

Alicia Izquierdo Pascual

*"ESTEROIDES PLASMATICOS Y SUS POSIBLES RITMOS BIOLOGICOS
EN EL SEMENTAL DE PURA RAZA ESPAÑOLA"*

Departamento de Fisiología Animal
Departamento de Patología Animal II
Universidad Complutense de Madrid
1996

"ESTEROIDES PLASMATICOS Y SUS
POSIBLES RITMOS BIOLOGICOS EN EL
SEMENTAL DE PURA RAZA ESPAÑOLA"

MEMORIA que para la colación
del grado de Doctor, presenta
la Licenciada en Veterinaria
Dña. Alicia Izquierdo Pascual

ESTA TESIS HA SIDO REALIZADA BAJO
LA DIRECCION DE:



Prof. Dr. D. Juan Carlos Illera del Portal.

Prof. Dr. D. Jose Félix Pérez



Licenciada Dña. Alicia Izquierdo
Pascual, aspirante al grado de Doctor
en Veterinaria.



Madrid, Marzo, 1996

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de tanto tiempo han tenido oportunidad de ayudarme tantos amigos que espero no olvidarme de nadie, y si así fuera, que no me lo tuvieran en cuenta. Quiero agradecer a todas las personas que me han prestado su apoyo, que no son pocas, y me han dado ánimos para poder llevar a cabo esta Tesis:

- A mis directores de Tesis, Juan Carlos Illera del Portal, Prof. Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la UCM, por el tiempo que me ha dedicado y que me ha "soportado" cuando las cosas no salían como yo quería; y a Jose Félix Pérez Gutiérrez, Prof. Titular del Departamento de Patología Animal II, que fue quien me facilitó el camino para poder realizar este trabajo.
- Al Prof. Dr. D. Mariano Illera Martín, Catedrático Director del Departamento de Fisiología Animal, por haber puesto a mi alcance los medios necesarios para llevar a cabo esta "empresa".
- A Prof^a. Dra. D^a. Ana Portela Arteaga, que con sus profundos conocimientos sobre Cronofisiología, me ha aclarado una gran cantidad de dudas.
- Quiero darles las gracias a May (quien me enseñó a hacer placas), Gema, Blassi, Pedro, M^a del Mar y Luis, por madrugar conmigo y ayudarme en el trabajo de laboratorio; así como a M^a José por prestarme el ordenador y resolver mis dudas de ortografía.
- A José Nicolás Chicote (Veterinario) a quien faltó tiempo para buscar animales para mi estudio; de igual forma que, a la familia Gil (Finca Valdeolivas) por prestar tan maravillosos ejemplares para la realización de esta Tesis.
- A mis compañeras Concepción García Botey, Prof^a. Titular del Departamento de Patología Animal II y a Ana M^a Mayenco Aguirre, Prof^a. Asociada del mismo, por quienes empecé en este camino tan sufrido de la investigación.

- Por último, aunque no menos importante, a mi familia: David, que aunque no tiene la licenciatura en Veterinaria, es casi un experto en el trabajo de campo y de laboratorio; y mis padres y hermanos, a los que también les ha tocado trabajar en esto.

INDICE

INDICE

OBJETIVO.....	2 - 3
----------------------	--------------

INTRODUCCIÓN.....	4 -28
--------------------------	--------------

FISIOLOGIA DEL TESTICULO

ESTEROIDOGENESIS EN EL TESTICULO

ESTEROIDOGENESIS EN LA CORTEZA ADRENAL

CRONOBIOLOGIA: RITMOS BIOLOGICOS

MATERIAL Y METODOS.....	30 - 46
--------------------------------	----------------

ANIMALES

TOMA DE MUESTRAS

DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES HORMONALES

VALIDACION DE LA TÉCNICA

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

RESULTADOS.....	48 - 76
------------------------	----------------

DILUCIONES OPTIMAS DE ANTICUERPO

DILUCIONES OPTIMAS DE CONJUGADO

VALIDACION DEL EIA DE COMPETICION PARA LAS HORMONAS
ESTEROIDES (TESTOSTERONA, 17 β -ESTRADIOL Y CORTISOL)

CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE TESTOSTERONA, 17 β -
ESTRADIOL Y CORTISOL A LO LARGO DEL AÑO

CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE TESTOSTERONA, 17 β -
ESTRADIOL Y CORTISOL A LO LARGO DE LA SEMANA

CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE TESTOSTERONA, 17 β -
ESTRADIOL Y CORTISOL A LO LARGO DEL DIA

DISCUSION	78 - 94
------------------------	----------------

CONCLUSIONES	96 - 97
RESUMEN	99 - 100
BIBLIOGRAFIA	102 - 127

ACRONIMOS

a.m.	Ante-meridiano
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
AD	Androstenodiona
BMDP	Biomedical data program
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
C	Hormona cortisol
CV	Coeficiente de variación
DHEA	Deshidroepiandrosterona o dehidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
D.S.	Desviación estándar
EIA	Enzimoinmunoanálisis
ELISA	Enzimo linked immunoassay
E ₂	Hormona 17β-estradiol
E.S.	Error estándar
FAD	Dinucleótido de adeni-flavina
FC	Frecuencia cardíaca
FMN	Mononucleótido de flavina
FSH	Hormona foliculo estimulante
GTP	Trifosfato de guanosina
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HRP	Peroxidasa de rábano picante
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LH	Hormona luteinizante
LO	Luz-oscuridad
LMH	Lóbulo medio de la hipófisis
LPH	Lóbulo posterior de la hipófisis
OHSD	Enzima 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa
OPD	Ortofenilén-diamina dihidroclorhidrato
P450	Enzima citocromo P450
p.m.	Post-meridiano
PS	Presión sanguínea
ng/ml	Nanogramos por mililitro
pg/ml	Picogramos por mililitro

