particularmente en el PE (al alcanzar su máxima concentración), tengan un impacto sobre el eje HHA, pudiendo estimular la síntesis y/o secreción de ACTH a través de distintos mecanismos moleculares (Hall et al., 2001; Altemus et al., 2001; Labeur et al., 2010). Asimismo, la disminución en la concentración de E2 luego del PE, se acompaña de una disminución en la ACTH, sugiriendo que el efecto estimulador del E2 sobre el área corticotropa comenzaría a disminuir (sumado al posible efecto inhibitorio de la P4 en sus máximas concentraciones) (ver más adelante). En forma similar a lo observado en el perro, se ha referido que en ratas la concentración de ACTH aumenta en el proestro y del mismo modo lo hace en la fase folicular del ciclo menstrual de la mujer (coincidiendo ambos momentos con altas concentraciones de E2) (Viau y Meaney, 1991). Carey et al. (1995) no solo observaron variaciones en la ACTH plasmática durante el ciclo

estral de la rata en condiciones basales (presentándose los máximos niveles en proestro); sino que reportaron que estas variaciones se producen a lo largo del ciclo también en respuesta al stress. Los cambios observados en este estudio en la concentración plasmática de ACTH en el perro, podrían estar relacionados a la influencia del estradiol sobre el núcleo paraventricular, tal como lo descrito para otras especies (Viau y Meaney 1991; Vamvakopoulos y Chrousos, 1993; Roy et al., 1999; Shapiro et al., 2000; Ogura et al., 2008; Panagiotakopoulos y Neigh, 2014). Además de este efecto sobre el núcleo paraventricular, se han propuesto diversos mecanismos por los cuales el estradiol podría afectar la síntesis y secreción de ACTH (Handa y Weiser, 2014), entre los que se encuentran: la estimulación de la síntesis de POMC, la inhibición del feedback de los glucocorticoides a nivel del hipocampo, hipotálamo e hipófisis, y la modulación de otras vías reguladoras del eje HHA (Turner, 1990; Viau y Meaney 1991; Burgess y Handa, 1993; Ochedalski et al., 2007; Rossi et al., 2010; Panagiotakopoulos y Neigh, 2014). Los mecanismos mencionados quedan pendientes de estudio en el perro.

Existen pocos reportes acerca de la influencia de la progesterona sobre la ACTH, siendo muchos de ellos contradictorios. Se ha propuesto que la P4 inhibiría el aumento de la CRH determinado por el E2 (Roy et al., 1999) o que inhibiría la secreción de ACTH (Keller-Wood, 1998). Sin embargo, estudios realizados en cultivos celulares revelaron que la P4 estimula la síntesis de POMC (Yang y Lim, 1995).

En el presente estudio se encontró correlación entre la P4 y la ACTH, observándose que en las primeras fases del ciclo ambas hormonas aumentan en conjunto, mientras que en el diestro, cuando la P4 alcanza sus máximas concentraciones, la ACTH disminuye. Estos resultados sugerirían que la P4 podría tener un efecto diferente sobre la ACTH según su concentración fisiológica. De hecho, se ha observado en ratas que el incremento

en la P4 inhibe el efecto estimulante del E2 sobre la ACTH, dado que las concentraciones de ACTH disminuyen con el aumento en la concentración de P4 en el estro y diestro (Viau y Meaney 1991). Al contrario, se ha observado que el tratamiento con progesterona a bajas dosis aumenta el cortisol plasmático, sugiriéndose que este efecto se produciría por la acción de esta hormona a nivel central (Chan et al., 2014). En base a observaciones similares, Carey et al. (1995) propusieron que la P4 podría tener un rol dual sobre el eje HHA: revirtiendo los efectos del estradiol sobre el receptor MR (el estradiol disminuye la capacidad de unión del cortisol a este receptor) u ocupando estos receptores e impidiendo que el cortisol realice el feedback negativo. Así, la P4 podría tanto estimular como inhibir al eje HHA.

Teniendo en cuenta estos estudios y lo observado en nuestro trabajo, la P4 podría estimular la síntesis de ACTH al inicio del ciclo, e inhibirla al alcanzar mayores concentraciones en el diestro. La falta del estímulo del E2 junto con el incremento de la P4, podrían determinar su descenso en esta fase.

En el perro, Beijerink et al. (2007) no observaron cambios en la concentración de ACTH plasmática en perras tratadas con medroxiprogesterona acetato; aunque se encontró una menor respuesta a la estimulación con CRH luego de que la droga fuera administrada por tiempo prolongado (11 meses de tratamiento). Las diferencias con este estudio podrían deberse a que el efecto de la P4 nativa no sería el mismo que el de la sintética. Del mismo modo, estas diferencias podrían explicarse por una distinta concentración entre la droga administrada y la P4 nativa, al igual que por la existencia de un ritmo secretor en esta última (que no está presente en la medroxiprogesterona administrada).

En resumen, las variaciones en la concentración de ACTH a lo largo del ciclo de la perra observadas en nuestro estudio podrían deberse tanto al impacto del estradiol, como al de la progesterona, o a la interacción entre ambas hormonas sexuales.

α -MSH, E2 y P4

La α -MSH presentó un perfil similar al de la ACTH, y también se encontró correlacionada con ambas hormonas sexuales estudiadas. Sin embargo, la α -MSH alcanzó su máxima concentración en el E y luego comenzó a disminuir en el DE. No se encontraron reportes acerca del posible impacto del E2 o de la P4 sobre la síntesis o secreción de la α -MSH.

Considerando que el E2 estimularía la síntesis de POMC (Ochedalski et al., 2007) y teniendo en cuenta que la ACTH y α -MSH son secretadas en forma equimolar (Gallelli et al., 2010), sería posible que el efecto del E2 sea el mismo para ambas hormonas. Los diferentes perfiles observados a partir del PE quedan pendientes de ser estudiados. Una posible hipótesis sería que el E2 podría ejercer su efecto mediante distintos mecanismos de acción acorde al tipo celular (células corticotropas o melanotropas) (Tanaka, 2003; Olah et al., 2009). No es claro el rol que tendría la P4 sobre la α -MSH; aunque en forma similar a lo propuesto para el E2, su efecto sobre la α -MSH podría ser el mismo que para la ACTH. En forma similar a lo discutido previamente, Beijerink et al (2007) no observaron variaciones en las concentraciones de α -MSH en perras a las que se les administró medroxiprogesterona acetato.

Cortisol, E2 y P4

El cortisol también presentó variaciones a lo largo del ciclo; correlacionando con ambas hormonas sexuales. El incremento del cortisol observado en el estro podría ser resultado del impacto tanto de la ACTH como del estradiol. El aumento de estas hormonas en el PE conduciría al aumento del cortisol plasmático observado en la siguiente fase del ciclo. En el DE, el cortisol comienza a disminuir, en forma similar a la ACTH y el E2 (y en coincidencia con el aumento de la P4). Estos resultados coinciden con lo observado por Atkinson y Waddell (1997), quienes reportaron variaciones en las concentraciones plasmáticas de corticosterona durante el ciclo estral de la rata. Resultados similares fueron reportados por Viau y Meaney (1991). Asimismo, Carey et al. (1995) encontraron que las variaciones en la concentración plasmática de corticosterona durante el ciclo estral se presentan tanto en condiciones basales como frente a un estímulo estresor. En todos los casos, las mayores concentraciones de corticosterona se encontraron en el proestro, sugiriendo un impacto del estradiol sobre la corteza adrenal. De hecho, se reportó que en mujeres en post-menopausia (Fonseca et al., 2001) y en ratas ovariectomizadas (Lo et al., 2000) el cortisol y la corticosterona, respectivamente, se incrementan luego de la administración de estradiol sintético (estradiol conjugado y benzoato de estradiol, respectivamente). Del mismo modo, en ovinos hembras castradas y suplementadas con benzoato de estradiol se encontró una mayor respuesta a la estimulación con ACTH que en aquellas hembras que no habían sido suplementadas (van Lier et al., 2014). Asimismo, se ha propuesto que el estradiol estimularía la esteroideogénesis adrenal (Nowak et al., 1995).

Al igual que lo reportado en estas especies, el estradiol podría tener un efecto regulador sobre la glándula adrenal del perro. Esta hipótesis se encuentra reforzada por el

hecho de que en la zona fascicular se expresa el RE α (ver “*Análisis morfológico en función del sexo de los perros*”), lo cual permite al estradiol ejercer un efecto sobre este tejido. Así las variaciones del estradiol a lo largo del ciclo estral influirían en los cambios observados en el cortisol.

El rol de la P4 sobre la corteza adrenal, al igual que lo referido para la ACTH, es controversial y no se encuentra completamente estudiado (Keller-Wood y Wood, 2001). En un estudio realizado en equinos no se encontraron diferencias en la concentración de cortisol en yeguas con distintos valores de progesteronemia (Aurich et al., 2015). En cambio, Chan et al. (2014) observaron que en ratas gonadectomizadas la progesterona a bajas dosis genera un aumento significativo en los niveles de cortisol, que no se observa a altas dosis (respecto a los controles); sugiriendo que el efecto de la progesterona sobre el cortisol sería distinto de acuerdo a la dosis utilizada. Asimismo, estos autores evidenciaron que la combinación de progesterona con estradiol genera menores aumentos en la concentración de cortisol plasmático que el estradiol como monodroga. Estos resultados guardan relación con el modelo del rol dual de la P4 sobre la ACTH, la cual regularía a esta última disminuyendo o aumentando su síntesis (Carey et al., 1995). Teniendo en cuenta estos resultados, y el hecho de que en nuestro estudio no se identificó al RP en la glándula adrenal del perro, podría ser que la progesterona no regule la producción de cortisol en forma directa (en la glándula adrenal) sino que lo haga a nivel central. De este modo, las variaciones en el cortisol observadas en las perras estudiadas, se deberían al efecto y la interacción del E2, la P4 y la ACTH.

