

## ELEMENTOS DE RESPUESTA A ESTRÉS EN EL OVARIO Y SU IMPLICANCIA EN LA FISIOPATOLOGÍA OVÁRICA EN BOVINOS

### STRESS RESPONSE ELEMENTS IN THE OVARY AND ITS IMPLICATION IN OVARIAN PATHOPHYSIOLOGY IN CATTLE

Ayelen Noelia AMWEG<sup>1,2</sup>; Natalia Raquel SALVETTI<sup>1</sup>; Florencia REY<sup>1</sup>; Hugo Héctor ORTEGA<sup>1</sup>

1. Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Argentina. Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, (CONICET). Esperanza, Santa Fe, Argentina. 2. Fundación Bunge y Born

#### RESUMEN.

En respuesta a varios estresores, la hormona adrenocorticotrópica estimula la síntesis y secreción de los glucocorticoides, los cuales pueden afectar la reproducción directamente por acción sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. En este sentido, es importante destacar que la ovulación ha sido descrita como un proceso inflamatorio localizado, donde una sucesión de eventos lleva a la degradación proteolítica de un punto específico de la pared folicular para permitir la salida del ovocito. Por lo tanto, el cortisol liberado a causa del estrés podría actuar a nivel del sitio ovulatorio inhibiendo la ovulación al producir efectos antiinflamatorios locales. Si bien no ha sido demostrado que el ovario sea capaz de producir glucocorticoides *de novo*, la hormona adrenocorticotrópica, a través de su unión a los receptores de melanocortinas en el ovario bovino, es capaz de estimular la secreción de hormonas esteroides tanto *in vivo* como *in vitro*, principalmente la secreción de cortisol, y producir cambios en la expresión de las enzimas 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas responsables de la activación/inactivación del cortisol. Nuestros resultados indican que la hormona adrenocorticotrópica puede estar implicada en los mecanismos regulatorios relacionados a la función ovárica asociados con la ovulación, la esteroidogénesis y la fisiopatología de diferentes enfermedades reproductivas en bovinos.

**Palabras claves:** ACTH, cortisol, estrés, ovario, bovino.

#### ABSTRACT.

In response to stressors, adrenocorticotrophic hormone stimulates the synthesis and secretion of glucocorticoids, which can affect reproduction acting on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. In this sense, that ovulation has been described as a localized inflammatory process, where a sequence of events leading to proteolytic degradation of a specific point of the follicular wall to allow the exit of the oocyte. Hence, cortisol released could act in the ovulatory site, inhibiting the ovulation through the production of local anti-inflammatory effects. Although has not been demonstrated that the ovary is able to produce glucocorticoids *de novo*, adrenocorticotrophic hormone, through binding to melanocortin receptors in bovine ovary, it is able to stimulate the secretion of steroid hormones both *in vivo* and *in vitro*, mainly cortisol, and produce changes in the expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes responsible for the local activation / inactivation of cortisol. Our results indicate that adrenocorticotrophic hormone may be involved in regulatory mechanisms related to ovarian function associated with ovulation, ovarian steroidogenesis, luteal function and the pathophysiology of various reproductive diseases in cattle.

**Keywords:** ACTH, cortisol, stress, ovary, bovine.

Recibido abril 30, 2015 - Aceptado octubre 08, 2015

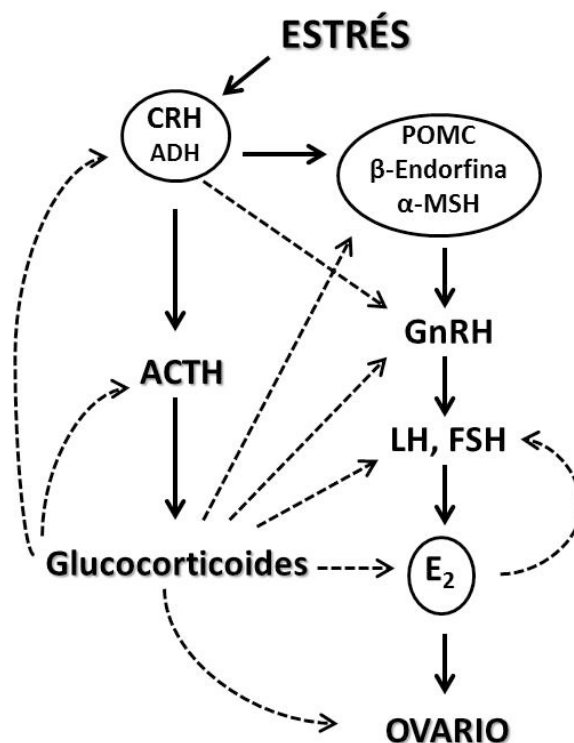
\* **Correspondencia de autor:** Hugo H. Ortega. Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET Litoral, UNL-CONICET) Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL. R.P. Kreder 2805 (CP 3080). Esperanza, Santa Fe, Argentina. e-mail: [hortega@fcv.unl.edu.ar](mailto:hortega@fcv.unl.edu.ar)

## INTRODUCCIÓN

Los procesos fisiológicos normales se mantienen gracias a un equilibrio dinámico y complejo, homeostasis, el cual es desafiado permanentemente por factores estresores. Estos factores actúan interna o externamente sobre el organismo induciendo un esfuerzo adicional para mantener un estado de equilibrio con su medio interno y también con el ambiente externo. Cuando dichos estresores alteran la homeostasis provocan una respuesta conocida como estrés, caracterizada por la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (1, 2). Ante situaciones de estrés, el organismo de la mayoría de los mamíferos reacciona activando una serie de mecanismos fisiológicos y conductuales, y cuando dichos mecanismos resultan inadecuados (por prolongados o excesivos) se pueden presentar consecuencias negativas sobre las funciones fisiológicas importantes como por ejemplo la reproducción (2-5).

Se sabe que una de las causas iniciales que contribuyen a la patología de los principales trastornos reproductivos de las vacas lecheras, como son la Enfermedad Quística Ovárica (COD) y el Síndrome de Vaca Repetidora, es una falla en el mecanismo normal de ovulación, que lleva a su ausencia o a una falta de coordinación en los diferentes componentes del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal involucrados. En este sentido, es importante destacar que la ovulación ha sido descrita por diversos autores como un proceso inflamatorio localizado, donde una sucesión de eventos lleva a la degradación proteolítica de un punto específico de la pared folicular para permitir la salida del ovocito (6, 7). Por lo tanto, el cortisol, un glucocorticoide activo liberado en respuesta al estrés, podría inhibir la ovulación debido a sus acciones locales como un agente antiinflamatorio en el sitio de la ovulación (8) (Fig. 1). En

este sentido, se ha postulado que el estrés inducido por el ambiente o manejo inadecuado es un factor predisponente muy importante para estas enfermedades reproductivas (8).



**Figura 1:** Interacciones del sistema reproductivo con el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. El estrés generalmente inhibe el sistema reproductivo femenino principalmente a través del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (izquierda) a través de 1) la supresión de la hormona liberadora de gonadotropina hipotálamica (GnRH) por la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la β-endorfina inducida por CRH; 2) la inhibición de GnRH, la hormona luteinizante hipofisaria (LH) y la secreción ovárica de estradiol (E<sub>2</sub>) por cortisol; y 3) la resistencia del ovario inducida por cortisol al estradiol. Adaptado de Chrousos *et al.* (3). Línea sólida: estimulación, línea punteada: inhibición.

## Efectos del estrés sobre la reproducción

Para lograr que el pico de LH se produzca en el momento adecuado, una serie de eventos, ajustadamente controlados deben ocurrir en el hipotálamo y la hipófisis. Una vez removida la actividad inhibitoria de la progesterona durante la luteólisis, se incrementa la frecuencia y amplitud de los pulsos de la hormona libe-

radora de gonadotropina (GnRH), para culminar con el pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH) en respuesta al efecto de retroalimentación positiva del estradiol sobre el eje hipotálamo-hipofisario.