RIA	Radioinmunoanálisis
SCC	Sistema enzimático fragmentador de la cadena lateral
SCP	Sterol carrier protein (proteína transportadora)
τ	Período
T	Hormona testosterona
UCM	Universidad Complutense de Madrid

OBJETIVO

El caballo es un animal altamente fotorreceptivo, de tal forma que ligeras variaciones en la cantidad de luz producen grandes variaciones, en las concentraciones plasmáticas de las hormonas reguladoras de la función reproductora. Con el desarrollo, en los últimos años, de técnicas enzimoimmunoanalíticas se han podido determinar las concentraciones de los diferentes perfiles hormonales. En el caballo, se han realizado múltiples estudios sobre los niveles plasmáticos de testosterona y cortisol, en distintas latitudes y en distintas razas; así como trabajos sobre los niveles plasmáticos de 17β -estradiol en los que los resultados reflejan un margen amplísimo de concentraciones.

Al no existir ningún trabajo que describiera los niveles plasmáticos de los sementales de Pura Raza Española, considerándolos no sólo como una de las razas autóctonas españolas fundamentales, sino también como una de las principales razas caballares a nivel mundial, hemos creído conveniente estudiar los perfiles hormonales de testosterona, 17β -estradiol y cortisol, con el objeto de contribuir a su clarificación y dejar establecidas algunas de las constantes fisiológicas de esta raza.

Para completar nuestro trabajo, hemos creído necesario el hacer una revisión bibliográfica con los siguientes objetivos: la fisiología y la esteroidogénesis a nivel testicular, la esteroidogénesis a nivel adrenal, y por último una revisión de la cronofisiología, como ciencia encargada del estudio de ciclos hormonales predecibles en el organismo.

Estudiamos la posible ritmicidad en la secreción de testosterona, 17β -estradiol y cortisol a lo largo del año, de la semana y del día.

Asimismo, quisimos comprobar las diferencias ó similitudes existentes entre los patrones de las tres hormonas y las posibles diferencias entre las concentraciones obtenidas a lo largo del día en dos épocas del año.

INTRODUCCION

FISIOLOGIA DEL TESTICULO

Los testículos del semental se encuentran situados en la región prepúbica con su eje longitudinal casi en posición vertical. Poseen forma ovoide y están comprimidos laterolateralmente, con una longitud de 80 a 140 mm, una anchura de 50 a 80 mm y un peso alrededor de los 225 g, variando según la edad y la estación. El parénquima testicular ocupa el 90% del total de la masa testicular decreciendo con la edad y posee dos componentes básicos, los túbulos seminíferos y el intersticio, dentro de los cuales encontramos las células responsables de la esteroidogénesis: las células de Leydig y las células de Sertoli (Varner *et al.*, 1991).

La testosterona se sintetiza en las células de Leydig que se localizan en el intersticio de los túbulos seminíferos. Según Almahbobi *et al.* (1988), la habilidad esteroidogénica del caballo se relaciona con la calidad y cantidad de tejido intersticial, y Berndtson y Jones (1989) afirman que se encuentra relacionada con la edad. El otro tipo celular del testículo, las células de Sertoli, puede sintetizar y secretar asimismo algunos andrógenos (Hall, 1988).

Los nombres utilizados para designar las hormonas esteroides secretadas en el testículo son (figuras 1 y 2):

- * Androstenodiol (3β , 17β -dihidroxi Δ^5 -androsten-3-ol)
- * Androstenodiona (3,17-diceto Δ^4 -androsten-3-one)
- * Dihidrotestosterona (17 β -hidroxi-5 α androsten-3-one)
- * Estradiol (estra-1,3,5(10)-trieno-3 β ,17 β -diol).
- * Estrona (3 β -hidroxiestra-1,3,5(10)-trieno-17-one)
- * Testosterona (17 β -hidroxi-androst-4-en-3-one)

La mayoría de los andrógenos secretados por el testículo son sintetizados en las células de Leydig; cualquier contribución hecha por los túbulos seminíferos es menos importante (Eik-Nes y Hall, 1965; Christensen y Manson, 1965). Según Tamaoki (1973), los andrógenos testiculares son producidos por las células intersiciales del tejido testicular,

pero no por las células encargadas de la espermatogénesis.



Figura 1.- Esteroides testiculares



Figura 2.- Esteroides testiculares

El agente regulador más importante en la síntesis de andrógenos es la hormona luteinizante (LH), la cual es secretada a pulsos por la adenohipófisis (Dierschke *et al.*, 1970) y ejerce su acción al unirse a su receptor. Parece que la gonadotropina coriónica humana (hCG) es también capaz de unirse a este receptor obteniéndose la misma respuesta en las células efectoras.