Hormonas del eje HHA y esteroides sexuales en función del fotoperíodo

En “condiciones basales”, solo el cortisol presentó diferencias entre fotoperíodos; observándose mayores concentraciones en el Ph- respecto al Ph+. Por el contrario, durante el ciclo estral, excepto por la P4, todas las hormonas presentaron variaciones entre fotoperíodos. Estos hallazgos sugerirían que la interacción entre el fotoperíodo y las variaciones hormonales durante el ciclo estral juega un rol importante en las diferencias observadas en las hormonas del eje HHA en relación a la época del año.

En las perras no castradas, el E2, la ACTH y el cortisol se encontraron más elevados en el Ph-, mientras que la α -MSH presentó mayores concentraciones en el Ph+.

No se encontraron reportes acerca de las variaciones estacionales de las hormonas sexuales o del eje HHA en el perro; sin embargo existen estudios realizados en otras especies que describen diferencias entre distintas épocas del año (Romero et al., 2002; Cordero et al., 2012). La oveja de Soay presenta variaciones en la concentración plasmática de ACTH a lo largo del año, observándose las máximas concentraciones en verano, con disminuciones en invierno y primavera (Ssewanyana et al., 1990). Al contrario, en caballos la ACTH se encuentra más elevada en el otoño (Donaldson et al., 2005; Cordero et al., 2012). En forma diferente a estas especies, en el perro observamos que esta hormona se encuentra elevada en el Ph- (final del otoño-inicio del invierno) respecto al Ph+ (final de la primavera-inicio del verano). Evidentemente las variaciones de la ACTH a lo largo del año son distintas acorde a la especie. La razón por la cual se producen estas variaciones no está del todo clara, aunque algunos autores sugieren que podría deberse a cambios climáticos acorde a la época del año (Schreiber et al., 2012; Díez de Castro et al., 2014). Asimismo, se ha referido que se producen cambios histológicos en el área corticotropa a lo largo del año (Filippa y Mohamed, 2006) (ver

“Análisis morfológico según el fotoperiodo”); pudiendo este evento afectar la funcionalidad del eje HHA y determinar las diferencias funcionales observadas. Además, estas variaciones estacionales podría asociarse a cambios en el metabolismo y la función reproductiva ocurridos en distintas épocas del año (Cordero et al., 2012). De hecho, Romero (2002) ha reportado cambios en el cortisol en distintas especies en relación a procesos fisiológicos como el cambio de pelo o plumas, migración, y reproducción. Podría ser que estos mismos factores afecten a la síntesis de ACTH, asociándose las variaciones en el cortisol a los cambios en la ACTH. Los mecanismos propuestos para las distintas especies podrían también estar involucrados en las diferencias por fotoperiodo observadas en el perro, quedando pendientes de estudio.

La α -MSH, al contrario de lo observado para la ACTH, se encontró más elevada en el Ph+ respecto al Ph-. No queda en claro por qué estas hormonas presentan las mayores concentraciones en diferentes fotoperiodos, aunque podría relacionarse con la activación de distintos mecanismos de regulación acorde a la mayor necesidad de una u otra hormona. En cambio, en caballos se ha observado que la α -MSH presenta mayores concentraciones en el otoño respecto a la primavera, invierno e inicio del verano (McFarlane et al., 2004; Cordero et al., 2012). Variaciones en la concentración de α -MSH de acuerdo al fotoperiodo también se han observado en humanos, comadreja, hámsters, y ovejas (Norman et al., 1972; Logan y Weatherhead, 1980; Altmeyer et al., 1986; Lincoln and Baker, 1995). En hámster y comadreja, se produce un aumento en la α -MSH en el verano, al igual que lo observado en humanos (Norman et al., 1972; Logan y Weatherhead, 1980; Altmeyer et al., 1986). En ovejas, en cambio, se produce un incremento de la α -MSH en el otoño (Lincoln et al., 2001). Estos hallazgos, sugieren que la α -MSH presenta variaciones estacionales diferentes según la especie (al igual que lo

observado para la ACTH). En las mencionadas especies se ha sugerido que estas variaciones podrían estar asociadas a distintos procesos fisiológicos (McFarlane et al., 2004; Schuhler y Ebling, 2005; Cordero et al., 2012). Del mismo modo, el aumento de la α -MSH en el Ph+ en el perro podría responder a algún tipo de adaptación fisiológica.

El cortisol, como se mencionara previamente, fue la única hormona que presentó diferencias entre fotoperiodos tanto en condiciones basales como durante el ciclo estral; siendo su concentración mayor en el Ph-. En forma similar, se reportaron variaciones estacionales de esta hormona en equinos, siendo su concentración mayor en otoño que en primavera (Cordero et al., 2012). Asimismo, se han observado variaciones estacionales en la concentración de cortisol en humanos, roedores, monos y cabras (Boswell et al. 1994; Schiml et al. 1996; Walker et al. 1997; Alila-Johansson et al., 2003). En gorriones, la corticosterona aumenta en primavera-verano, coincidiendo con los procesos de migración, muda y reproducción (Romero, 2002) En leones marinos se encontró un aumento en la concentración de corticosterona tanto en verano como en otoño, coincidiendo con la etapa reproductiva o la época de muda de pelaje (Myers et al, 2010). Nuevamente se evidencia que no existe un patrón común entre especies en cuanto a las variaciones hormonales estacionales. Asimismo, en los mencionados estudios se sugiere, tal como lo referido para ACTH y α -MSH, que estas variaciones estacionales del cortisol guardarían relación con procesos fisiológicos relativos a cada especie. El impacto ambiental, como por ejemplo la variación en las horas luz diarias, también tendría un efecto sobre el cortisol, pudiendo determinar las variaciones estacionales observadas (Ottenweller et al., 1987; Ribes, 2000; Filippa y Mohamed, 2006). Estos factores también podrían influir en las diferencias entre fotoperiodos observadas en este estudio en el perro. Asimismo es importante considerar que tanto el E2, como la ACTH y el cortisol

presentaron mayores concentraciones en el Ph-, sugiriendo que habría una interacción entre esta hormona sexual, las hormonas del eje HHA y el fotoperiodo.

El hecho de que en los perros estudiados en condiciones basales sólo se observen variaciones estacionales en la concentración de cortisol podría asociarse a la regulación de la glándula adrenal independiente de la hipófisis (Ehrhart-Bornstein et al., 1998; Bornstein et al., 2008; Dickmeis y Foulkes, 2011).

Análisis morfológico en función del sexo de los perros

En el presente estudio se pudo observar que existe dimorfismo sexual, tanto en las características morfológicas de las células corticotropas como en la expresión de los receptores evaluados en la zona fascicular de la glándula adrenal del perro.

En ambos fotoperiodos se evidenció que las hembras presentan mayor proporción de células corticotropas, mayor tamaño celular (a expensas del citoplasma) y mayor densidad óptica; por lo que habría una mayor expresión de ACTH en las células corticotropas en este género. Estas diferencias sugieren cierto impacto de las hormonas sexuales sobre dichas células; teniendo las hembras un eje HHA más sensible ante el stress (Handa et al., 1994a; Goel et al., 2014). Filippa y Mohamed (2006) han observado que el número de células inmunomarcadas para ACTH en vizcachas, es mayor en hembras; mientras que en visones se ha visto un incremento notable tanto en el número como en el tamaño de estas células en el desarrollo de la pubertad en las hembras, y no en los machos (Vidal et al, 1995). Las diferencias entre géneros y la coincidencia entre la pubertad y el desarrollo corticotropo son sugerentes del impacto de los esteroides sexuales sobre dichas células. De hecho, se observó que en ratas hembra castradas, la cantidad de células corticotropas disminuye; mientras que la suplementación con estradiol

lleva a su aumento (Malendowicz et al., 1987). Distintos autores han reportado que el estradiol tendría un rol estimulador sobre el eje HHA, a nivel de hipófisis, hipotálamo y/o hipocampo mediante distintos mecanismos (Turner, 1990; Panagiotakopoulos y Neigh, 2014; Handa y Weiser, 2014) (ver sección "*Hormonas del eje HHA y esteroides sexuales en' condiciones basales' y durante el ciclo estro'*"). Para poder ejercer un efecto, el estradiol debe unirse a su receptor. En este estudio hemos encontrado que existe expresión del RE α en el núcleo de las células corticotropas del perro; hallazgo no reportado hasta el momento en la especie. El estradiol se uniría de este modo a su receptor estimulando vías genómicas (Welboren et al., 2009; Handa y Weiser, 2014). Además se evidenció la presencia del RE α en células adyacentes a las corticotropas. El estradiol podría actuar en estas células conduciendo a las mismas a ejercer un efecto parácrino sobre las corticotropas (Deneff, 2008); hipótesis pendiente de ser estudiada. Asimismo, estudios realizados en ratas demostraron la presencia del RE α en neuronas GABAérgicas presentes en zonas cercanas al núcleo paraventricular (Handa y Weiser, 2009). Estos autores propusieron que, mediante la acción en estas neuronas, el estradiol modularía el efecto de los glucocorticoides a nivel central. Además se ha observado que el RE α se expresa en otras zonas hipotalámicas y en distintas regiones del cerebro, pudiendo regular mediante sinapsis intermediarias el funcionamiento del área corticotropa (Handa et al., 1994a; Mitra et al., 2003). En forma similar a nuestro estudio, estos receptores también fueron identificados en las células corticotropas y melanotropas de la rata, al igual que en las células folículoestrelladas (Mitchner et al., 1998). Por lo tanto, el estradiol podría tener una acción directa sobre estas células glandulares o actuar indirectamente a través de las mencionadas células de sostén.