En respuesta a diversos factores estresores, como por ejemplo el estrés calórico, el transporte, el manejo reproductivo y el tratamiento exógeno con hormonas, el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO) puede ser inhibido en todos sus niveles por los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA). A nivel del hipotálamo, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) suprime la secreción de GnRH, ya sea directa o indirectamente, a través de su acción mediada por las neuronas secretoras de péptidos de proopiomelanocortina (POMC) (2, 9). La hormona adrenocorticotrópica (ACTH) estimula la liberación de cortisol y progesterona. Esta última actúa inhibiendo la liberación de la GnRH en el hipotálamo, mientras que el cortisol inhibe la liberación de GnRH, alterando la respuesta de los gonadotropos (hipófisis) a la acción de la GnRH. Además, el cortisol ejerce un efecto inhibitorio directo en el ovario sobre la secreción de estradiol (Fig. 1) y sobre el contenido de receptores de la LH. Consecuentemente falla el mecanismo de retroalimentación positiva de estrógenos, suprimiendo el pico preovulatorio de la LH, bloqueando la ovulación, con la consiguiente persistencia del folículo dominante y el desarrollo de quistes foliculares (10, 11). A esto deben sumarse acciones locales de las enzimas 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas (11 $\beta$ HSDs), relacionadas con el metabolismo de los glucocorticoides (GC), que interferirían en la ovulación (12) dado que la pared folicular bovina es capaz de responder *in vitro* a la ACTH con cambios en la secreción de esteroides, incluyendo una mayor liberación de cortisol (13).

Dentro de los factores involucrados, se ha demostrado que el transporte de los animales (considerado un estresor agudo) produce un incremento en la presentación de ovulaciones silenciosas en ovejas, prolongando el ciclo estral y provocando alteraciones ováricas (14). En particular, se ha comprobado que el transporte de 4 horas interrumpe el pico de LH durante la fase folicular en ovejas (15) y en vacas (16), al interferir con su secreción pulsátil y la producción folicular de estradiol.

El estrés calórico retrasa el desarrollo folicular y la ovulación, lo cual puede estar relacionado con el efecto inhibitorio directo de los GC sobre la secreción de esteroides gonadales y la sensibilidad del tejido diana a estos esteroides sexuales (17). Con relación al patrón de secreción de la LH en vacas con estrés por calor, se han reportado disminuciones en su amplitud (18) y en la frecuencia de los pulsos y cambios en las concentraciones basales de la LH (19).

En bovinos se ha encontrado una reducción de la tasa de gestaciones cuando la inseminación artificial se realiza a animales incorporados a un nuevo lote de animales o lugar de alojamiento, en contraste con lo observado después de un proceso de adaptación a dicho manejo (4, 20).

En algunas situaciones, como ocurre durante el estrés crónico debido a laminitis o fiebre, la frecuencia pulsátil de GnRH/LH puede ser más lenta, de modo tal que el desarrollo folicular comienza, pero no puede continuar a estadios avanzados donde se necesita una mayor frecuencia de liberación. De esta manera, el animal no es capaz de desarrollar ciclos estrales normales y se produce anestro. Esta situación ha sido descrita en animales expuestos a luz permanente durante más de 10 semanas (21).

En otros casos, la frecuencia del pulso de GnRH/LH

puede ser suficiente para soportar el desarrollo folicular pero con alteraciones en la liberación de GnRH o la sensibilidad de la hipófisis al estradiol. De esta forma, se genera una liberación inadecuada de LH, incapaz de producir ovulación y luteinización, ocasionando la persistencia folicular y el desarrollo de quistes foliculares (22).

El tratamiento de bovinos con ACTH exógena retrasa el desarrollo folicular e inhibe la secreción de LH (23), mientras que en cerdas durante el proestro prolonga la duración del ciclo y promueve la formación de quistes foliculares luteinizados (24). Además, la ACTH ocasiona en bovinos cambios en las concentraciones séricas de las hormonas esteroides, con un aumento en las concentraciones de estradiol, progesterona y cortisol, comparadas con las concentraciones séricas de animales controles (25). Por otro lado, la concentración aumentada de cortisol en el líquido folicular de los animales tratados con ACTH sugiere la existencia de un mecanismo que regula la concentración intrafolicular de cortisol y una acción directa de la ACTH sobre los folículos ováricos (25). En vacas, estudios *in vitro* han confirmado que el cortisol afecta negativamente la función folicular, especialmente a nivel de las células de la teca, inhibiendo la producción de andrógenos (26). El cortisol inhibe la secreción de estradiol por las células de la granulosa bovinas y porcinas *in vitro*, al tiempo que reduce el número de receptores de LH (10, 27).

### Mecanismos de respuesta al estrés

Generalmente, un estresor activa dos sistemas neuroendocrinos de protección, que son los encargados de mediar en forma bidireccional las adaptaciones de los organismos a situaciones potencialmente peligrosas.

Uno de ellos es el eje HHA en el cual el núcleo paraventricular del hipotálamo sintetiza y secreta CRH y hormona antidiurética (ADH). Estos neuropéptidos son secretados dentro del sistema porta hipofisario para estimular la producción de péptidos derivados de la POMC, ACTH,  $\beta$ -endorfinas y hormonas estimulantes de melanocitos (MSH), en la *pars distalis* de la adenohipófisis. La ACTH actúa sobre la corteza de las glándulas adrenales para estimular la síntesis y secreción de GC (28, 29), lo cual induce una retroalimentación negativa del sistema e inhibe la secreción de hormonas desde el hipotálamo y la hipófisis. Esto reduce la secreción de CRH y la ADH, y también reduce directamente la secreción de POMC en ACTH y  $\beta$ -endorfinas (28).

El segundo sistema es el simpático-adrenérgico: la estimulación de este sistema implica la activación de los núcleos del tronco cerebral, el nervio vagal y la médula adrenal. La adrenalina y noradrenalina se producen en la médula adrenal a través de la estimulación simpática y los efectos locales del cortisol. Estas hormonas producen una retroalimentación positiva a nivel de la hipófisis e incrementan de esa manera la transformación de la POMC en ACTH y  $\beta$ -endorfinas (28).

La secreción de esteroides ováricos, la maduración folicular y la ciclicidad estral están reguladas por el sistema nervioso simpático en conjunto con el sistema endocrino. En este sentido, durante el estrés crónico (debido a la alta producción láctea, la sobrealimentación, etc.) ocurre la activación del sistema simpático, lo cual causa una exposición crónica de las vacas a bajas concentraciones de catecolaminas, con la consiguiente alteración de la actividad reproductiva (30, 31, 32). Se ha demostrado que la inducción de quistes foliculares en ratas está precedida por una hiperactivación de las neuronas simpáticas que inervan al ovario y que la

sección del nervio ovárico superior recupera la ciclicidad estral y normaliza la respuesta a gonadotropinas (33, 34). Además, la administración de un agonista  $\beta$ -adrenérgico es capaz de desarrollar enfermedad quística ovárica (COD) en ratas, efecto que es revertido al administrar el antagonista  $\beta$ -adrenérgico propranolol (35). En el ovario bovino, se ha descrito que la pared de los quistes foliculares presenta una mayor liberación basal de noradrenalina y que se observa una mayor concentración de ésta en el líquido folicular, lo que se relaciona con una mayor secreción de testosterona en estas estructuras ováricas (36, 37).