Las células de Leydig sintetizan y secretan, constantemente, testosterona (Dadoune y Demoulin, 1993), además de otras hormonas. Estas células se estimulan periódicamente y aumentan su producción, de forma que podemos encontrar un aumento en la concentración de testosterona cada 2 a 4 horas (Ewing y Brown, 1977).

Según Amann (1993b), durante la producción episódica de testosterona en el semental, la concentración, en el interior del testículo, es 10 veces superior a la concentración basal, como consecuencia, los tubos seminíferos parecen estar continuamente expuestos a concentraciones elevadas de testosterona, necesarias para un normal funcionamiento de la espermatogénesis.

El fluido intersticial posee una concentración total de 17β -hidroxiandrógenos, 45 veces mayor que la que podemos encontrar en el suero obtenido, por punción, de la vena yugular (Amann y Ganjam, 1981 y Seamans *et al.*, 1991). Cuando las células de Leydig están bajo la máxima estimulación de LH, la concentración de testosterona, en la vena testicular, puede doblar 100 veces la concentración de testosterona, en la vena yugular (Amann y Ganjam, 1981).

El testículo también es capaz de sintetizar estrógenos (Nyman *et al.*, 1959); tanto las células de Leydig como las de Sertoli son responsables de esta síntesis en los machos (Robel, 1993a). La biosíntesis puede producirse vía Δ^4 ó Δ^5 , aunque la mayoría de la biosíntesis de esteroides parece ocurrir vía Δ^4 (vía progesterona), pero no se tienen datos acerca del tipo de células responsables (Sertoli, Leydig o algún otro componente del testículo, Pickett *et al.*, 1989) de la producción de estrógenos en el testículo del semental.

La vena testicular contiene altas concentraciones de estrona y estradiol, la mayoría en forma conjugada con sulfato (o glucurónido), para aumentar la solubilidad en agua y perder bioactividad. Aunque no se conoce bien el papel biológico de estos estrógenos conjugados producidos en el testículo. La administración de estradiol a caballos castrados fue capaz de restaurar la libido, pero no influyó sobre el peso de los órganos sexuales accesorios ni fue capaz de restaurar la habilidad para eyacular en los animales castrados; por

lo que parece que el estradiol está envuelto en la estimulación del comportamiento sexual, a nivel neural central pero no parece afectar al tracto genital del semental (Nett, 1993a).

En adición a la estrona y estradiol, el testículo además secreta estriol y otros dos estrógenos identificados por primera vez en el caballo, la equilina y la equilenina (figura 3).

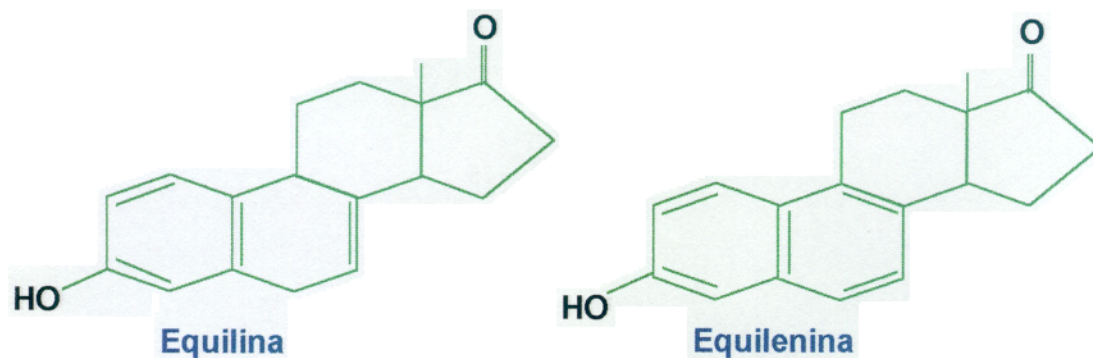


Figura 3

ESTEROIDOGENESIS EN EL TESTICULO

Los factores que influyen en la esteroidogénesis son la especie, el sexo, la edad, el estado de desarrollo (feto, recién nacido, inmaduro, maduro, senil) y las condiciones fisiológicas tales como estación reproductora, estrés, etc. (Tamaoki, 1973).

La síntesis de andrógenos por las células de Leydig y los mecanismos de regulación de este proceso (figura 4), no se conocen bien a pesar de los múltiples estudios realizados. Cada nuevo descubrimiento abre nuevas perspectivas, pero aumenta la complejidad del problema.

Todas las hormonas esteroideas son sintetizadas, en su totalidad, por el organismo

y derivan del sistema anular ciclopentanoperhidrofenantreno que consiste en tres anillos hexagonales, A, B y C; y un cuarto anillo pentagonal, D. Por sustitución de grupos metilo, se obtienen los cuatro grupos de hormonas esteroides relacionadas con la reproducción: progestágenos, andrógenos, estrógenos y corticosteroides (Carruthers, 1986).