Además de ser identificado en la hipófisis, el RE α también fue evidenciado en las células de la zona fascicular adrenal del perro; siendo la primera vez que se lo reporta en

esta especie. La existencia de este receptor en la corteza adrenal, propone otro sitio de acción para el estradiol sobre el eje HHA. El RE α también ha sido observado en la glándula adrenal en otras especies, proponiéndose que mediante su unión al mismo, el estradiol podría estimular la esteroideogénesis adrenal (Hirst et al., 1992; van Lier et al., 2003b). De hecho, Nowak et al. (1995) reportaron que el estradiol aumentaría el pasaje de colesterol a pregnenolona en la zona fascicular adrenal; incrementando de este modo la síntesis de glucocorticoides. Además, su expresión en la corteza adrenal del perro fue mayor en hembras que en machos; lo cual haría que dicha glándula sea más sensible a los posibles efectos del estradiol en las hembras, como ha sido sugerido para ovinos (van Lier et al., 2014).

Del mismo modo, en los perros estudiados, las hembras expresaron el MC2R en mayor medida que los machos; lo cual haría a la glándula más sensible a la estimulación de la ACTH (Lo et al., 2000; Figueiredo et al., 2007). Asimismo sería posible que el estradiol regule la expresión del MC2R, ya que en estudios realizados en ratas castradas se ha observado que la suplementación con estradiol aumenta la producción de AMPc, el cual se sintetiza a partir de la unión de la ACTH a su receptor (Figueiredo et al., 2007).

En el presente estudio no se encontró expresión del RP en la glándula adrenal del perro, en coincidencia con lo reportado en monos (Hirst et al., 1992). Sin embargo, en ovinos se identificó la presencia de dicho receptor mediante la implementación de otras técnicas (hibridación en solución) (van Lier et al, 2003b). Sería interesante aplicar distintas técnicas para identificar si el RP se expresa en la glándula adrenal del perro, o si a diferencia de los ovinos, no se encuentra presente en este tejido.

Análisis morfológico en función del fotoperiodo

En el presente trabajo no se evidenciaron diferencias respecto a la proporción de células corticotropas o a su área total, nuclear o citoplasmática de acuerdo al fotoperiodo; pero sí se encontraron diferencias respecto a la densidad óptica de las mismas. Este parámetro se encontró aumentado en el Ph- en ambos sexos; lo cual se relacionaría con una mayor expresión de ACTH en las células corticotropas en dicho fotoperiodo. Esto permitiría que en un periodo de condiciones climáticas menos favorables o de cambios metabólicos (Donaldson et al., 2005; Cordero et al., 2012), el eje HHA tenga una reserva de ACTH que pueda ser liberada y estimule rápidamente la secreción de glucocorticoides.

Las características diferenciales de las células corticotropas entre estaciones también se han observado en vizcachas (Filippa y Mohamed, 2006). En esta especie se observó que el diámetro celular y la proporción de células corticotropas presentan variaciones estacionales; encontrándose valores máximos en el verano, los cuales disminuyen en el invierno y comienzan a elevarse nuevamente en la primavera. Del mismo modo, se evidenció que en sapos las células corticotropas aumentan su tamaño y la cantidad de gránulos secretores citoplasmáticos en primavera; disminuyendo estos parámetros en el otoño y comenzando a incrementarse nuevamente hacia el invierno (Pramoda y Saidapur, 1991). Estos cambios morfológicos que ocurren a lo largo del año, sugerirían un comportamiento cíclico en la estructura y funcionalidad de las mencionadas células; posiblemente acorde a las demandas fisiológicas de cada especie según la época del año (Childs, 1992). Estos procesos podrían ser mediados por mecanismos en los que interviene la melatonina, ya que se ha observado que la administración de esta hormona en vizcachas y en hamsters, reproduce los efectos observados en condiciones de disminución en las horas luz diarias (Mohamed et al., 2000; Hira et al., 2001).

Las variaciones estacionales también se observaron a nivel de la glándula adrenal, siendo la expresión del MC2R en el perro mayor en el Ph-. Esto otorgaría a la glándula adrenal una mayor capacidad para responder al estímulo de la ACTH. De hecho, en la rata de arena (*Psammomys obesus*) se ha reportado que durante el invierno la sensibilidad adrenal a la ACTH está incrementada; lo que permite una mayor secreción de cortisol, manteniendo niveles elevados de esta hormona hasta la primavera (Amirat y Brudieus, 1993). Asimismo, se observó que en vizcachas y en hamsters en periodos de pocas horas luz diarias, el contenido lipídico de las células de la corteza adrenal disminuye, mientras que el volumen total de la zona fascicular aumenta (Ribes et al., 1999; Hira et al., 2001). Estos cambios estarían asociados a una mayor funcionalidad de la corteza adrenal en el mencionado periodo.

El RE α también presentó mayor expresión en la glándula adrenal en este fotoperiodo en el perro. No se han encontrado reportes al respecto y se desconocen los mecanismos intervinientes en este evento.

En base a lo referido previamente, sería posible que las diferencias en la expresión de ACTH en las células corticotropas y en la expresión de los receptores evaluados en la corteza adrenal del perro en relación al fotoperiodo, guarden relación con la funcionalidad del eje HHA. De hecho, en el presente estudio se observaron mayores concentraciones de ACTH y cortisol durante el ciclo estral de la perra en el Ph-.

Como se mencionara previamente, la conexión entre la variación en las horas luz y las diferencias morfológicas y funcionales observadas en este estudio podría ser mediada por la melatonina tal como lo descrito en vizcachas (Ribes et al., 1999; Hazlerigg, 2001).

Conclusiones

Existe un dimorfismo sexual del eje HHA que se pone en evidencia en las perras cíclicas, mientras que no se manifiesta en condiciones basales. Es así que, en dicha condición las hormonas del eje HHA no se ven afectadas por el sexo. Por el contrario estas hormonas se encuentran afectadas por la fase del ciclo estral. A pesar de que el dimorfismo sexual funcional no se manifiesta en condiciones basales, sí se observa el dimorfismo sexual morfológico tanto a nivel hipofisario como adrenal.

Tanto la ACTH, como la α -MSH y el cortisol serían estimuladas por el estradiol mediante distintos mecanismos. Por el contrario, la progesterona podría tener un rol estimulador o inhibidor, dependiendo de sus concentraciones.

El estradiol puede ejercer su efecto mediante la unión a los RE α presentes tanto en las células corticotropas como en la zona fascicular de la glándula adrenal. La mayor expresión de este receptor en la corteza adrenal de las hembras haría más sensible a esta glándula al estradiol.

Mediante la unión a su receptor, el estradiol no solo determinaría las variaciones de las hormonas del eje HHA observadas, sino que también daría lugar a características morfológicas distintas entre sexos. Es así que las hembras tienen mayor proporción de células corticotropas, mayor área celular y densidad óptica de dichas células, y mayor expresión del MC2R en la corteza adrenal. Estas características a su vez harían más sensible al eje HHA a actuar frente a los correspondientes estímulos en este sexo.

Por otra parte las hormonas del eje HHA también se ven afectadas por el fotoperiodo. Estas variaciones estacionales en las hormonas del eje HHA serían el resultado de la interacción entre el fotoperiodo y las variaciones de las hormonas sexuales en cada fase del ciclo estral. Por el contrario, en condiciones basales las variaciones estacionales del

cortisol tendrían su origen en la glándula adrenal, mediante una regulación independiente de la hipófisis.

Estas observaciones revelan nuevos mecanismos de regulación del eje HHA en el perro, determinados por las hormonas sexuales y el impacto del fotoperiodo. Estos hallazgos no solo amplían el conocimiento acerca del funcionamiento del eje HHA, sino que también aportan nuevos elementos para tratar de entender el desarrollo de patologías como la Enfermedad de Cushing; la cual precisamente presenta una mayor incidencia en hembras.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Aguilera, G., Rabadan-Diehl, C., 2000. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regul Pept*, 96, 23–29

Ahima, R., Krozowski, Z., Harlan, R., 1991. Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids. *J Comp Neurol.*, 313, 522-538.

Ahima, R.S., Harlan, R.E., 1990. Charting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 39, 579-604.