### Receptores de Melanocortinas

Como ya mencionamos, la ACTH y las MSH  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ - MSH) son hormonas derivadas del procesamiento post-traducciona l de la molécula precursora POMC (38). Estos productos, en conjunto, se llaman péptidos de melanocortinas. La principal fuente de melanocortinas es la glándula pituitaria, pero el gen POMC además es expresado en algunas regiones del cerebro como así también en tejidos periféricos, particularmente la piel (39).

Las melanocortinas naturales y sintéticas actúan por unión a receptores específicos en la superficie celular denominados receptores de melanocortinas (MCRs)

(38, 40). En la actualidad se han caracterizado 5 receptores (MC1R-MC5R), los cuales pertenecen a la familia de receptores unidos a proteína G que median el señalamiento de los péptidos derivados de la POMC (ACTH y MSH), y se encuentran ampliamente distribuidos en una gran variedad de tejidos donde cumplen diferentes funciones (40-43) (Tabla 1). Los MCRs han sido clonados y se denominan MC1R, MC2R, MC3R, MC4R y MC5R. Todos ellos median sus efectos primariamente por activación del camino de señalización dependiente del adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (38). La interacción entre las melanocortinas y la reproducción ha sido claramente establecida, en diferentes procesos relacionados con el metabolismo, el estrés, la inmunidad y los caminos de señalamiento neuroendocrinos (39, 44). Varios de estos receptores han sido estudiados en bovinos (45), y recientemente se ha demostrado la expresión y localización los cinco MCRs en diferentes componentes del ovario bovino (13).

### MC2R y su interacción con ACTH

El MC2R, receptor específico para ACTH, se expresa principalmente en la corteza adrenal donde media los efectos de ACTH sobre la secreción de esteroides (46). La unión de ACTH al MC2R da lugar a un incremento del AMPc y a la activación de la proteína quinasa A, desen-

Receptor	Principales sitios de expresión	Funciones fisiológicas
MC1R	Melanocitos, macrófagos	Pigmentación, inflamación
MC2R	Corteza adrenal	Esteroidogénesis adrenal
MC3R	Sistema nervioso central (SNC), tracto gastrointestinal, hígado	Homeostasis energética, inflamación
MC4R	SNC, cordón espinal	Homeostasis energética, regulación del apetito, función eréctil
MC5R	Linfocitos, células exocrinas	Función exocrina, regulación de glándulas sebáceas

**Tabla 1:** Miembros de la familia del receptor de melanocortina, expresión y acción. Adaptada de Ramachandrapa *et al.* (43).

cadena de señalización interna que es esencial para la expresión de las enzimas esteroidogénicas y la producción de cortisol (47). El MC2R se expresa en todas las zonas de la corteza adrenal, pero la ACTH actúa principalmente en la zona fasciculada estimulando la secreción de cortisol (48). La acción de la ACTH sobre las células de la zona reticulada estimula la producción de andrógenos adrenales (49).

Se ha demostrado que el MC2R se localiza en el retículo endoplasmático (RE) y que una proteína accesoria, denominada proteína accesoria del MC2R (MRAP) es esencial para la conducción del MC2R a la superficie celular y su función (50). Se ha propuesto que MRAP forma un homodímero antiparalelo en el RE y que éste interactúa con MC2R, contribuyendo al correcto plegado del receptor. Luego de una modificación post-traducciona en el RE y aparato de Golgi, la estructura heterotrimérica es conducida a la superficie celular, donde es capaz de reconocer y responder a ACTH (51).

El efecto intraovárico de la ACTH ha sido demostrado en peces, donde esta hormona suprime la producción de gonadotropinas estimulada por estradiol en los folículos ováricos, y la expresión del MC2R demostrada en ovarios y testículos sugieren un rol para ACTH en la regulación de la función gonadal a través de los MCRs (52). Por otro lado, se ha demostrado que la ACTH modula directamente la funcionalidad ovárica en conejos por medio de la sobre regulación de la síntesis de progesterona lútea *in vitro* y a través de una estimulación/inhibición dependiente del tiempo del cuerpo lúteo (CL) *in vivo*. (53). La ACTH estimula, en las células adrenales de mamíferos (excepto en roedores), vía la cascada de señales que implican al AMPc y la proteína quinasa A, la expresión de la enzima CYP17A1, la cual es necesaria para 17 $\alpha$ -hidroxilación de pregnenolona y

progesterona en la biosíntesis de cortisol y andrógenos adrenales (54). La secreción aumentada de cortisol observada en el medio de cultivo obtenido luego del estímulo con ACTH de muestras de pared folicular de ovarios bovinos, podría deberse a la presencia del MC2R en las células de la teca, necesarios para que dicha hormona cumpla su función (13). Estos resultados sumados al hecho que la ACTH es capaz de estimular la secreción de esteroides en el ovario tanto *in vivo* como *in vitro* y que los folículos ováricos pueden estar expuestos a altas concentraciones de GC activos en presencia de la ACTH (25), sugieren que esta hormona, a través de su efecto estimulante sobre la secreción de esteroides, podría estar directamente implicada, a través de sus receptores, en los mecanismos regulatorios de la función ovárica asociados con la ovulación, la esteroidogénesis y la patogénesis de la COD.

#### Los Glucocorticoides y su acción a nivel ovárico

Los GC endógenos, hormonas inducidas por estrés, son sintetizados bajo el control del eje HHA. En respuesta a una gran variedad de estresores, la CRH hipotalámica estimula la liberación de ACTH desde la hipófisis, y ésta induce la síntesis de GC en las células de la zona fasciculada de la corteza adrenal. Los GC son esenciales para la función fisiológica normal debido a sus efectos regulatorios sobre el almacenamiento de glucosa, el metabolismo de lípidos y proteínas, el desarrollo, la diferenciación celular, la respuesta inmune y la reproducción (55).

Los GC actúan en el ovario y otros tejidos del sistema reproductivo bovino. En particular en el ovario, donde se ha demostrado la expresión del GR (56, 57, 58), regulan directamente la acción de las gonadotropinas y la biosíntesis esteroide (10, 59, 60, 61). Por otro lado, el

cortisol modula la función del CL, influyendo en la secreción de progesterona (62), y es responsable del mantenimiento del CL durante la preñez temprana en el bovino (62, 63).

Se ha demostrado en estudios *in vitro* que la acción del cortisol sobre las células de la granulosa bovina aumenta la producción de oxitocina (64) y la síntesis de progesterona (10), mientras que estímulos *in vitro* con la hormona folículo estimulante (FSH) incrementa la producción de andrógenos en cultivos de células de la teca (10, 26). Además, se ha demostrado que los corticoides suprimen la actividad de la enzima aromatasa CYP19A1 y disminuyen el número de receptores de LH en ratas (65, 66), vacas (10) y cerdas (67). En el ovario humano, el cortisol aumenta su concentración en el líquido folicular luego del pico preovulatorio de LH en los folículos ovulatorios (68). Como la ovulación es un evento inflamatorio caracterizado por un incremento en la síntesis de citoquinas y prostaglandinas, el aumento de los GC anti-inflamatorios alrededor del periodo ovulatorio puede representar un mecanismo fisiológico para limitar el daño causado por la ovulación (69). En este sentido, el entorno de GC en la pared folicular se ajusta a nivel local en los folículos ovulatorios bovinos. Este mecanismo de defensa puede proteger a los folículos de los efectos adversos de los GC, previniendo el exceso de reacciones inflamatorias asociadas con la ovulación por un incremento temporal de las concentraciones locales de los GC, constituyendo de esta manera una parte integral del mecanismo regulatorio de la fisiología ovárica (60).