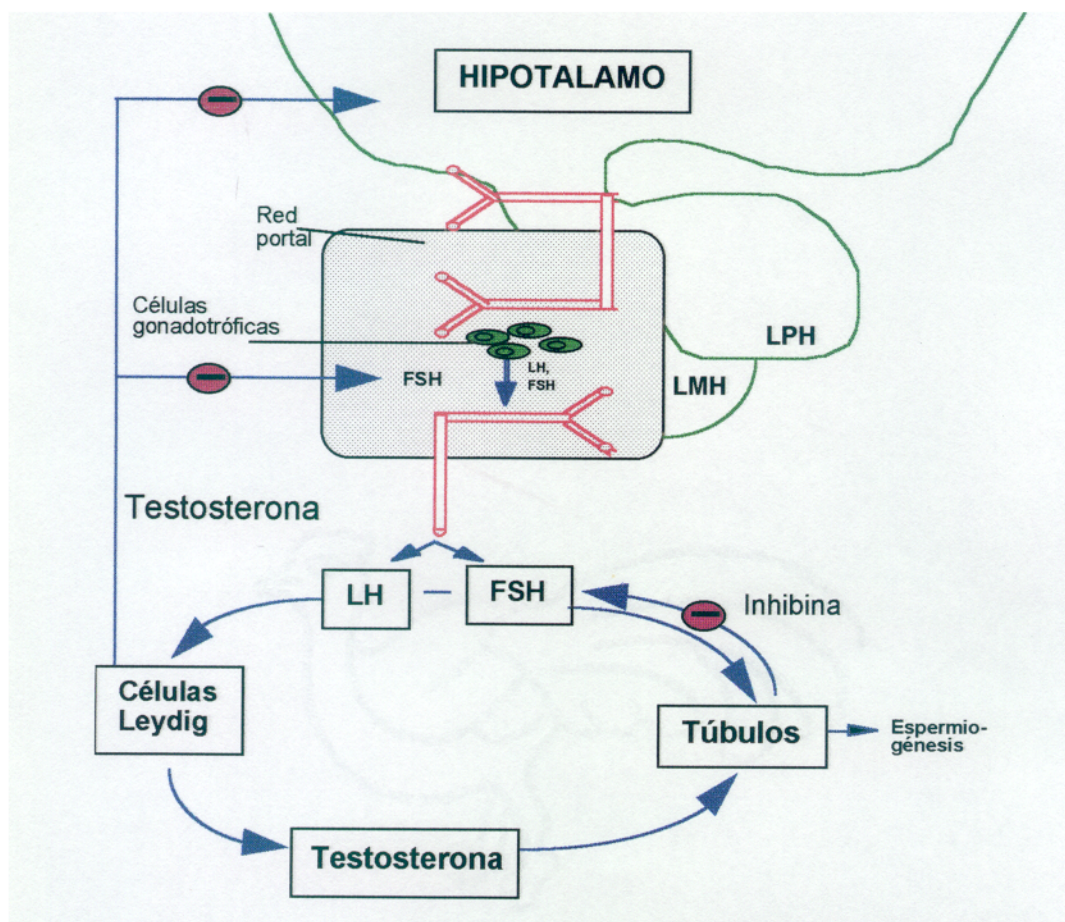


Figura 4.- Regulación de la producción de testosterona

Silván e Illera (1994) describen la síntesis de colesterol de la siguiente manera:

- Conversión de tres moléculas de acetato en ácido mevalónico,
- Conversión de seis moléculas de ácido mevalónico en escualeno
- Oxidación y ciclación del escualeno en lanosterol

- d) Eliminación de tres grupos metilo del lanosterol y ordenamiento de dobles enlaces para la obtención de la molécula de colesterol.

El colesterol esteroideogénico es aportado, en parte, por síntesis *de novo* a partir de acetato, por almacenamiento intracelular en vacuolas, y en parte, por el colesterol importado desde el plasma, en forma de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Esta proporción varía según el tipo de célula (adrenal o de Leydig), la especie y el estado fisiológico (Hall, 1993).

La captación de lipoproteínas sanguíneas, portadoras de colesterol, es la principal fuente para la síntesis de hormonas gonadales, aunque en el testículo esta evidencia no es tan clara. La captación de las lipoproteínas está regulada hormonalmente y coordinada con la síntesis intracelular de colesterol, así como con la hidrólisis de los ésteres de colesterol, con el fin de asegurar que existe una concentración idónea de colesterol para la esteroideogénesis (Gore-Lagton y Armstrong, 1988). Las LDL se unen a receptores específicos de membrana, una vez producida la unión lipoproteína-receptor, se lleva a cabo una endocitosis por degradación lisosómica, mediada por el propio receptor (Niswender, 1993). Se conoce que la hormona adrenocorticotropa (ACTH) promueve la entrada de LDL al interior de la célula adrenal (Hall y Nakamura, 1979), pero se desconoce si la LH podría tener el mismo papel a nivel de las células de Leydig.

Después de su paso a la célula, el colesterol es, en gran parte, esterificado (en forma de oleato) y almacenado en vacuolas citoplasmáticas, las cuales decrecen en tamaño y número cuando las células de Leydig son estimuladas por la LH. En condiciones normales, el colesterol captado del plasma es inmediatamente utilizado para la síntesis de hormonas. Cuando se necesita colesterol para la síntesis de esteroides, el éster es hidrolizado a colesterol libre gracias a la colesterol éster hidrolasa, localizado en las células de Leydig (Albert *et al.*, 1980).