Alila-Johansson, A., Eriksson, L., Soveri, T., Laakso, M.L., 2003. Serum cortisol levels in goats exhibit seasonal but not daily rhythmicity. *Chronobiol Int*, 20, 65–79

Alm, Y.H., Sukjumlong, S., Kindahl, H., Dalin, A., 2009. Steroid hormone receptor ER α and PR characterized by immunohistochemistry in the mare adrenal gland. *Acta Vet Scand*, 51,31-40

Altemus, M., Roca, C., Galliven, E., Romanos, C., Deuster, P., 2001. Increased vasopressin and adrenocorticotropin responses to stress in the midluteal phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocri Metab* 2001, 86, 2525–2530

Altman, J., Bayer, S.A., 1978. Development of the diencephalon in the rat. II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons. *J Comp Neurol* 1978, 182, 973–993

Altmeyer, R., Stohr, L., Holzmann, H., 1986. Seasonal rhythm of the plasma level of alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Invest Dermatol* 1986, 86, 454-456

Amar, A.P., Weiss, M.H., 2003. Pituitary anatomy and physiology. *Neurosurg Clin N Am*, 14, 11-23

Amirat, Z., Brudieux, R., 1993. Seasonal changes in in vivo cortisol response to ACTH and in plasma and pituitary concentrations of ACTH in a desert rodent, the sand rat (*Psammomys obesus*). *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 104, 29–34

Ariyoshi, N., Kim, Y., Artemenko, I., Bhattacharyya, K., Jefcoate, C., 1998. Characterization of the Rat Star Gene That Encodes the Predominant 3.5-Kilobase Pair mRNA. ACTH Stimulation of adrenal steroids in vivo precedes elevation of StAR mRNA and protein. *J Biol Chem*, 273, 7610-7619

Asa, S.L., Ezzat, S., 1998. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev* 1998, 19, 798–827

Atkinson, H.C., Waddell, B.J., 1997. Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology*, 138, 3842–3848

Aurich, J., Wulf, M., Ille, N., Erber, R., von Lewinski, M., Palme, R., Aurich, C., 2015. Effects of season, age, sex, and housing on salivary cortisol concentrations in horses. *Domest Anim Endocrin*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.01.003>

Bao, A.M., Fischer, D.F., Wu, Y.H., Hol, E.M., Balesar, R., Unmehopa, U.A., Zhou, J.N., Swaab, D.F., 2006. A direct androgenic involvement in the expression of human corticotropin-releasing hormone. *Mol. Psychiatry*, 11, 567–576

Beijerink, N.J., Bhatti, S.F.M., Okkens, A.C., Dieleman, S.J., Mol, J.A., Duchateau, L., Van Ham, L.M.L., Kooistra, H.S., 2007. Adenohypophyseal function in bitches treated with medroxyprogesterone acetate. *Domest Anim Endocrin*, 32, 63-78

Bentvelsen, F.M., McPhaul, M.J., Wilson, C.M., Wilson, J.D., George, F.W., 1996. Regulation of immunoreactive androgen receptors in the adrenal gland of the adult rat, *Endocrinology*, 137, 2659–2663

Bornstein, S.R., Engeland, W.C., Ehrhart-Bornstein, M., Herman, J.P., 2008. Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrin Met*, 19,175-180

Bosje, J., Rijnberk, A., Mol, J., Voorhout, G., Kooistra, H., 2002. Plasma concentrations of ACTH precursors correlate with pituitary size and resistance to dexamethasone in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Domest Anim Endocrin*, 22, 201–210

Boswell, T., Woods, S.C., Kenagy, G.J., 1994. Seasonal changes in body mass, insulin, and glucocorticoids of free-living golden-mantled ground squirrels. *Gen Comp Endocr*, 96, 339–346

Bousquet, C., Ray, D.W., Melmed, S., 1997. A Common Pro-opiomelanocortin-binding Element Mediates Leukemia Inhibitory Factor and Corticotropin-releasing Hormone Transcriptional Synergy. *J Biol Chem*, 272,10551–10557

Bradbury, M.J., Akana, S.F., Dallman, M.F., 1994. Roles of type I and II corticosteroid receptors in regulation of basal activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during the diurnal trough and the peak: evidence for a nonadditive effect of combined receptor occupation. *Endocrinology*, 134, 1286-96

Brinkmeier, M.L., Davis, S.W., Carninci, P., MacDonald, J.W., Kawai, J., Ghosh, D., Hayashizaki, Y., Lyons, R.H., Camper, S.A., 2009. Discovery of transcriptional regulators and signaling pathways in the developing pituitary gland by bioinformatic and genomic approaches. *Genomics*, 93, 449–460

Brown, M.S., Kovanen, P.T., Goldstein, J.L., 1979. Receptor-mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. *Recent Prog Horm Res*, 35, 215–257

Burgess, L.H., Handa, R.J., 1992. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor mediated functions in female rats. *Endocrinology*, 131, 1261–1269

Burgess, L.H., Handa, R.J., 1993. Estrogen-induced alterations in the regulation of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor messenger RNA expression in the female rat anterior pituitary gland and brain. *Mol Cell Neurosci*, 4, 191–198

Carey, M.P., Deterd, C.H., deKoning, J., Helmerhorst, F., deKloe, E.R., 1995. The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary–adrenal regulation in the rat. *J Endocrinol*, 144, 311–321

Castillo, V., Gómez, N., Lalia, J., Cabrera Blatter, M.F., García, J., 2008. Cushing's disease in dogs: cabergoline treatment. *ResVet Sci*, 85, 26-34

Castillo, V.A., Cabrera Blatter, M.F., Gómez, N.V., Sinatra, V., Gallelli, M.F., Ghersevich, M.C., 2009. Diurnal ACTH and plasma cortisol variations in healthy dogs and in those with pituitary-dependent Cushing's syndrome before and after treatment with retinoic acid. *Res Vet Sci*, 86, 223-229

Chan, M., Chow, C., Hamson, D.K., Lieblich, S.E., Galea, L.A.M., 2014. Effects of Chronic Oestradiol, Progesterone and Medroxyprogesterone Acetate on Hippocampal Neurogenesis and Adrenal Mass in Adult Female Rats. *J Neuroendocrinol*, 26, 386–399

Chen, R., Lewis, K.A., Perrin, M.H., Vale, W.W., 1993. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci*, 90, 8967–8971

Childs, G.V., 1992. Structure–function correlates in the corticotropes of the anterior pituitary. *Front Neuroendocrinol*, 13, 271–317

Christin-Maître, S., Delemer, B., Touraine, P., Young, J., 2007. Prolactinoma and estrogens: pregnancy, contraception and hormonal replacement therapy. *Annales d'Endocrinologie*, 68, 106-112

Chung, B.C., Guo, I.C., Chou, S.J., 1997. Transcriptional regulation of the CYP11A1 and ferredoxin genes. *Steroids*, 62, 37–42

Cintra, A., Bhatnagar, M., Chadi, G., Tinner, B., Lindberg, J., Gustafsson, J.A., Agnati,

- L.F., Fuxe, K., 1994. Glial and neuronal glucocorticoid receptor immunoreactive cell populations in developing, adult, and aging brain. *Ann N Y Acad Sci*, 746, 42-63
- Cole, R.L., Sawchenko, P.E., 2002. Neurotransmitter regulation of cellular activation and neuropeptide gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci*, 22, 959-969
- Concannon, P.W., 2009. Endocrinologic Control of Normal Canine Ovarian Function. *Reprod Dom Anim*, 44, 3–15
- Concannon, P.W., 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci*, 124, 200–210
- Cordero, M., Brorsen, B.W., McFarlane, D., 2012. Circadian and circannual rhythms of cortisol, ACTH, and α -melanocyte-stimulating hormone in healthy horses. *Domest Anim Endocrin*, 43, 317-324
- Cutler Jr, G.B., Barnes, K.M., Sauer, M.A., Loriaux, D.L., 1978. Estrogen receptor in rat adrenal gland. *Endocrinology*, 102, 252–257
- Dahia, P.L.M., Grossman, A.B., 1999. The molecular pathogenesis of corticotroph tumors. *Endocr Rev*, 20, 136-155
- Davis, S.W., Camper, S.A., 2007. Noggin regulates Bmp4 activity during pituitary induction. *Dev Biol*, 305, 145–160
- Davis, S.W., Castinetti, F., Carvalhoc, L.R., Ellsworth, B.S., Potok, M.A., Lyons, R.H., Brinkmeier, M.L., Raetzman, L.T., Carninci, P., Mortensen, A.H., Hayashizaki, Y., Arnhold, I.J.P., Mendonc, B.B., Brue, T., Camper, S.A., 2010. Molecular mechanisms of pituitary organogenesis: In search of novel regulatory genes. *Mol Cell Endocrinol*, 323, 4–19
- de Bruin, C., Hanson, J.M., Meij, B.P., Kooistra, H.S., Waaijers, A.M., Uitterlinden, P., Lamberts, S.W.J., Hofland, L.J., 2008. Expression and functional analysis of dopamine

receptor subtype 2 and somatostatin receptor subtypes in canine Cushing's Disease. *Endocrinology*, 149, 4357-4366

de Bruin, C., Feelders, R.A., Lamberts, S.W.J., Hofland, L.J., 2009. Somatostatin and dopamine receptors as targets for medical treatment of Cushing's Syndrome. *Rev Endocr Metab Dis*, 42, 47-56

De Gier, J., Kooistra, H.S., Djajadiningrat-Laanen, S.C., Dieleman, S.J., Okkens, A.C., 2006. Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17 β , progesterone, prolactin and alpha-melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology*, 65, 1346-1359

Denef, C., 2012. Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *J Neuroendocrinol*, 20, 1-70

Dickmeis, T., Foulkes, N.S., 2011. Glucocorticoids and circadian clock control of cell proliferation: At the interface between three dynamic systems. *Mol Cell Endocrinol*, 331, 11-22

Diez de Castro, E., Lopez, I., Cortes, B., Pineda, C., Garfia, B., Aguilera-Tejero, E., 2014. Influence of feeding status, time of the day, and season on baseline adrenocorticotrophic hormone and the response to thyrotropin releasing hormone-stimulation test in healthy horses. *Domest Anim Endocrin*, 48, 77-83

Donaldson, M.T., McDonnell, S.M., Schanbacher, B.J., Lamb, S.V., McFarlane, D., Beech, J., 2005. Variation in plasma adrenocorticotrophic hormone concentration and dexamethasone suppression test results with season, age, and sex in healthy ponies and horses. *J Vet Intern Med*, 19, 217-222

Dubois, P.M., Hemming, F.J., 1991. Fetal development and regulation of pituitary cell types. *J Electron Microsc Tech*, 19, 220