### Enzimas 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas

Los GC no son producidos *de novo* en el ovario, y las acciones de estas hormonas son reguladas a nivel ová-

rico por la expresión relativa de dos enzimas 11 $\beta$ HSDs: una 11 $\beta$ HSD tipo 1 (11 $\beta$ HSD1) bi-direccional que principalmente activa GC transformando cortisona en cortisol en bovinos y humanos, y 11-dihidrocorticosterona en corticosterona en roedores; y una 11 $\beta$ HSD tipo 2 (11 $\beta$ HSD2) que inactiva cortisol transformándolo en cortisona (70) (Fig. 2).

Las enzimas 11 $\beta$ HSD1 y 11 $\beta$ HSD2 han sido clonadas y son productos de distintos genes (71). Aunque ambas tienen sitios activos similares, con una triada catalítica que comprende tirosina, serina y lisina (72), la 11 $\beta$ HSD1 actúa como un dímero o tetrámero mientras que la 11 $\beta$ HSD2 parece ser sólo activa en su forma monomérica. La isoforma 11 $\beta$ HSD2 tiene un requerimiento absoluto de la forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) como un cofactor enzimático, mientras que 11 $\beta$ HSD1 utiliza preferentemente nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP<sup>+</sup>/NADPH).

La isoforma 11 $\beta$ HSD1 fue aislada originalmente de hígado (73), donde actúa como una reductasa dependiente de NADPH para generar GC activos a partir de 11-cetoesteroides inertes. Luego del clonado de 11 $\beta$ HSD1 (74, 75), esta isoforma mostró estar ampliamente expresada, co-localizada con receptores de glucocorticoides (GR) (76, 77). Sobre las bases de este patrón de expresión, se acepta que el rol principal de 11 $\beta$ HSD1 es generar cortisol o corticosterona para la activación máxima de los GR (77). Sin embargo, mientras que 11 $\beta$ HSD1 actúa predominantemente como una reductasa en células intactas, esta enzima es inherentemente bidireccional; en células provistas con NADP<sup>+</sup>, 11 $\beta$ HSD1 puede inactivar GC, aunque con baja afinidad (74, 78). Así, la dirección predominante de la reacción catalizada por 11 $\beta$ HSD1 depende del estado redox de NADPH en una célula en particular. En células

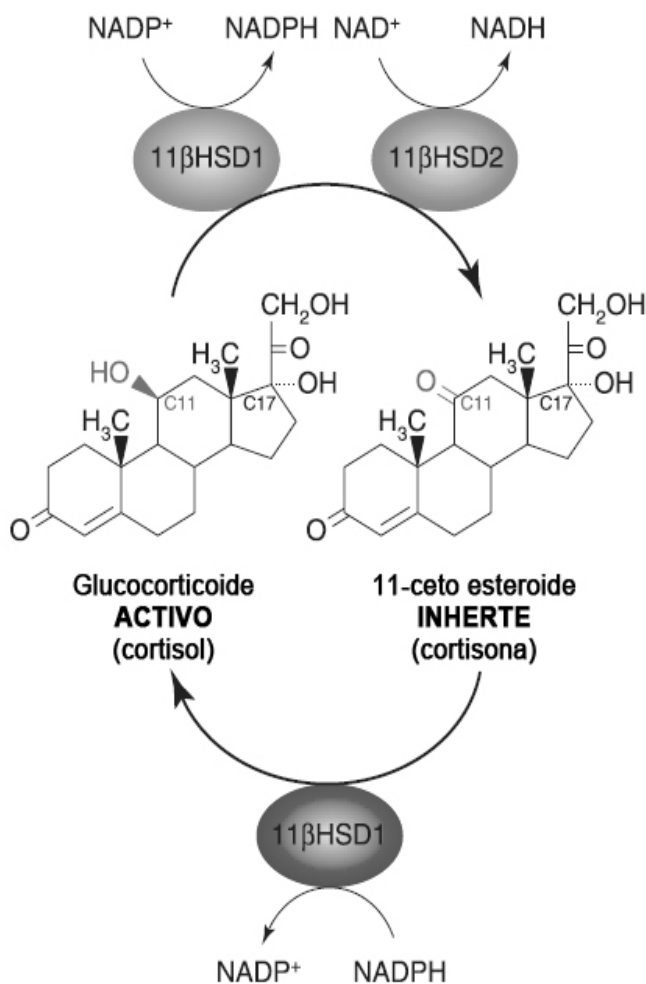
hepáticas, con un abundante abastecimiento de glucosa y una vía pentosa fosfato activa, más NADP<sup>+</sup> estaría en forma reducida, favoreciendo la actividad reductasa cetoesteroide NADPH dependiente de 11βHSD1. Sin embargo, en las células esteroideogénicas de testículo, ovario y placenta, la actividad de las enzimas citocromo P450 NADPH dependientes, requeridas para la síntesis de esteroides, favorecen la oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup>, promoviendo la actividad oxidativa de 11βHSD1 (71).

### Expresión de las isoformas 11βHSD en el ovario bovino

Las isoformas de la enzima 11βHSD han sido estudiadas en las diferentes estructuras ováricas de varias especies. En el ovario de la mujer, la 11βHSD2 ha sido localizada en las células de la teca, presentando baja actividad en los folículos inmaduros; la expresión de esta enzima es altamente dependiente del fenotipo funcional y la diferenciación de las células (79, 80).

En mujeres y ratas, las células de la granulosa de los folículos preovulatorios expresan exclusivamente 11βHSD2 con un cambio en la ovulación hacia la expresión de 11βHSD1 en las células de la granulosa luteinizadas y el CL (81-84). Además, la única isoforma detectada en el CL de la rata es la 11βHSD1 (71). Esta transición desde la expresión de 11βHSD2 en las células foliculares de la granulosa hacia la expresión de 11βHSD1 en las células granulosas luteinizadas es acompañada por un cambio en la expresión del receptor de mineralcorticoides hacia la expresión del GR en las células luteinizadas, lo cual puede proteger la maduración de los folículos de los efectos supresores de los GC (83, 85). A estas investigaciones debe sumarse el hecho que ambas isoformas de 11βHSD se co-expresan en células de la granulosa y CL del ovario bovino (86).

Se han determinado las bases moleculares de la transición de 11βHSD2 a 11βHSD1 durante la luteinización, concluyendo que la sobreexpresión de 11βHSD1 en el momento de la ovulación es inducida por las gonadotropinas (71). Como la ovulación es un evento inflamatorio, caracterizado por un incremento en la síntesis de interleuquinas y prostaglandinas (87), la generación incrementada de GC anti-inflamatorios por la actividad reductasa de 11βHSD1 en el momento de la ovulación, podría representar un mecanismo fisiológico para



**Figura 2:** Interconversión de cortisol y cortisona por oxidación o reducción enzimática en la posición del carbono 11 (C11), catalizada por las isoformas de 11β-hidroxisteroide deshidrogenasa (11βHSD). Adaptado de Michael *et al.* (71).



limitar el proceso inflamatorio en el ovario (59, 68). En este sentido, se ha demostrado que los GC inhiben la síntesis de prostaglandinas y citoquinas pro-inflamatorias en el ovario (88). Debido a que la expresión de 11 $\beta$ HSD1 es estimulada en las células de la granulosa por la LH y por citoquinas pro-inflamatorias como la interleuquina 1 $\beta$  (89, 90), la síntesis de GC vía 11 $\beta$ HSD1 podría ser incrementada por las gonadotropinas y/o citoquinas, como un aspecto integral de la cascada de la ovulación. Consistente con esta hipótesis, la concentración de cortisol total y libre en el líquido folicular humano se incrementa en respuesta al pico preovulatorio de LH (71, 80). El incremento en el cortisol libre también involucra el desplazamiento competitivo del cortisol desde las globulinas por la alta concentración de progesterona dentro del folículo preovulatorio (59, 91).