Las células de Leydig, bajo la influencia del cAMP, emplean parte de sus reservas biológicas para aumentar la síntesis de andrógenos. Estas células crean nuevas proteínas que

no han sido catalogadas y cuyas funciones aún no están claras. Algunas de estas proteínas y otras, existentes en la célula, sufren fosforilaciones a la vez que se producen cambios en el contenido celular de fosfolípidos, cambios posiblemente debidos a la síntesis mitocondrial de pregnenolona.

El transporte de colesterol hacia la mitocondria y dentro de la mitocondria, desde su membrana externa a la interna, se realiza con la ayuda de proteínas transportadoras (SCP o sterol carrier protein) (Chanderbahl *et al.*, 1982; Vahouny *et al.*, 1983). El primer paso envuelve a microfilamentos y filamentos intermedios que han sido hallados en células de Leydig de ratas (Almahbobi *et al.*, 1993). El paso de colesterol de las vacuolas lipídicas, que almacenan colesterol esteroideogénico, a las mitocondrias en las que se lleva a cabo la síntesis de pregnenolona, se realiza mediante esos filamentos intermedios.

La mayoría de las enzimas que regulan la síntesis de hormonas esteroides son enzimas citocromo P450, que catalizan reacciones de hidroxilación. Estas enzimas se localizan a nivel de la mitocondria y a nivel de los microsomas del retículo endoplasmático (Samuels y Matsumoto, 1974) y pertenecen al sistema multienzimático denominado SCC (side chain cleavage ó sistema enzimático fragmentador de la cadena lateral):

- 1.- En la mitocondria: utilizan dinucleótido de adenina flavina (FAD) y una proteína llamada testodoxina que contiene hierro y oxígeno molecular (Berne y Levy, 1992; Hall, 1993). En este grupo se incluye la citocromo P450_{scc} (Robel, 1993).
- 2.- En los microsomas: utilizan FAD y mononucleótido de flavina (FMN). Se cree que, el citocromo b₅, está implicado en la reducción de la P450 en los microsomas. En este grupo incluimos la P450_{C17} y la P450_{aro} (aromatasa).

La testosterona se sintetiza a partir del colesterol por cuatro reacciones enzimáticas, catalizadas por cuatro enzimas (figura 5). Dos de estas enzimas, la P450_{scc} y P450_{C17} son monoxigenasas que utilizan oxígeno atmosférico como sustrato y se reducen por

nucleótidos piridínicos. Para llevar a cabo su función catalítica, la enzima debe ser

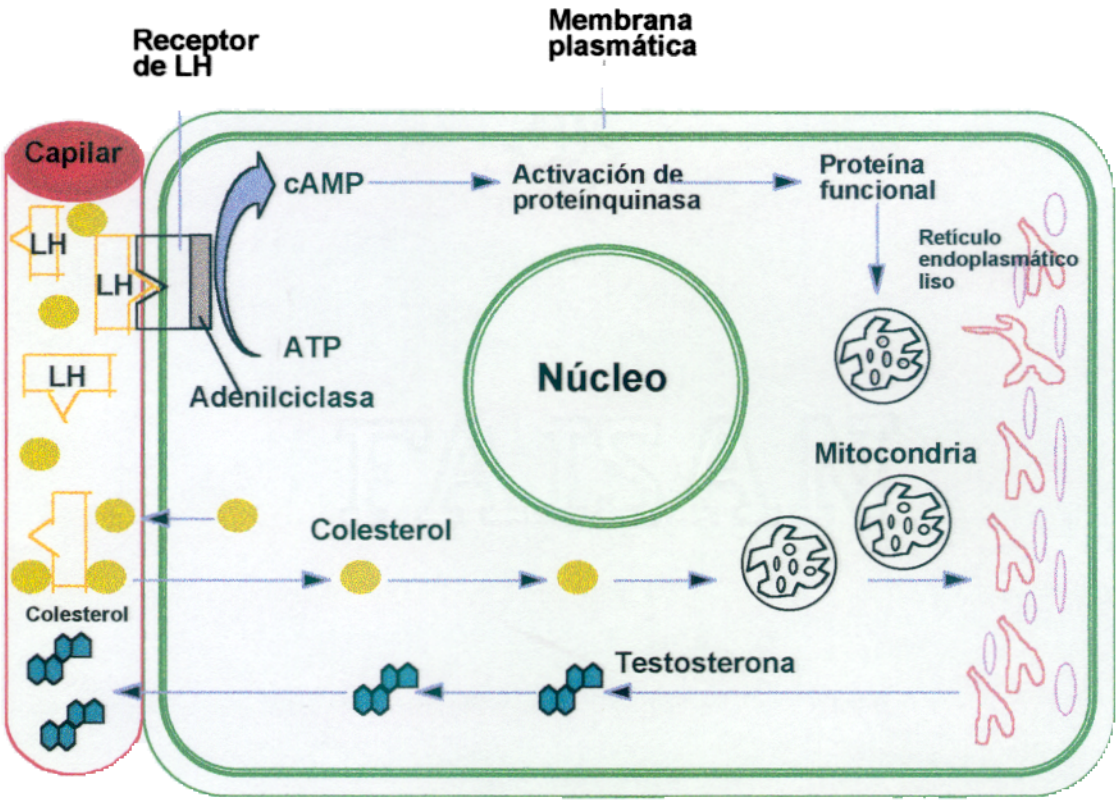


Figura 5.- Síntesis de testosterona

reoxidada para continuar actuando sobre nuevas moléculas de sustrato. Estas dos enzimas eliminan la cadena lateral del colesterol en dos pasos oxidativos. Las otras dos enzimas son deshidrogenasas que emplean nucleótidos piridínicos, una de las cuales, la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ 4,5 isomerasa, cataliza la isomerización en el anillo A y B