Dubois, P. M., El Amraouri, A., 1995. Embryology of the pituitary gland. *Trends Endocr. Metab*, 6, 1–7

Ehrhart-Bornstein, M., Hinson, J., Bornstein, S., Scherbaum, W., Vinso, G., 1998. Intraadrenal Interactions in the Regulation of Adrenocortical Steroidogenesis. *Endocr Rev*, 19, 101-143

Ellsworth, B.S., Butts, D.L., Camper, S.A., 2008. Mechanisms underlying pituitary hypoplasia and failed cell specification in Lhx3-deficient mice. *Dev Biol*, 313, 118–129

Ericson, J., Norlin, S., Jessell, T.M., Edlund, T., 1998. Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development*, 125, 1005–1015

Evans, H.E., de Lahunta, A., 2013. *Miller's anatomy of the dog* (4th Ed). Missouri: Elsevier, pp. 417-421

Evuarherhe, O., Leggett, J.D., Waite, E.J., Kershaw, Y.M., Atkinson, H.C., Lightman, S.L., 2009. Organizational role for pubertal androgens on adult hypothalamic–pituitary–adrenal sensitivity to testosterone in the male rat. *J Physiol*, 587, 2977–2985

Faust, J.R., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1977. Receptor-mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured mouse adrenal cells. *J Biol Chem*, 252, 4861–4871

Fernandez, M.E., 2010. *Función medular adrenal en pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21-hidroxilasa* (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España

Ferone, D., Gatto, F., Arvigo, M., Resmini, E., Boschetti, M., Teti, C., Esposito, D., Minuto, F., 2009. The clinical–molecular interface of somatostatin, dopamine and their receptors in pituitary pathophysiology. *J Mol Endocrinol*, 42, 361–370

Figueiredo, H.F., Ulrich-Lai, Y.M., Choi, D.C., Herman, J.P., 2007. Estrogen potentiates adrenocortical responses to stress in female rats. *Am J Physiol-Endoc M*, 292, 1173-1182

Filippa, V., Mohamed, F., 2006 ACTH cells of pituitary pars distalis of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): Immunohistochemical study in relation to season, sex, and growth. *Gen Comp Endocr*, 146, 217–225

Fonseca, E., Basurto, L., Velazquez, S., Zarate, A., 2001. Hormone replacement therapy increases ACTH/dehydroepiandrosterone sulfate in menopause. *Maturitas*, 39, 57-62

Gallelli, M.F., Cabrera Blatter, M.F., Castillo, V.A., 2010. A comparative study by age and gender of the pituitary adenoma and ACTH and α -MSH secretion in dogs with pituitary dependent hypercortisolism. *Res Vet Sci*, 88, 33-40

Garcia-Iglesias, B.B., Mendoza-Garrido, M.E., Gutierrez-Ospina, G., Rangel-Barajas, C., Noyola-Diaz, M., Terron, J.A., 2013. Sensitization of restraint-induced corticosterone secretion after chronic restraint in rats: Involvement of 5-HT receptors. *Neuropharmacology*, 71C, 216-227

Giacomini, D., Paez-Pereda, M., Theodoropoulou, M., Labeur, M., Refojo, D., Gerez, J., Chervin, A., Berner S., Losa, M., Buchfelder, M., Renner, U., Stalla, G.K., Arzt, E., 2006. Bone morphogenetic protein-4 inhibits corticotroph tumor cells: involvement in the retinoic acid inhibitory action. *Endocrinology*, 147, 247–256

Giacomini, D., Haedo, M., Gerez, J., Druker, J., Páez-Pereda, M., Labeur, M., Stalla, G.K., Arzt, E., 2009. Differential gene expression in models of pituitary prolactin-producing tumoral cells. *Horm Res*, 71, 88-94

Gilbert, S.F., 2000. *Developmental Biology* (6th Ed.). Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.

Goel, N., Workman J.L., Lee, T.T., Innala, L., Viau, V., 2014. Sex differences in the HPA axis. *Comprehensive Physiology* 4, 1121-1155.

Goland, R.S., Jozak, S., Conwell, I., 1994. Placental corticotropin-releasing hormone and the hypercortisolism of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 171, 1287-1291

González, M., Reyes, R., Damas, C., Alonso, R., Bello, A.R., 2008. Oestrogen receptor α and β in female rat pituitary cells: An immunochemical study. *Gen Comp Endocr*, 155, 857–868

Halasz, B., 1994. Hypothalamo-anterior pituitary system and pituitary portal vessels. In Imura, H. (ed), *The Pituitary Gland*. New York: Raven Press, pp128

Hall, J.M., Couse, J.F., Korach, K.S., 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem*, 276, 36869-36872

Handa, R.J., Burgess, L.H., Ker, J.E., O'Keefe, J.A., 1994a. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Horm Behav*, 28, 464-476

Handa, R.J., Nunley, K.M., Lorens, S.A., Louie, J.P., McGivern, R.F., Bollnow, M.R., 1994b. Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterona secretion in the male rat following novelty and foot shock stressors. *Physiol Behav*, 55, 117–124

Handa, R.J., Weiser, M.J., Zuloaga, D.G., 2009. A role for the androgen metabolite, 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol, in modulating oestrogen receptor β -mediated regulation of hormonal stress reactivity. *J Neuroendocrinol*, 21, 351-358

Handa, R.J., Weiser, M.J., 2014. Gonadal Steroid Hormones and the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. *Front Neuroendocrin*, 35, 97-220

Hanson, J.M., Mol, J.A., Leegwater, P.A.J., Bilodeau, S., Drouin, J, Meij, B.P., 2008. Expression and mutation analysis of *Tpit* in the canine pituitary gland and corticotroph adenomas. *Dom Anim Endocr*, 34, 217-222

Hanson, J.M., Mol, J.A., Meij, B.P., 2010. Expression of leukemia inhibitory factor and leukemia inhibitory factor receptor in the canine pituitary gland and corticotrope adenomas. *Domest Anim Endocrin*, 38, 260-271

Hazlerigg, D.G., 2001. What is the role of melatonin within the anterior pituitary?
J Endocrinol, 170, 493–501

Heisler, L.K., Pronchuk, N., Nonogaki, K., Zhou, L., Raber, J., Tung, L., Yeo, G.S., O'Rahilly, S., Colmers, W.F., Elmquist, J.K., Tecott, L.H., 2007. Serotonin activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via serotonin 2C receptor stimulation.
J Neurosci, 27, 6956-6964

Herman, J.P., Wiegand, S.J., Watson, S.J., 1990. Regulation of basal corticotrophin releasing hormone and arginine vasopressin messenger ribonucleic acid expression in the paraventricular nucleus: effects of selective hypothalamic deafferentations. *Endocrinology*, 127, 2408-2417

Herman, J.P., Cullinan, W.E., 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis, *Trend Neurosci*, 20, 78–84

Herman, J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Laia, Y., Ostrander, M.M., Choi, D.C., Cullinan, W.E., 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo–pituitary–adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrin*, 24, 151–180

Hira, Y., Sakai, Y., Matsushima, S., 2001. Effects of photoperiod and melatonin on the development of growth hormone cells and the pituitary-adrenal axis in the Djungarian hamster, *Phodopus Sungorus*. *Arch Histol Cytol*, 64, 211-222

Hirst, J.J., West, N.B., Brenner, R.M., Novy, M.J., 1992. Steroid hormone receptors in the adrenal glands of fetal and adult rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*, 75, 308-314

Holmes, R.L., Ball, J.N., 1974. The pituitary gland: a comparative account. Cambridge: University Press

Hough, B., Storbeck, K., Cloete, S.W.P., Swart, A.C., Swart, P., 2015. Relative contribution of P450c17 towards the acute cortisol response: Lessons from sheep and goats. *Mol Cell Endocrinol*, [doi:10.1016/j.mce.2015.01.018](https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.018)

Hu, M.C., Hsu, N.C., Pai, C.I., Wang, C.K., Chung, B.C., 2001. Functions of the upstream and proximal steroidogenic factor 1 (SF-1)-binding sites in the CYP11A1 promoter in basal transcription and hormonal response. *Mol Endocrinol*, 15, 812-818

Ingram, J.R., Crockford, J.N., Matthews, L.R., 1999. Ultradian, circadian and seasonal rhythms in cortisol secretion and adrenal responsiveness to ACTH and yarding in unrestrained red deer (*Cervus elaphus*) stags. *J Endocrinol*, 162, 289 –300

Inoue, K., Couch, E.F., Takano, K., Ogawa, S.O., 1999. The structure and function of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland. *Arch histol cytol*, 62, 205-218

Itoi, K., Suda, T., Tozawa, F., Dobashi, I., Ohmor, N., Sakai, Y., Abe, K., Demura, H., 1994. Microinjection of norepinephrine into the paraventricular nucleus of the hypothalamus stimulates corticotropin-releasing factor gene expression in conscious rats. *Endocrinology*, 135, 2177-2182

Johnston, S.D., Kustritz, R., Olson, P.N.S., 2001. Canine and feline theriogenology. Philadelphia: Saunders

Kageyama, K., Suda, T., 2009. Regulatory mechanisms underlying corticotropin-releasing factor gene expression in the hypothalamus. *Endocr J*, 56, 335-344

Kalil, B., Leite, C.M., Carvalho-Lima, M., Anselmo-Franci, J.A., 2013. Role of sex steroids in progesterone and corticosterone response to acute restraint stress in rats: sex differences. *Stress*, 16, 452-460

Kawamura, K., Kouki, T., Kawahara, G., Kikuyama, S., 2002. Hypophyseal Development in Vertebrates from Amphibians to Mammals. *Gen Comp Endocrinol*, 126, 130–135.