Si bien es aceptando el rol de la LH y las interleuquinas en la transición de la expresión de 11 $\beta$ HSD2 hacia 11 $\beta$ HSD1 en la ovulación, este cambio preovulatorio en las isoformas durante la luteinización podría también involucrar la regulación de su expresión a través de las hormonas esteroides. Específicamente, la expresión de 11 $\beta$ HSD2 en la granulosa podría ser dependiente de la síntesis local de estrógenos, mientras que la progesterona podría suprimir la expresión de 11 $\beta$ HSD2 o inducir la expresión de 11 $\beta$ HSD1 en células luteinizadas, existiendo sólidas evidencias a favor de esta teoría (92).

En trabajos realizados en bovinos, Tetsuka *et al.* (57) demostraron que los folículos maduros de ovarios bovinos expresan ARNm codificante para 11 $\beta$ HSD1 y 11 $\beta$ HSD2. La expresión de 11 $\beta$ HSD1 aumenta durante la maduración folicular en células de la granulosa y de la teca interna, mientras que la expresión de 11 $\beta$ HSD2 es muy baja en células de la granulosa y no se modifica

en las células de la teca interna, indicando que 11 $\beta$ HSD1 es la isoforma predominante en folículos bovinos maduros. Por otro lado, FSH parece ser responsable de la sobrerregulación de la expresión génica de 11 $\beta$ HSD1 en células de la granulosa bovinas, como ha sido demostrado *in vitro* en células de la granulosa de rata y humano (80, 83). La expresión de 11 $\beta$ HSD2 no es afectada por FSH, concluyendo que el metabolismo alterado de los GC, asociada con la maduración folicular, está primariamente regulada por 11 $\beta$ HSD1 en respuesta a FSH en células de la granulosa bovinas (57). Además, se ha demostrado que en el CL bovino se co-expresan ambos isotipos, siendo predominante el ARNm para 11 $\beta$ HSD1 en CL activos y el ARNm para 11 $\beta$ HSD2 en CL en regresión (85). Por otro lado, Amweg *et al.* (25) demostraron en estudios *in vitro* que la estimulación con ACTH produjo un incremento en la expresión de 11 $\beta$ HSD1 en folículos antrales y en quistes, y una disminución en la expresión de 11 $\beta$ HSD2 en los quistes, sugiriendo que la ACTH es capaz de inducir cambios en la expresión de estas enzimas en el ovario bovino. Además, indicaron que el aumento en la expresión de 11 $\beta$ HSD1 observada en los folículos quísticos podría asociarse con el incremento en la concentración de cortisol hallado en el medio de cultivo, sugiriendo una importante función regulatoria para esta enzima en la disponibilidad del cortisol a nivel ovárico, y un rol local del cortisol en el crecimiento folicular y/o en la COD (25).

### Receptor de glucocorticoides

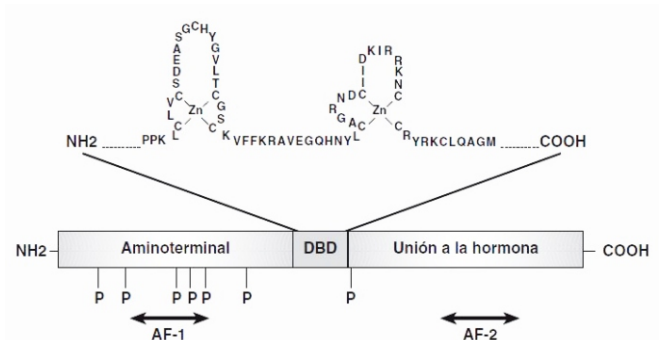
Como se mencionó anteriormente, los GC actúan como reguladores en una gran variedad de procesos biológicos y desempeñan un papel fundamental en la fisiología normal y la respuesta a estrés. Los GC realizan sus acciones biológicas a través de la unión a un receptor

citoplasmático específico: GR (NR3C1) de la familia de los receptores nucleares (93). La disponibilidad de los GC para sus receptores en los tejidos periféricos, está regulada por las enzimas 11 $\beta$ HSD (62, 94).

El GR pertenece a una superfamilia de receptores de hormonas esteroideas que, además, incluye al receptor de mineralcorticoides y a los receptores de la hormona tiroidea, de hormonas sexuales, de ácido retinoico y de vitamina D. Todos estos receptores tienen en común el dominio de unión al ADN, que es una zona central corta, flanqueada por un dominio o extremo N terminal (o amino terminal) variable y un extremo C-terminal (o carboxilo terminal) relativamente variable. El dominio N-terminal contiene la región AF-1 (o independiente de la hormona), que se ha relacionado con la actividad transcripcional y la unión con proteínas coactivadoras y factores transcripcionales. Por otro lado, el extremo C-terminal contiene la región AF-2, que es responsable de la unión a la hormona (95) (Fig. 3).

Una vez sintetizados y secretados, los GC son transportados hasta la superficie celular unidos a las globulinas fijadoras de GC. A continuación, los GC son liberados de la unión a estas globulinas y atraviesan la membrana plasmática. Cuando la hormona se une al GR, éste se libera de sus interacciones con algunas proteínas como las 2 subunidades de proteínas de shock térmico o HSP90, la inmunofilina p59 y la fosfoproteína p23, y esto induce un cambio en la conformación del receptor que tiene como resultado la activación del mismo, lo que permite su translocación al núcleo, donde se une al ADN a través de su dominio central en forma de dímeros. Sin embargo, existen evidencias de que también se producen fenómenos de transporte citoplasmático-nuclear del GR no unido a hormona a través de la señal de localización nuclear (96). La unión del

complejo GC-GR a secuencias específicas de ADN, los elementos de respuesta a GC situados en la región 5' promotora de los genes diana conduce a la inducción o la represión de la transcripción génica (97, 98, 99). De este modo, los GC regulan la expresión del ARNm de moléculas inflamatorias directa o indirectamente a través de la síntesis de proteínas anti-inflamatorias, o más importante, por mecanismos de transrepresión (63, 97, 100, 101).



**Figura 3:** Estructura funcional del receptor de glucocorticoides. La proteína del receptor de glucocorticoides tiene 3 dominios: el aminoterminal, el de unión al ADN (DBD: DNA binding domain) y el carboxiterninal para unión a la hormona. En la zona central se encuentran los 2 anillos de cinc. También se muestran los lugares de fosforilación, así como las zonas de unión independiente del ligando (AF-1) y dependiente del ligando (AF-2) relacionadas con las funciones de activación transcripcional. Adaptado de Cosío *et al.* (95).

### El GR en la reproducción

El GR están presentes en el ovario de varias especies, incluido humano (102), rata (83), oveja (103) y bovino (57, 62). En este sentido, se ha demostrado que las células luteales en la mujer, vaca y rata son sitios potenciales para la acción y el metabolismo de los GC debido a que expresan GR nucleares (56, 83, 102). Además, el cortisol vía el GR reduce la frecuencia de los pulsos de LH y actúa para suprimir la secreción pulsátil de GnRH en la fase folicular del ciclo estral en ovejas (103, 104).

Los GR se expresan conjuntamente con ambas isoformas de la enzima 11 $\beta$ HSD en el CL (56, 85) y en el endo-

metrio bovino (105) a través del ciclo estral y la preñez temprana (62, 63). Se ha demostrado que los ARNm del GR y las enzimas 11 $\beta$ HSDs tienen una mayor expresión en el endometrio de vacas preñadas que en tejidos obtenidos de animales ciclando (63). Estos y otros resultados (106) demuestran que el metabolismo del cortisol y la expresión de los GR pueden ser diferentes dependiendo del estado fisiológico del útero y de la influencia de factores relacionados a la preñez.