El cAMP estimula la síntesis de andrógenos acelerando el transporte de colesterol desde los depósitos lipídicos del citosol hacia la enzima citocromo P450_{sc}. La LH y el cAMP promueven la síntesis de P450_{sc} y P450_{C17} en células de Leydig de ratas (Anderson y Mendelson, 1985; Nishihara *et al.*, 1988) influyendo en la transcripción genética de las mismas

Las cuatro reacciones enzimáticas necesarias para obtener testosterona son:

- 1ª El colesterol debe perder la cadena lateral, mediante escisión enzimática de 6 átomos de carbono, a nivel del carbono 17 y sufrir una reorganización de los anillos A y B.
- 2ª La oxidación del grupo 3β de la pregnenolona a grupo cetona y la reorganización de los dobles enlaces.
- 3ª Eliminación del resto de la cadena lateral en el C17.
- 4ª Reducción de la cetona del C17 a 17βol.

La eliminación de la cadena lateral en el C17 del colesterol tiene lugar en dos pasos. El primer paso es una hidroxilación que prepara a los carbonos C20 y C22 para la ruptura (segundo paso). La reacción tiene lugar en la mitocondria obteniéndose pregnenolona e isocaproaldehído:



El resto de la cadena lateral, en el C17, se elimina para producir esteroides C19 y dos átomos de carbono, por acción de la enzima P450_{C17}. Esta enzima se localiza en la fracción microsomal y cataliza el paso de pregnenolona a 17α-hidroxipregnenolona y el paso de progesterona a 17α-hidroxiprogestero, gracias a su actividad hidroxilasa.

A partir de aquí, la biosíntesis de testosterona puede seguir dos rutas metabólicas:

- a.- Ruta Δ4: paso de 17α-hidroxiprogestero a androstenodiona.
- b.- Ruta Δ5: paso de 17α-hidroxipregnenolona a androstenodiol.

Ambas reacciones están catalizadas por la enzima anterior, gracias a su actividad liasa.

El predominio de una ruta u otra no se produce al azar, difiere según la especie. En la rata macho predomina la $\Delta 4$; en el cerdo, en el conejo y en el perro (Hall, 1993) la $\Delta 5$, casi exclusivamente. En el caballo se desconoce qué ruta es la que predomina. El predominio puede deberse a la especificidad diferencial de la P450_{c17} y la deshidrogenasa/isomerasa por uno o ambos sustratos y a la organización de las enzimas en la membrana.

La oxidación del grupo 3β de la pregnenolona a grupo cetona y la reorganización de los dobles enlaces son catalizadas por la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta 4,5$ isomerasa. Esta enzima actúa sobre cuatro sustratos: pregnenolona, 17α -hidroxipregnenolona, dehidroepiandrosterona y androstenodiol para obtener progesterona, 17α -hidroxiprogestero, androstenodiona y testosterona, respectivamente (Sun Choi, 1987; Thomas *et al.*, 1988; Berne y Levi, 1992). Estos productos inhiben, competitivamente, la acción enzimática. La enzima se localiza en la mitocondria y en la fracción microsomal en, aproximadamente, la misma proporción.

El último paso incluye la reducción de la cetona del C17 a 17β ol de la testosterona. La enzima microsomal 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (OHSD) cataliza la conversión de la androstenodiona, dehidroepiandrosterona y estrona a testosterona, androstenodiol y 17β -estradiol, respectivamente (Sun Choi, 1987; Berne y Levy, 1992).

La reacción catalizada es reversible y muestra la propiedad inusual de activación del producto, esto es, la testosterona, por ejemplo, promueve su propia formación desde androstenodiona y viceversa (Oshima y Ochi, 1973). La enzima posee dos lugares activos, uno para la actividad reductasa y otro para la oxidasa (Oshima y Ochi, 1973; Samuels *et al.*, 1975). La enzima *in situ* está influenciada por los niveles de sustrato, producto y nucleótidos piridínicos.

La testosterona puede seguir dos rutas metabólicas y transformarse en otros esteroides biológicamente activos:

- a.- Ruta de la 5α -reductasa: transformándose en dihidrotestosterona (DHT).
- b.- Ruta de la aromatasa: transformándose la testosterona en 17β -estradiol (Bedrak y Samuel, 1969; Oh y Tamaoki, 1970; Houghton *et al.*, 1990), gracias a la acción de la $P450_{\text{aro}}$ localizada en el retículo endoplasmático (Robel, 1993a).

Zwain *et al.* (1989) confirmaron la localización de la enzima aromatasa en la fracción microsomal de las células del testículo del caballo, capaz de originar estrógenos. Este complejo sistema enzimático se localiza también a nivel del sistema nervioso central, tejido adiposo (Snow, 1993). La aromatización envuelve dos hidroxilaciones en el C19, seguidos de la pérdida del mismo y la reorganización del anillo A. Gaillard y Silberzahn (1987) y Gaillard (1991) demostraron que la actividad aromatasa aumenta después de los dos años de edad, hasta los ocho años, pudiendo deberse al aumento en el número y volumen de las células de Leydig que ocurre en el caballo de los 2 a los 20 años.