Kealy, J.K., McAllister, H., Graham, J.P., 2011. *Diagnostic radiology and ultrasonography of the dog and cat* (5th Ed). Missouri: Elsevier

Keller-Wood, M., 1998. ACTH responses to hypotension and feedback inhibition of ACTH increased by chronic progesterone treatment. *Am J Physiol-Reg I*, 274, 81-87

Keller-Wood, M., Wood, C.E., 2001. Pregnancy alters cortisol feedback inhibition of stimulated ACTH: studies in adrenalectomized ewes. *Am J Physiol Reg I*, 280, 1790-1798

Kempanien, R.J., Sartin, R.L., 1984. Evidence for episodic but not circadian activity in plasma concentrations of adrenocorticotrophin, cortisol and thyroxine in dogs. *J Endocrinol*, 103, 219–225

Kemppainen, R.J., Zerbe, C.A., Sartin, J.L., 1989. Regulation and secretion of proopiomelanocortin peptides from isolated perfused dog pituitary pars intermediacells. *Endocrinology*, 124, 2208-2217

Kitay, J.I., 1961. Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. *Endocrinology*, 68, 818-824

Kitazawa, S., Shioda, S., Nakai, Y., 1987. Catecholaminergic innervation of neurons containing corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Acta Anat*, 129, 337-343

Kobayashi, H., Yamaguichi, Y., Uemura, H., 1999. The median eminence. A mediator in the regulation of the pituitary by the brain. In Prasada Rao and Peter (Eds.), "Neural Regulation in the Vertebrate Endocrine System." Nueva York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 1–22

Koeppen, B.M., Stanton, B.A., 2010. *Berne & Levy Physiology (6th Ed.)*, St. Louis: Elsevier

Kooistra, H.S., Okkens, A.C., 2000. The role of follicle-stimulating hormone in the initiation of ovarian folliculogenesis in the bitch. The fourth international symposium on canine and feline reproduction, Norway, p44

Labeur, M., Paez-Pereda, M., Haedo, M., Arzt, E., Stalla, G.K., 2010. Pituitary tumors: Cell type-specific roles for BMP-4. *Mol Cell Endocrinol*, 326, 85–88

Lafarque, M., Oliveros, L., Aguado, L., 1998. Efecto de secreciones de *pars tuberalis* de la adenohipófisis sobre la liberación de prolactina desde *pars distalis*. *Medicina*, 58, 36-40

Lee, E.J., Duan, W.R., Jakacka, M., Gehm, B.D., Jameson, J.L., 2001. Dominant Negative ER Induces Apoptosis in GH₄ Pituitary Lactotrope Cells and Inhibits Tumor Growth in Nude Mice. *Endocrinology*, 142, 3756–3763

Lee, K.S., Han, T.H., Jo, J.Y., Kang, G., Lee, S.Y., Ryu, P.D., Im, J.H., Jeon, B.H., Park, J.B., 2008. Serotonin inhibits GABA synaptic transmission in presympathetic paraventricular nucleus neurons. *Neurosci Lett*, 439, 138-142

Levy, A., Lightman, S., 2003. Molecular defects in the pathogenesis of pituitary tumors. *Front Neuroendocrin*, 24, 94-127

Li, Q., Jansen, E., Friedman, T.C., 1999. Regulation of prohormone convertase 1 (PC1) by gp130-related cytokines. *Mol Cell Endocrinol*, 158, 143–152

Lidhar, K., Korbonits, M., Jordan, S., Khalimova, Z., Kaltsas, G., Lu, X., Clayton, R.N., Jenkins, P.J., Monson, J.P., Besser, G.M., Lowe, D.G., Grossman, A.B., 1999. Low expression of the cell cycle inhibitor p27/kip1 in normal corticotroph cells, corticotroph tumors and malignant pituitary tumors. *J Clin Endocr Metab*, 84, 3823–3830

Lincoln, G.A., Baker, B.I., 1995. Seasonal and photoperiod-induced changes in the secretion of α -melanocyte stimulating hormone in Soay sheep: temporal relationships with changes in β -endorphin, prolactin, follicle-stimulating hormone, activity of the gonads and growth of wool and horn. *J Endocrinol*, 144, 471-481

Lincoln, G.A., Rhind, S.M., Pompolo, S., et al, 2001. Hypothalamic control of photoperiod-induced cycles in food intake, body weight, and metabolic hormones in rams. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281, R76-R90

Lindsay, F.E.F., 1983. The normal endoscopic appearance of the caudal reproductive tract of the cyclic (and non cyclic bitch): post uterine endoscopy. *J Small Anim Practice*, 24, 1-15

Liu, J., Bisschop, P.H., Eggels, L., Foppen, E., Fliers, E., Zhou, J.N., Kalsbeek. A., 2012. Intrahypothalamic estradiol modulates hypothalamus-pituitary-adrenal-axis activity in female rats. *Endocrinology*, 153, 3337-3344

Lo, M.J., Chang, L.L., Wang, P.S., 2000. Effects of estradiol on corticosterone secretion in ovariectomized rats. *J Cell Biochem*, 77, 560-568

Logan, A., Weatherhead, B., 1980. Photoperiodical dependence of seasonal changes in pituitary content of melanocyte-stimulating hormone content. *Neuroendocrinology*, 30, 309-312

Lund, T.D., Munson, D.J., Haldy, M.E., Handa, R.J., 2004. Androgen inhibits, while oestrogen enhances, restraint-induced activation of neuropeptide neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Neuroendocrinol*, 16, 272-278

Lund, T., Hinds, L., Handa, R., 2006. The Androgen 5α -Dihydrotestosterone and Its Metabolite 5α -Androstan- $3\beta,17\beta$ -Diol Inhibit the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Response to Stress by Acting through Estrogen Receptor β -Expressing Neurons in the Hypothalamus. *J Neurosci*, 26, 1448-1456

Luo, X., Ikeda, Y., Parker, K.L., 1994. A cell-specific nuclear factor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77, 481-490

Malendowicz, L.K., Stachowiak, A., Zabe, M., 1987. Sex differences in adrenocortical structure and function. XXV. Quantitative analysis of ACTH-immunoreactive cells in the anterior pituitary of gonadectomized and gonadal hormone replaced male and female rats. *Exp Clin Endocrinol*, 90, 1-8

Mandrup-Poulsen, T., Nerup, J., Reimers, J.I., Pociot, F., Andersen, H.U., Karlsen, A., Bjerre, U., Bergholdt, R., 1995. Cytokines and the endocrine system. I. The immunoendocrine network. *Eur J Endocrinol*, 133, 660-671

Mayer, M.N., Treuil, P., 2007. Radiation therapy for pituitary tumors in the dog and cat. *Can Vet J*, 48, 316–318

McCormick, C.E., Furey, B.F., Child, M., Sawyer, M.J., Donohue, S.M., 1998. Neonatal sex hormones have “organizational” effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of male rats. *Dev Brain Res*, 105, 295-307

McCormick, C.M., Linkroum, W., Sallinen, B.J., Miller, N.W., 2002. Peripheral and central sex steroids have differential effects on the HPA axis of male and female rats. *Stress*, 5, 235–247

McFarlane, D., Donaldson, M.T., McDonnell, S.M., Cribb, A.E., 2004. Effects of season and sample handling on measurement of plasma alpha-melanocyte-stimulating hormone concentrations in horses and ponies. *Am J Vet Res*, 65, 1463–1468

McGimsey, W.C., Cidlowski, J.A., Stumpf, W.E., Sar, M., 1991. Immunocytochemical localization of the glucocorticoid receptor in rat brain, pituitary, liver, and thymus with two new polyclonal antipeptide antibodies. *Endocrinology*, 129, 3064-3072

Melmed, S., 2003. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest*, 112,1603-1618

Mesiano, S., Jaffe, R.B., 1997. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr. Rev*, 18, 378–403

Michael, R.P., Rees, H.D., 1982. Autoradiographic localization of 3Hdihydrotestosterone in the preoptic area, hypothalamus, and amygdala of a rhesus monkey. *Life Sci*, 30, 2087–2093

Miller, W.L., 2007. StAR search – what we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import. *Mol Endocrinol*, 21, 589–601

Miller, W.L., Auchus, R.J., 2011. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Res*, 32: 81–151

Mills, S.E., 2007. *Histology for pathologists (3rd Ed)*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins

Mitchner, N.A., Garlick, C., Ben-Jonathan, N., 1998. Cellular Distribution and Gene Regulation of Estrogen Receptors α and β in the Rat Pituitary Gland. *Endocrinol*, 139, 3976-3983

Mitra, S.W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H.A., Hayashi, S., Pfapp, D.W., Ogawa, S., Rohrer, S.P., Schaeffer, J.M., Mcewen, B.S., Alves, S.E., 2003. Immunolocalization of Estrogen Receptor β in the Mouse Brain: Comparison with Estrogen Receptor α . *Endocrinology*, 144, 2055-2067

Mohamed, F., Fogal, T., Dominguez, S., Scardapane, L., Guzman, J., Piezzi, R.S., 2000. Colloid in the pituitary pars distalis of vizcacha (*Lagostomus maximus maximus*): ultrastructure and occurrence in relation to season, sex and growth. *Anat Rec*, 258, 252-261

Mollard, P., Hodson, D.J., Lafont, C., Rizzoti, K., Drouin, J., 2012. A tridimensional view of pituitary development and function. *Trends Endocrin Met*, 23, 261-269

- Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K., Kawata, M., 1996. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci Res*, 26, 235-69
- Myers, M.J., Litz, B., Atkinson, S., 2010. The effects of age, season and geographic region of circulating serum cortisol concentrations in threatened and endangered Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). *Gen Comp Endocr*, 165, 72-77
- Nelson, R.W., Feldman, E.C., 2004. Ciclo ovarico y citología vaginal. En: Nelson, R.W., Feldman, E.C. (eds.) *Endocrinología y reproducción canina y felina*. Buenos Aires: Intermédica, pp. 850-853
- Netter, F.H., 2010. *Atlas of Human Anatomy*. Philadelphia: Saunders/Elsevier, pp. 148
- Nicholson, S., Lin, J.H., Mahmoud, S., Campbell, E., Gillham, B., Jones, M., 1985. Diurnal variations in responsiveness of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis of the rat. *Neuroendocrinology*, 40, 217-224
- Norman, R.J., Weatherhead, B., Vincent, D.S., 1972. Changes in pituitary melanocyte stimulating hormone in female ferrets exposed to 14-h-photoperiods daily during winter. *J Endocrinol*, 55, 21-22
- Norris, D.O., 2007. *Vertebrate endocrinology* (4th Ed.), USA: Elsevier Academic Press, pp. 110
- Nowak, K.W., Neri, G., Nussdorfer, G.G., Malendowicz, L.K., 1995. Effects of sex hormones on the steroidogenic activity of dispersed adrenocortical cells of the rat adrenal cortex. *Life Sci*, 57, 833-837
- Oberholzer, M., Ostreicher, M., Christen, H., Bruhlmann, M., 1996. Methods in quantitative image analysis. *Histochemistry and Cell Biology*, 105, 333-355

Optical density calibration (16 de Febrero 2015). Obtenido de [http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/index.html]

Ochedalski, T., Subburaju, S., Wynn, P.C., Aguilera, G., 2007. Interaction between oestrogen and oxytocin on hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity. *J Neuroendocrinol*, 19, 189–197

Ogura, E., Kageyama, K., Hanada, K., Kasckow, J., Suda, T., 2008. Effects of estradiol on regulation of corticotropin-releasing factor gene and interleukin-6 production via estrogen receptor type b in hypothalamic 4B cells. *Peptides*, 29, 456-464

Okamoto, M., Takemori, H., 2000. Differentiation and zonation of the adrenal cortex. *Curr Opin Endocrinol Diabetes*, 7, 122-127

Olah, M., Feher, P., Ihm, Z., Bacskay, I., Kiss, T., Freeman, M.E., Nagy, G.M., Vecsernyes, M., 2009. Dopamine-regulated adrenocorticotrophic hormone secretion in lactating rats: functional plasticity of melanotropes. *Neuroendocrinology*, 90, 391-401

Olson, P.N., Bowen, R.A., Behrendt, M.D., Olson, J.D., Nett, T.M., 1982. Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. *Biol reprod*, 27, 1196-1206

Ottenweller, J.E., Tapp, W.N., Pitman, D.L., Natelson, B.H., 1987. Adrenal, thyroid and testicular hormone rhythms in male golden hamsters on long and short days. *Am J Physiol*, 253, R321-R328

Pacak, K., 2000. Stressor-specific activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Physiol Res*, 49, S11-7

Paez-Pereda, M., Giacomini, D., Refojo, D., et al., 2003. Involvement of bone morphogenetic protein 4(BMP-4) in pituitary prolactinoma pathogenesis through a Smad_ estrogen receptor crosstalk. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 1034-1039

Page, R., 1994. The anatomy of the hypothalamo-hypophysial complex. In Knobil, E., Neill, J. (eds), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, pp 1527-1619

Palkovits, M., 1987. Anatomy of neural pathways affecting CRH secretion. *Ann N Y Acad Sci*, 512, 139–148

Panagiotakopoulos, L., Neigh, G., 2014. Development of the HPA Axis: Where and When Do Sex Differences Manifest? *Front Neuroendocrin*, 35, 285-302

Patchev, V.K., Almeida, O.F.X., 1996. Gonadal steroids exert facilitating and buffering effects on glucocorticoid mediated transcriptional regulation of corticotrophin releasing hormone and corticosteroid receptor genes in rat brain. *J Neuroscience*, 16, 7077–7084

Pattison, C., Saltzman, W., Abbott, D., Hogan, B., Nguyen, A., Husen, B., Einspanier, A., Conley, A., Bird, I., 2007. Gender and gonadal status differences in zona reticularis expression in marmoset monkey adrenals: Cytochrome b5 localization with respect to cytochrome P450 17,20-lyase activity. *Mol Cell Endocrinol*, 265-266, 93-101.

Pecori Giraldi, F., Moro, M., Cavagnini, F., 2003. Gender-Related Differences in the Presentation and Course of Cushing's Disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 1554–1558

Peiffer, A., Barden, N., 1987. Estrogen-induced decrease of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid concentration in rat anterior pituitary gland. *Mol Endocrinol*, 1, 435–440

Perez-Castro, C., Renner, U., Haedo, M.R., Stalla, G.K., Arzt, E., 2012. Cellular and Molecular Specificity of Pituitary Gland Physiology. *Physiol Rev*, 92, 1-38

Pessina, P., Fernandez Foren, A., Cueto, E., Delucchi, L., Castillo, V., Meikle, A., 2009. Cortisol secretion alter adrenocorticotrophin (ACTH) and Dexamethasone tests in healthy female and male dogs. *Acta Vet Scand*, 51, 33-38

Plotsky, P.M., Cunningham, E.T., Jr. Widmaier, E.P., 1989. Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocr Rev*, 10, 437-58

Pramoda, S., Saidapur, S.K., 1991. Seasonal changes in the cytomorphology of hypophyseal ACTH cells in relation to the reproduction cycle of the female of the frog *Rana tigerina* (Daud.). *Funct Dev Morphol*, 1, 47–50

Puelles, L., Harrison, M., Paxinos, G., Watson, C., 2013. A developmental ontology for the mammalian brain based on the prosomeric model. *Trends Neurosci* 36, 570-578

Rhodes, M.E., Rubin, R.T., 1999. Functional sex differences (“sexual diergism”) of central nervous system cholinergic systems, vasopressin, and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in mammals: a selective review. *Brain Res Rev*, 30, 135-152

Ribes, A.C., Mohamed, F., Dominguez, S., Delgado, M., Scardapane, L., Guzman, J., Piezzi, R., 1999. Probable effect of photoperiod on seasonal variation in the nuclear volume of the adrenal cortex of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). *Braz J Med Biol Res*, 32, 1115-1120

Ribes, A.C., 2000. “Estudio morfológico y bioquímico de la glándula adrenal de vizcacha (*Lagostomus maximus maximus*). Efecto del fotoperíodo.” (Tesis doctoral). Biblioteca Universidad Nacional de San Luis

Ring, R.H., 2005. The central vasopressinergic system: examining the opportunities for psychiatric drug development. *Curr Pharm Des*, 11, 205-25

Rivier, C., Vale, W., 1983. Effect of angiotensin II on ACTH release in vivo: role of corticotropin-releasing factor. *Regul Peptides*, 7,253-258

Romeo, R.D., 2010. Pubertal maturation and programming of hypothalamic–pituitary–adrenal reactivity. *Front Neuroendocrinol*, 31, 232–240

Romero, L.M., 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *Gen Comp Endocr*, 128, 1–24

Rossi, D.V., Dai, Y., Thomas, P., Carrasco, G.A., DonCarlos, L.L., Muma, N.A., Li, Q., 2010. Estradiol-induced desensitization of 5-HT_{1A} receptor signaling in the paraventricular nucleus of the hypothalamus is independent of estrogen receptorbeta. *Psychoneuroendocrinology*, 35, 1023-1033

Roy, B.N., Reid, R.L., Van Vugt, D.A., 1999. The effects of estrogen and progesterone on corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin messenger ribonucleic acid levels in the paraventricular nucleus and supraoptic nucleus of the rhesus monkey. *Endocrinology*, 140, 2191-2198

Rubinow, D.R., Roca, C.A., Schmidt, P.J., Danaceau, M.A., Putnam, K., Cizza, G., Chrousos, G., Nieman, L., 2005. Testosterone suppression of CRH-stimulated cortisol in men. *Neuropsychopharmacology*, 30, 1906-1912

Sadler, T.W., 2005. Embryology of neural tube development. *Am J Med Genet C: Semin Med Genet*, 135C, 2–8

Saiardi, A., Bozzi, Y., Baik, J., Borrelli, E., 1997. Antiproliferative Role of Dopamine: Loss of D₂ Receptors Causes Hormonal Dysfunction and Pituitary Hyperplasia. *Neuron*, 19, 115–126

Sasaki, F., Wu, P., Rougeau, D., Unabia, G., Childs, G.V., 1990. Cytochemical studies of responses of corticotropes and thyrotropes to cold and novel environmental stress. *Endocrinology*, 127, 285–297.

Sasaki, F., Nishioka, S., 1998. Fetal development of the pituitary gland in the Beagle. *Anat Rec*, 251, 143-151

Sawchenko, P.E., 1987. Evidence for a local site of action for glucocorticoids in inhibiting CRF and vasopressin expression in the paraventricular nucleus. *Brain Res*, 403, 213-23

Scanes, C.G., Jeftinija, S., Glavaski-Joksimovic, A., Proudman, J., Arámburo, C., Anderson, L.L., 2005. The anterior pituitary gland: lessons from livestock. *Domest Anim Endocrinol*, 29, 23-33.