En bovinos, Tetsuka *et al.* (57) demostraron que el GR se expresa en todos los estadios del crecimiento y dominancia folicular, como así también en folículos atrésicos tempranos y tardíos, observándose una expresión aumentada del ARNm de las 11 $\beta$ HSD y del GR en los folículos atrésicos. Sin embargo, ni la maduración folicular ni el estímulo hormonal parecen afectar la expresión del ARNm del GR, lo que sugiere que la regulación transcripcional del GR no es parte del mecanismo regulatorio de GC ováricos en bovinos. Por otro lado, Park *et al.* (58) demostraron en ovario de rata que la expresión génica del GR aumenta significativamente en los folículos quísticos inducidos con ACTH en relación a los folículos controles. Estos resultados se relacionan con los obtenidos en bovinos en los cuales la expresión proteica del GR fue significativamente mayor en folículos antrales y quísticos de animales con COD en relación a los folículos antrales controles (107).

## CONCLUSION GENERAL

Los factores estresores podrían afectar directamente las funciones reproductivas, no solo a través del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, sino mediante una acción directa de la ACTH a nivel ovárico. En este sentido, la ACTH, a través de su unión a los MCRs, es capaz de inducir la secreción de esteroides en el ovario tanto *in vivo* como *in vitro*, particularmente la secreción de cortisol, lo que sugiere la existencia de un mecanismo que regula la concentración intrafolicular de este glucocorticoide y una acción directa de la ACTH sobre el ovario bovino. Por otro lado, la ACTH es capaz de inducir la expresión de la enzima 11 $\beta$ HSD1, implicada en la disponibilidad de cortisol, y del GR en los folículos ováricos bovinos. Esto podría asociarse con el incremento en la concentración de cortisol estimulada por la ACTH sugiriendo una importante función regulatoria para la enzima 11 $\beta$ HSD1 en la disponibilidad del cortisol a nivel ovárico, y un rol local del cortisol, a través de la unión a su receptor, en el crecimiento folicular y/o en el desarrollo de la COD. Todo lo expuesto, permite inferir que la ACTH puede estar implicada en los mecanismos regulatorios relacionados a la función ovárica asociados con la ovulación, la esteroidogénesis y la patogénesis de diferentes enfermedades reproductivas en bovinos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Möstl E, Palme R (2002) Hormones as indicators of stress. *Domest Anim Endocrinol* 23: 67-74.
2. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G (2005) Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol* 67: 259-284.
3. Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW (1998) Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med* 129: 229-240.
4. Dobson H, Smith RF (2000) What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim Reprod Sci* 60-61: 743-752.
5. Dobson H, Tebble JE, Smith RF, Ward WR (2001) Is stress really all that important? *Theriogenology* 55: 65-73.
6. Espey LL, Belilinger AS, Healy JA (2004) Chapter 9: Ovulation: An Inflammatory Cascade of Gene Expression. En: *The Ovary*, Leung PCK y Adashi EY (eds). 2nd Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam, Netherlands, pp.145.
7. Richards JS, Liu Z, Shimada M (2008) Immune-like mechanisms in ovulation. *Trends Endocrinol Metabol* 19: 191-196.

8. Vanholder T, Opsomer G, de Kruif A (2006) Etiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod Nutr Dev* 46: 105-119.
9. Rivier C, Rivest S (1991) Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol Reprod* 45: 523-532.
10. Kawate N, Inaba T, Mori J (1993) Effects of cortisol on the amounts of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone secreted and the number of luteinizing hormone receptors in cultured bovine granulosa cells. *Anim Reprod Sci* 32: 15-25.
11. Kawate N, Akiyama M, Suga T, Inaba T, Tamada H, Sawada T, Mori J (2001) Change in concentrations of luteinizing hormone subunit messenger ribonucleic acids in the estrous cycle of beef cattle. *Animal Reprod Sci* 68: 13-21.
12. Thurston LM, Jonas KC, Abayasekara DR, Michael AE (2003a) Ovarian modulators of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ HSD) activity in follicular fluid from bovine and porcine large antral follicles and spontaneous ovarian cysts. *Biol of Reprod* 68: 2157-2163.
13. Amweg AN, Paredes AH, Salvetti NR, Lara HE, Ortega HH (2011) Expression of melanocortin receptors mRNA, and direct effects of ACTH on steroid secretion in the bovine ovary. *Theriogenology* 75: 628-637.
14. Braden A, Moule G (1964) Effects of stress on ovarian morphology and oestrus cycles in ewes. *Aust J Agr Res* 15: 937-949.
15. Dobson H, Tebble JE, Ozturk M, Smith RF (1999) Effect of transport on pulsatile LH release in ovariectomized ewes with or without prior steroid exposure at different times of year. *J Reprod Fertil* 117: 213-222.
16. Nanda AS, Dobson H, Ward WR (1990) Relationship between an increase in plasma cortisol during transport-induced stress and failure of oestradiol to induce a luteinising hormone surge in dairy cows. *Res Vet Sci* 49: 25-28.
17. Lucy MC (2003) Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reprod Suppl* 61: 415-427.
18. Gilad E, Meidan R, Berman A, Graber, Wolfenson D (1993) Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. *J Reprod Fertil* 99: 315-321.
19. Wise ME, Armstrong DV, Huber JT, Hunter R, Wiersma F (1988) Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. *J Dairy Sci* 71: 2480-2485.
20. Smith RF, Ghuman SP, Evans NP, Karsch FJ, Dobson H (2003) Stress and the control of LH secretion in the ewe. *Reprod Suppl* 61: 267-282.
21. Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Müller LA, Taboada AF, Manzini RA, Ortega HH (2007) Valoración de la exposición a luz permanente como modelo de enfermedad quística ovárica (COD) en bovinos. *Rev Med Vet* 87: 223-226.
22. Dobson H, Smith RF (1995) Stress and reproduction in farm animals. *J Reprod Fertil (Suppl)* 49: 451-461.
23. Gabai G, Mollo A, Marinelli L, Badan M, Bono G (2006) Endocrine and ovarian response to prolonged adrenal stimulation at the time of induced corpus luteum regression. *Reprod Domest Anim* 41: 485-493.
24. Lang A, Kaeoket K, Kindahl H, Madej A, Einarsson S (2004) *Reprod Domest Anim* 39: 181-189.
25. Amweg AN, Salvetti NR, Stangaferro ML, Paredes AH, Lara HH, Rodríguez FM, Ortega HH (2013) Ovarian localization of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase (11 $\beta$ HSD): Effects of ACTH stimulation and its relationship with bovine cystic ovarian disease. *Domest Anim Endocrin* 45: 126-140.
26. Spicer LJ, Chamberlain CS (1998) Influence of cortisol on insulin- and insulin-like growth factor 1 (IGF-1)-induced steroid production and on IGF-1 receptors in cultured bovine granulosa cells and thecal cells. *Endocrine* 9: 153-161.
27. Viveiros MM, Liptrap RM (1999) Glucocorticoid influence on porcine granulosa cell IGF-I and steroid hormone production in vitro. *Theriogenology* 51: 1027-1043.
28. Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT (2004) The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol* 25: 132-149.
29. Xing Y, Parker CR, Edwards M, Rainey WE (2010) ACTH is a potent regulator of gene expression in human adrenal cells. *J Mol Endoc* 45: 59-68.
30. Sciorsci RL, Bianchi P, Minoia P (2000) High levels of endorphin and related pathologies of veterinary concern. *Immunophar Immunot* 22: 575-626.
31. D'Ottavio M, Robbe D, Sciorsci RL (2002) Le cisti follicolari nella bovina. *ODV* 6: 13-19.
32. Rizzo A, Campanile D, Mutinati M, Minoia G, Spedicato M, Sciorsci RL (2011) Epidural vs intramuscular administration of leclirelin, a GnRH analogue, for the resolution of follicular cysts in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 126: 19-22.
33. Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR (1993) Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 133: 2690-2695.
34. Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE (1993) Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* 133: 2696-2703.
35. Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, Guimaraes MA, Rosa E, Silva AA, Ramírez VD (2002) Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microsc Res Tech* 59: 495-502.
36. Paredes A, Salvetti NR, Ortega HH, Lara HE (2007) Liberación de Noradrenalina de diferentes estructuras foliculares de ovario de bovino. Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Iquique, Chile. Resumen en actas pp. 67.
37. Paredes AH, Salvetti NR, Diaz AE, Dallard BE, Ortega HH, Lara HE (2011) Sympathetic nerve activity in normal and cystic follicles from isolated bovine ovary: local effect of beta-adrenergic stimulation on steroid secretion. *Reprod Biol Endocrinol* 9: 66.
38. Catania A, Gatti S, Colombo G, Lipton JM (2004) Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol Rev* 56: 1-29.
39. Schiöth HB, Watanabe H (2002) Melanocortins and reproduction. *Brain Res Rev* 38: 340-350.
40. Getting SJ (2006) Targeting melanocortin receptors as potential novel therapeutics. *Pharmacol Therapeut* 111: 1-15.
41. Klovinis J, Haitina T, Ringholm A, Löwgren M, Fridmanis D, Slaidina M, Stier S, Schiöth HB (2004) Cloning of two melanocortin (MC) receptors in spiny dogfish: MC3 receptor in cartilaginous fish shows high affinity to ACTH-derived peptides while it has lower preference to gamma-MSH. *Eur J Biochem* 271: 4320-4331.