Los andrógenos más importantes producidos por el testículo son C19-esteroides: testosterona, DHT y androstenodiona (AD). Jeffcoate y Short (1970) estudiaron el poder androgénico de la testosterona y la DHT y llegaron a la conclusión de que, si se administraban en la misma cantidad, producían efectos idénticos sobre el crecimiento y la actividad secretora de las glándulas accesorias.

La cantidad de testosterona sintetizada es tan grande, en relación con las otras dos hormonas, que puede considerársele como el andrógeno testicular, representando el 95% de la testosterona, presente en el plasma de hombres normales.

Los estrógenos más importantes, producidos por el testículo, son C18-esteroides: 17β -estradiol, estrona y estriol, además de dos estrógenos hallados por primera vez en la

yegua: equilina y equilenina (ver figura 3).

ESTEROIDOGENESIS EN LA CORTEZA ADRENAL.

La corteza adrenal es el lugar de síntesis de los glucocorticoides. Cameron y Grant (1967), distinguen en la corteza adrenal equina una zona glomerulosa, una fascicular y otra reticular. La zona fascicular y reticular son, presumiblemente, el lugar de producción de glucocorticoides y andrógenos en el caballo, respectivamente.

El glucocorticoide principal en la circulación del caballo es el cortisol (figura 6), seguido por la cortisona, corticosterona y desoxicorticosterona, en menor proporción (Zolovick *et al.*, 1966).

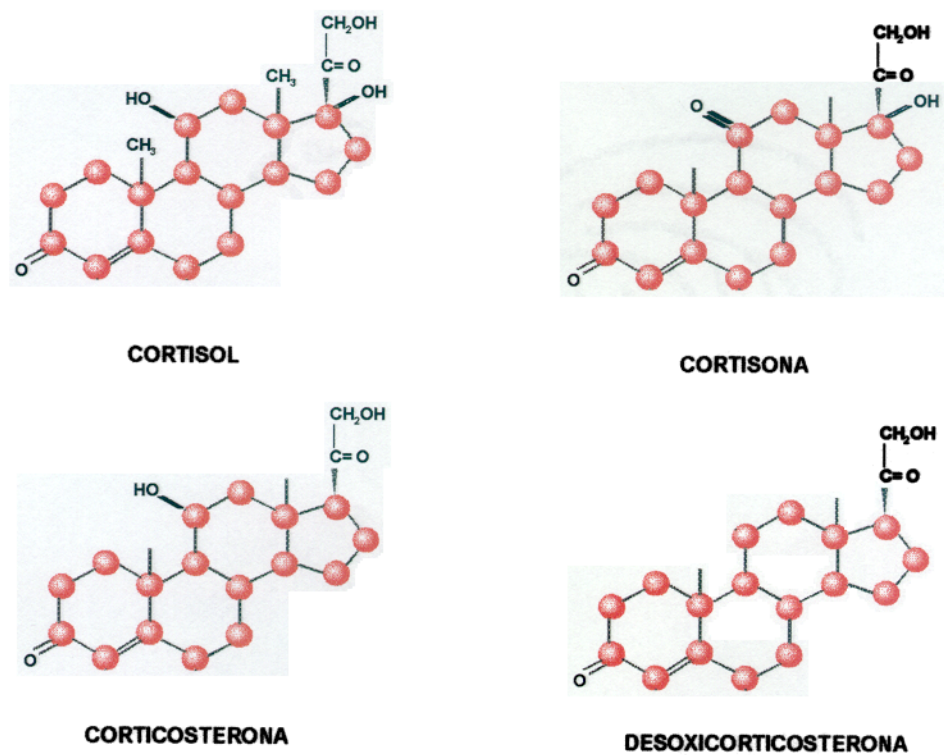


Figura 6.- Principales glucocorticoides

El colesterol, al igual que en las células de Leydig, sirve de precursor para la formación de esteroides adrenales. Aunque la corteza adrenal es capaz de sintetizar colesterol desde acetato, que se introduce en el retículo endoplasmático de la célula adrenal, parece que la mayoría del colesterol usado para la biosíntesis de esteroides adrenales es secuestrado de la circulación. La ACTH estimula la entrada de LDL al interior de la célula adrenal (Hall y Nakamura, 1979).

El movimiento del colesterol del exterior al interior de la membrana mitocondrial de las células adrenales, se estimula por la acción de unas proteínas que además unen la $P450_{sc}$ con el sustrato acelerándose la reducción de la enzima y la escisión de la cadena lateral del colesterol (Yanagibashi *et al.*, 1988). La síntesis de estas proteínas en la célula adrenal se incrementa por la acción de la ACTH. Esta proteína también ha sido obtenida de células de Leydig bovinas, por lo que probablemente la LH actuaría también a este nivel. Otras proteínas y el trifosfato de guanina (GTP) están envueltos en el transporte intramitocondrial de colesterol y en el paso de colesterol a pregnenolona, respectivamente.

El colesterol tiene que sufrir las mismas transformaciones que en el testículo, para transformarse en pregnenolona, en el interior de la mitocondria de la célula adrenal (figura 7). Una vez ocurrido ésto, la pregnenolona se transfiere al retículo endoplasmático para sufrir una serie de transformaciones bioquímicas, a cargo de un equipo enzimático muy desarrollado (James, 1979; James *et al.*, 1985).