Schaefer-Okkens, A.C., Kooistra, H.S., 2010. Ovaries. In Rijnberk, A., Kooistra, H.S. (Eds), *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats*. Hannover: Schlütersche, pp. 203-234

Schimpl, P.A., Mendoza, S.P., Saltzman, W., Lyons, D.M., Mason, W.A., 1996. Seasonality in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*): social facilitation by females. *Physiol Behav* ,60, 1105–1113

Schlosser, S.F., Almeida, O.F., Patchev, V.K., Yassouridis, A., Elands, J., 1994. Oxytocin-stimulated release of adrenocorticotropin from the rat pituitary is mediated by arginine vasopressin receptors of the V1b type. *Endocrinology*,135, 2058-2063

Schreiber, C.M., Stewart, A.J., Kwessi, E., Behrend, E.N., Wright, J.C., Kemppainen, R.J., Busch, K.A., 2012. Seasonal variation in results of diagnostic tests for pituitary pars intermedia dysfunction in older, clinically normal geldings. *J Am Vet Med Assoc*, 241, 241–248

Schuhler, S., Ebling, F.J., 2006. Role of melanocortin in the long-term regulation of energy balance: lessons from a seasonal model. *Peptides*, 27, 301–309

Schutte, A.P., 1967a. Canine vaginal cytology II. Cyclic changes. *J Small Anim Pract*, 8, 307-311

Schutte, A.P., 1967b. Canine vaginal cytology III. Compilation and evaluation of cellular indices. *J Small Anim Pract*, 8, 313-317

Scott, C.J., Tilbroo, A.J., Rawson, J.A., Clarke, I.J., 2000. Gonadal steroid receptors in the regulation of GnRH secretion in farm animals. *Anim Rep Sci*,60-61, 313-326

Seale, J.V., Wood, S.A., Atkinson, H.C., Lightman, S.L., Harbuz, M.S., 2005. Organizational Role for Testosterone and Estrogen on Adult Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity in the Male Rat. *Endocrinol*,146, 1973–1982

Serova, L.I., Harris, H.A., Maharjan, S., Sabban, E.L.,2010. Modulation of responses to stress by estradiol benzoate and selective estrogen receptor agonists. *J Endocrinol*, 205, 253-62

Shapiro, R.A., Xu, C., Dorsa, D.M., 2000. Differential transcriptional regulation of rat vasopressin gene expression by estrogen receptor alpha and beta. *Endocrinology*, 141, 4056-4064

Shupnik, M.A., 1996. Gonadal hormone feedback on pituitary gonadotropin genes. *Trends Endocrinol Metab*,7, 272-276

Ssewanyana, E., Lincoln, G.A., Linton, E.A., Lowry, P.J., 1990. Regulation of the seasonal cycle of beta-endorphin and ACTH secretion into the peripheral blood of rams. *J Endocrinol*, 124, 443–454

Stocco, D., Clark, B., 1996. Regulation of the Acute Production of Steroids in Steroidogenic Cells. *Endocr Rev*, 17, 221-244

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

Suh, H., Gage, P.J., Drouin, J., Camper, S.A., 2002. Pitx2 is required at multiple stages of pituitary organogenesis: pituitary primordium formation and cell specification. *Development*, 129, 329–337

Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., 1983. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci*, 6, 269-324

Szarek, E., Cheah, P.S., Schwartz, J., Thomas, P., 2010. Molecular genetics of the developing neuroendocrine hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol*, 323, 115-123

Takuma, N., Sheng, H.Z., Furuta, Y., Ward, J.M., Sharma, K., Hogan, B.L., Pfaff, S.L., Westphal, H., Kimura, S., Mahon, K.A., 1998. Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development*, 125, 4835–4840

Tanaka, S., 2003. Comparative aspects of intracellular proteolytic processing of peptide hormone precursors: studies of proopiomelanocortin processing. *Zool Sci*, 20, 1183-1198

Taniguchi, Y., Yasutaka, S., Kominami, R., Shinohara, H., 2002. Proliferation and differentiation of rat anterior pituitary cells. *Anat Embryol (Berl.)*, 206, 1–11

Tasende, C., Meikle, A., Rodriguez-Piñon, M., Forsberg, M., Garofalo, E.G., 2002. *Theriogenology*, 57, 1719-1731

Terrazzino, S., Perego, C., De Simoni, M.G., 1995. Effect of development of habituation to restraint stress on hypothalamic noradrenaline release and adrenocorticotropin secretion. *J Neurochem*, 65, 263-7

Theodoropoulou, M., Stalla, G.K., 2013. Somatostatin receptors: From signaling to clinical practice. *Front Neuroendocrin*, 34, 228–252

Toufexis, D.J., Wilson, M.E., 2012. Dihydrotestosterone differentially modulates the cortisol response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male and female rhesus macaques, and restores circadian secretion of cortisol in females. *Brain Res*, 1429, 43-51

Treier, M., Gleiberman, A.S., O'Connell, S.M., Szeto, D.P., McMahon, J.A., McMahon, A.P., Rosenfeld, M.G., 1998. Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev*, 12, 1691–1704

Tsigos, C., Chrousos, G.P., 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res*, 53, 865-71

Turner, B. B., 1990. Sex difference in glucocorticoid binding in rat pituitary is estrogen dependent. *Life Sci*, 46, 1399–1406

Ulrich-Lai, Y.M., Herman, J.P., 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*, 10, 397–409

Vamvakopoulos, N.C., Chrousos, G.P., 1993. Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression. Potential implications for the sexual dimorphism of the stress response and immune/inflammatory reaction. *J Clin Invest*, 92, 1896–1902

van Lier, E., Perez-Clariget, R., Forsberg, M., 2003a. Sex differences in cortisol secretion after administration of an ACTH analogue in sheep during the breeding and non-breeding season. *Anim Reprod Sci*, 79, 81-92

van Lier, E., 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. *Dom Anim Endocrinol*, 25, 373-387

van Lier, E., Carriquiry, M., Meikle, A., 2014. Sex steroid modulation of cortisol secretion in sheep. *Animal*, 8, 960-967

van Wijk, P.A., Rijnberk, A., Croughs, R.J., Meij, B.P., Mol, J.A., 1998. Effects of corticotrophin-releasing hormone, vasopressin and insulin-like growth factor-I on proliferation of and adrenocorticotrophic hormone secretion by canine corticotrophic adenoma cells in vitro. *Eur J Endocrinol*, 138,309–15

Viau, V., Meaney, M.J., 1991. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology*,129, 2503-2511

Viau, V., Bingham, B., Davis, J., Lee, P., Wong, M., 2005. Gender and puberty interact on the stress-induced activation of parvocellular neurosecretory neurons and corticotropin-

releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology*, 146, 137-146

Vidal, S., Roman, A., Moya, L., 1995. Immunohistochemical identification and morphometric study of ACTH cells of mink (*Mustela vison*) during growth and different stages of sexual activity in the adult. *Gen Comp Endocrinol*, 100, 18–26

Walker, B.R., Best, R., Noon, J.P., Watt, G.C.M., Webb, D.J., 1997. Seasonal variation in glucocorticoid activity in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 4015–4019

Weiser, M.J., Handa, R.J., 2009. Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus. *Neuroscience*, 159, 883-895

Welboren, W., Sweep, F.C.G.J., Span, P.N., Stunnenberg, H.G., 2009. Genomic actions of estrogen receptor α : what are the targets and how are they regulated? *Endocr Relat Cancer*, 16, 1073-1089

Westlund, K.N., Aguilera, G., Childs, G.V., 1985. Quantification of morphological changes in pituitary corticotropas produced by in vivo corticotrophin-releasing factor stimulation and adrenalectomy. *Endocrinology*, 116, 439–445

Williamson, M., Viau, V., 2008. Selective contributions of the medial preoptic nucleus to testosterone-dependant regulation of the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the HPA axis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295, R1020-30

Wittkowski, W., Bockmann, J., Kreutz, M.R., Bockers, T.M., 1999. Cell and Molecular Biology of the Pars Tuberalis of the Pituitary. *International Review of Cytology*, 185, 157-194.

Wood, C.E., Shinsako, J., Keil, L.C., Ramsay, D.J., Dallman, M.F., 1982a. Apparent dissociation of adrenocorticotropin and corticosteroid responses to 15 ml/kg hemorrhage in conscious dogs. *Endocrinology*, 110, 1416–1421

Wood, C.E., Shinsako, J., Dallman, M.F., 1982b. Comparison of canine corticosterone responses to mean and phasic increases in ACTH. *Am J Physiol*, 242, E102–E108

Yang, Z., Lim, A.T., 1995. Progesterone, but not estrogen, modulates the cAMP system mediated ir-beta-endorphin secretion and POMC mRNA expression from rat hypothalamic cells in culture. *Brain Res*, 678, 251-258

Yeung, C., Chan, C., Leung, P., Cheng, C.H.K., 2006. Cells in focus Cells of the anterior pituitary. *Int J Biochem Cell B*, 38, 1441–1449

Young, L.S., Murphy, G., Kelly, S.N., Smith, T.P., Cunningham, S.K., McKenna, J.T., 2003. Differential production of adrenal steroids by purified cells of the human adrenal cortex is relative rather than absolute. *Eur J Endocrinol*, 148,139–45

Zhu, X., Gleiberman, A.S., Rosenfeld, M.G., 2007. Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev*, 87, 933–963

Zhang, Y., Damjanoska, K.J., Carrasco, G.A., Dudas, B., D'Souza, D.N., Tetzlaff, J., Garcia, F., Hanley, N.R., Scripathirathan, K., Petersen, B.R., Gray, T.S., Battaglia, G., Muma, N.A., Van de Kar, L.D., 2002. Evidence that 5-HT_{2A} receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus mediate neuroendocrine responses to (-) DOI. *J Neurosci*, 22, 9635-9642