42. Cooray SN, Clark AJ (2011) Melanocortin receptors and their accessory proteins. *Mol Cell Endocrinol* 331: 215-221.
43. Ramachandrapa S, Gorrigan RJ, Clark AJ, Chan LF (2013) The melanocortin receptors and their accessory proteins. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 9.
44. Hohmann JG, Teal TH, Clifton DK, Davis J, Hruby VJ, Han G, Steiner RA (2000) Differential role of melanocortins in mediating leptin's central effects on feeding and reproduction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: 50-59.
45. Liakos P, Chambaz EM, Feige JJ, Defaye G (1998) Expresión of ACTH receptors (MC2-R and MC5-R) in the glomerulosa and the fasciculata-reticulares zones of bovine adrenal cortex. *Endocr Res* 24: 427-432.
46. Beuschlein F, Fassnacht M, Klink A, Allolio B, Reincke M (2001) ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation. *Eur J Endocrinol* 144: 199-206.
47. Novoselova TV, Jackson D, Campbell DC, Clark AJ, Chan LF (2013) Melanocortin receptor accessory proteins in adrenal gland physiology and beyond. *J Endocrinol* 217: 1-11.
48. Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD (1992) The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 257: 1248-1251.
49. Weber A, Clark AJ, Perry LA, Honour JW, Savage MO (1997) Diminished adrenal androgen secretion in familial glucocorticoid deficiency implicates a significant role for ACTH in the induction of adrenarche. *Clin Endocrinol* 46: 431-437.
50. Metherell LA, Chapple JP, Cooray S, David A, Becker C, Ruschendorf F, Naville D, Begeot M, Khoo B, Nurnberg P (2005) Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nat Genet* 37: 166-170.
51. Webb TR, Clark AJL (2010) Minireview: The Melanocortin 2 Receptor Accessory Proteins. *Mol Endocrinol* 24: 475-484.
52. Alsop D, Ings JS, Vijayan MM (2009) Adrenocorticotrophic hormone suppresses gonadotropin-stimulated estradiol release from zebrafish ovarian follicles. *PLoS One* 4: e6463.
53. Guelfi G, Zerani M, Brecchia G, Parillo F, Dall'Aglio C, Maranesi M, Boiti C (2011) Direct actions of ACTH on ovarian function of pseudopregnant rabbits. *Mol Cell Endocrinol* 339: 63-71.
54. Sewer MB, Waterman MR (2003) ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc Res Tech* 61: 300-307.
55. Dejager L, Vandevyver S, Petta I, Libert C (2014) Dominance of the strongest: Inflammatory cytokines versus glucocorticoids. *Cytokine Growth FR* 25: 21-33.
56. Komiyama J, Nishimura R, Lee HY, Sakumoto R, Tetsuka M, Acosta TJ, Skarzynski DJ, Okuda K (2008) Cortisol is a suppressor of apoptosis in bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 78: 888-895.
57. Tetsuka M, Nishimoto H, Miyamoto A, Okuda K, Hamano S (2010) Gene expression of 11 $\beta$ -HSD and glucocorticoid receptor in the bovine (*Bos taurus*) follicle during follicular maturation and atresia: the role of follicular stimulating hormone. *J Reprod Dev* 56: 616-622.
58. Park E, Cockrem JF, Han KH, Kim DH, Jung MH, Chu JP. 2012. Stress-induced activation of ovarian heat shock protein 90 in a rat model of polycystic ovary syndrome. *J Obstet Gynaecol Res.* 38: 396-407.
59. Andersen CY (2002) Possible new mechanism of cortisol action in female reproductive organs: physiological implications of the free hormone hypothesis. *J Endocrinol* 173: 211-217.
60. Acosta TJ, Tetsuka M, Matsui M, Shimizu T, Berisha B, Schams D, Miyamoto A (2005) In vivo evidence that local cortisol production increases in the preovulatory follicle of the cow. *J Reprod Dev* 51: 483-489.
61. Sunak N, Green DF, Abeydeera LR, Thurston LM, Michael AE (2007) Implication of cortisol and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in the development of porcine (*Sus scrofa domestica*) ovarian follicles and cysts. *Reproduction* 133: 1149-1158.
62. Duong HT, Piotrowska-Tomala KK, Acosta TJ, Bah MM, Sinderewicz E, Majewska M, Jankowska K, Okuda K, Skarzynski DJ (2012) Effects of cortisol on pregnancy rate and corpus luteum function in heifers: an in vivo study. *J Reprod Dev* 58: 223-230.
63. Majewska M, Lee HY, Tasaki Y, Acosta TJ, Szostek AZ, Siemieniuch M, Okuda K, Skarzynski DJ (2012) Is cortisol a modulator of interferon tau action in the endometrium during early pregnancy in cattle? *J Reprod Immunol* 93: 82-93.
64. Luck MR, Jungclas B (1988) The time-course of oxytocin secretion from cultured bovine granulosa cells, stimulated by ascorbate and catecholamines. *J Endocrinol* 116: 247-258.
65. Hsueh AJ, Erickson GF (1978) Glucocorticoid inhibition of FSH-induced estrogen production in cultured rat granulosa cells. *Steroids* 32: 639-648.
66. Schoonmaker JN, Erickson GF (1983) Glucocorticoid modulation of follicle-stimulating hormone-mediated granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 113: 1356-1363.
67. Danisová A, Sebková E, Kolena J (1987) Effect of corticosteroids on estradiol and testosterone secretion by granulosa cells in culture. *Exp Clin Endocrinol* 89: 165-173.
68. Hillier SG, Tetsuka M (1998) An anti-inflammatory role for glucocorticoids in the ovaries? *J Reprod Immunol* 39: 21-27.
69. Whirlledge S, Cidlowski JA (2013) A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: beyond the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 154: 4450-4468.
70. Krozowski Z, Li KX, Koyama K, Smith RE, Obeyesekere VR, Stein-Oakley A, Sasano H, Coulter C, Cole T, Sheppard KE (1999) The type I and type II 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69: 391-401.
71. Michael AE, Thurston LM, Rae MT (2003) Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. *Reproduction* 126: 425-441.
72. Penning TM (1997) Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocrine Rev* 18: 281-305.
73. Lakshmi V, Monder C (1988) Purification and characterization of the corticosteroid 11-dehydrogenase component of the rat liver 11-hydroxysteroid dehydrogenase complex. *Endocrinology* 123: 2390-2398.
74. Agarwal AK, Monder C, Eckstein B, White PC (1989) Cloning and expression of rat cDNA encoding corticosteroid 11-dehydrogenase. *J Biol Chem* 264: 18939-18943.
75. Tannin GM, Agarwal AK, Monder C, New MI, White PC (1991) The human gene for 11-hydroxysteroid dehydrogenase. Structure, tissue distribution and chromosomal localization. *J Biol Chem* 266:16653-16658.

76. Whorwood CB, Franklyn JA, Sheppard MC, Stewart PM (1992) Tissue localization of 11-hydroxysteroid dehydrogenase and its relationship to the glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41: 21-28.
77. Seckl JR, Walker BR (2001) 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1—a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology* 142: 1371-1376.
78. Lakshmi V, Monder C (1988) Purification and characterization of the corticosteroid 11-dehydrogenase component of the rat liver 11-hydroxysteroid dehydrogenase complex. *Endocrinology* 123: 2390-2398.
79. Ricketts ML, Verhaeg JM, Bujalska I, Howie AJ, Rainey WE, Stewart PM (1998) Immunohistochemical localisation of type 1 11-hydroxysteroid dehydrogenase in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1325-1335.
80. Yong PYK, Thing KJ, Andrew R, Walker BR, Hillier SG (2000) Development-related increase in cortisol biosynthesis by human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4728-4733.
81. Michael AE, Evagelatos M, Norgate DP, Clarke RJ, Antoniw JW, Stedman BA, Brennan A, Welsby R, Bujalska I, Stewart PM, Cooke BA (1997) Isoforms of 11-hydroxysteroid dehydrogenase in human granulosa-lutein cells. *Mol Cell Endocrinol* 132: 43-52.
82. Tetsuka M, Thomas FJ, Thomas MJ, Anderson RA, Mason JL, Hillier SG (1997) Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 2006-2009.
83. Tetsuka M, Milne M, Simpson GE, Hillier SG (1999a) Expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, glucocorticoid receptor, and mineralocorticoid receptor genes in rat ovary. *Biol Reprod* 60: 330-335.
84. Thurston LM, Chin E, Jonas KC, Abayasekara DRE, Michael AE (2003b) Expression of 11-hydroxysteroid dehydrogenase (11HSD) proteins in luteinizing human granulosa-lutein cells. *J Endocrinol* 178: 127-135.
85. Tetsuka M, Yamamoto S, Hayashida N, Hayashi KG, Hayashi M, Acosta TJ, Miyamoto A (2003) Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases in bovine follicle and corpus luteum. *J Endocrinol* 177: 445-452.
86. Thurston LM, Abayasekara DRE, Michael AE (2007) 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase expression and activities in bovine granulosa cells and corpora lutea implicate corticosteroids in bovine ovarian physiology. *J Endocrinol* 193: 299-310.
87. Ando M, Kol S, Kokia E, Ruutiainen-Altman K, Sirois J, Rohan RM, Payne DW, Adashi EY (1998) Rat ovarian prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2: periovulatory expression of granulosa cell-based interleukin-1 dependent enzymes. *Endocrinology* 139: 2501-2508.
88. Telleria CM, Ou J, Sugino N, Ferguson S, Gibori G (1998) The expression of interleukin-6 in the pregnant rat corpus luteum and its regulation by progesterone and glucocorticoid. *Endocrinology* 139: 3597-3605.
89. Evagelatos M, Peterson SL, Cooke BA (1997) Leukocytes modulate 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ HSD) activity in human granulosa lutein cell cultures. *Mol Cell Endocrinol* 133: 81-88.
90. Tetsuka M, Haines LC, Milne M, Simpson GE, Hillier SG (1999b) Regulation of 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene expression by LH and interleukin-1 in cultured rat granulosa cells. *J Endocrinol* 163: 417-423.
91. Andersen CY, Hornnes P (1994) Intrafollicular concentrations of free cortisol close to follicular rupture. *Hum Reprod* 9: 1944-1949.
92. Waddel BJ, Benediktsson R, Seckl JR (1996) 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the rat corpus luteum: induction of messenger ribonucleic acid expression and bioactivity coincident with luteal regression. *Endocrinology* 137: 5386-5391.
93. Nicolaidis NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E (2010) The Human Glucocorticoid Receptor: Molecular Basis of Biologic Function. *Steroids* 75: 1-12.
94. Divari S, Cannizzo FT, Uslenghi F, Pregel P, Mulasso C, Spada F, De Maria R, Biolatti B (2011) Corticosteroid hormone receptors and prereceptors as new biomarkers of the illegal use of glucocorticoids in meat production. *J Agric Food Chem* 59: 2120-2125.
95. Cosío BG, Torrego A, Adcock IM (2005) Mecanismos moleculares de los glucocorticoides. *Arch Bronconeumol* 41: 34-41.
96. Reichardt HM, Tuckermann JP, Gottlicher M, Vujic M, Weih F, Angel P, Herrlich P, Schütz G (2001) Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 20: 7168-7173.
97. Lu NZ, Cidlowski JA (2006) Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol* 16: 301-307.
98. Kino T, Charmandari E, Chrousos (2011) Glucocorticoid receptor: implications for rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol* 29: 32-41.
99. Torres Uchoa E, Aguilera G, Herman JP, Fiedler JL, Deak T, de Sousa MB (2014) Novel aspects of glucocorticoid actions. *Journal of Neuroendocrinology* 26: 557-572.
100. Adcock IM (2000) Molecular Mechanisms of Glucocorticosteroid Actions. *Pulm Pharmacol Ther* 13: 115-126.
101. Barnes PJ (2006) Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur Respir J* 27: 413-426.
102. Myers M, Lamont MC, van den Driesche S, Mary N, Thong KJ, Hillier SG, Duncan WC (2007) Role of luteal glucocorticoid metabolism during maternal recognition of pregnancy in women. *Endocrinology* 148: 5769-5779.
103. Breen KM, Billings HJ, Wagenmaker ER, Wessinger EW, Karsch FJ (2005) Endocrine basis for disruptive effects of cortisol on preovulatory events. *Endocrinology* 146: 2107-2115.
104. Breen KM, Davis TL, Doro LC, Nett TM, Oakley AE, Padmanabhan V, Rispoli LA, Wagenmaker ER, Karsch FJ (2008) Insight into the Neuroendocrine Site and Cellular Mechanism by which Cortisol Suppresses Pituitary Responsiveness to Gonadotropin-Releasing Hormone. *Endocrinology* 149: 767-773.
105. Lee HY, Acosta TJ, Tanikawa M, Sakumoto R, Komiyama J, Tasaki Y, Piskula M, Skarzynski DJ, Tetsuka M, Okuda K (2007) The role of glucocorticoid in the regulation of prostaglandin biosynthesis in non-pregnant bovine endometrium. *J Endocrinol* 193: 127-135.
106. Simmons RM, Satterfield MC, Welsh Jr. TH, Bazer FW, Spencer TE (2010) HSD11B1, HSD11B2, PTGS2, and NR3C1 expression in the periimplantation ovine uterus: effects of pregnancy, progesterone, and interferon tau. *Biol Reprod* 82: 35-43.
107. Amweg AN (2014) Expresión y actividad de elementos de respuesta a estrés en el ovario y su implicancia en la patogenia de la enfermedad quística ovárica. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral. Argentina.