La pregnenolona se transforma a 17α -hidroxipregnenolona por acción de la $P450_{c17}$. En la fracción microsomal de la célula adrenal, la $P450_{c17}$ no actúa de la misma forma que en la célula de Leydig. En la zona glomerular de la corteza adrenal, esta enzima no aparece ya que la aldosterona no posee un grupo 17α -hidroxi, mientras que en la zona fascicular y reticular, y para la formación de cortisol, sólo se produce el primer paso, o sea, la 17α -hidroxilación. La hidroxilación de la progesterona a 17α -hidroxiprogesteroona sucede también en el retículo endoplasmático liso, por la acción de la fracción hidroxilasa de esta misma enzima.

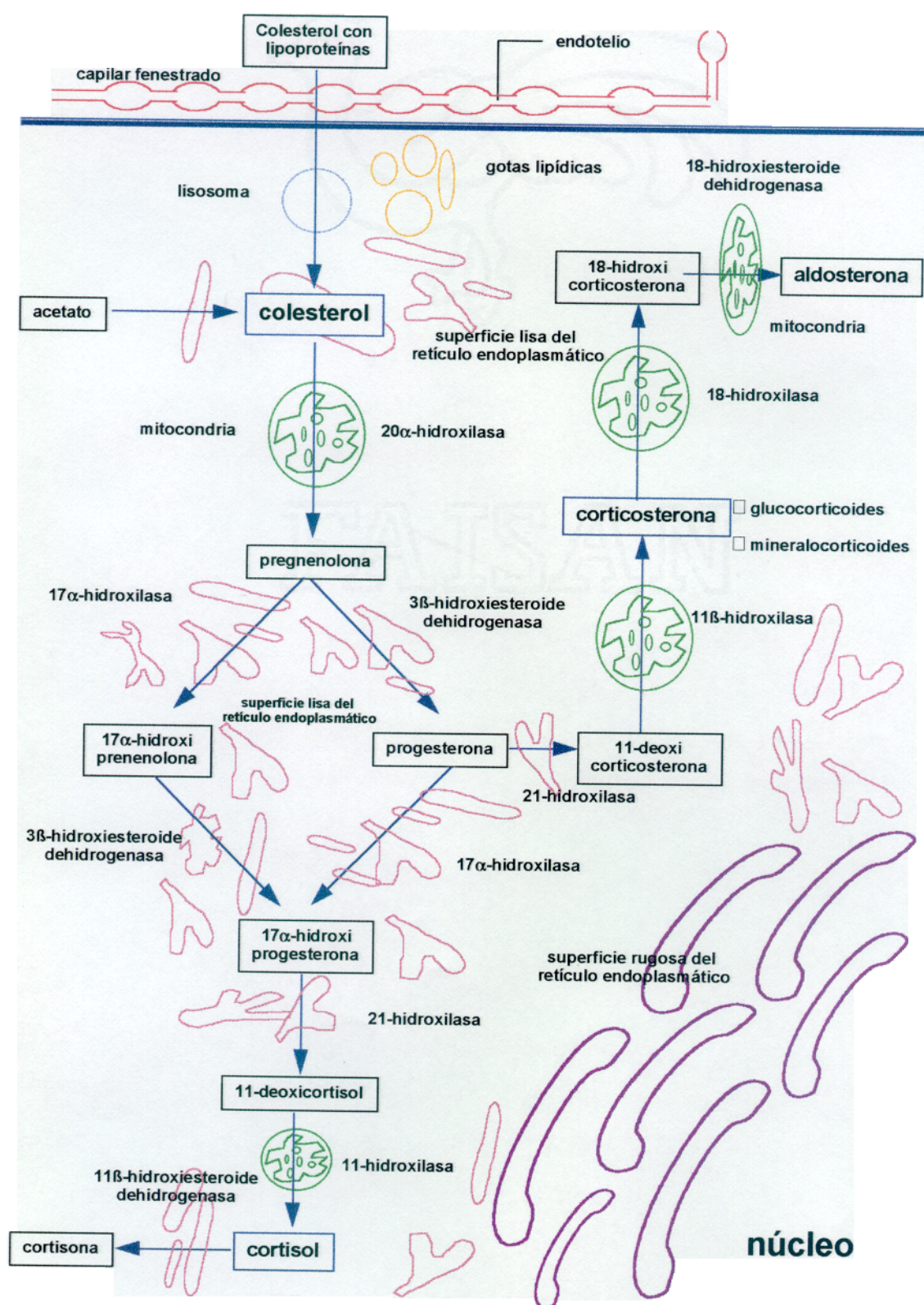


Figura 7

Como la acción 17,20 liasa de la P450_{c17} no es necesaria para la formación de cortisol, tras la formación de la 17 α -hidroxiprogesterona y por actuación de la 21 β -hidroxilasa se obtiene 11-deoxicortisol. La progesterona, por medio de esta misma enzima, se transforma a 11-deoxicorticosterona. Estos productos se introducen nuevamente en la mitocondria y finalmente por 11 β -hidroxilación, se produce corticosterona y cortisol, respectivamente.

La actividad 17,20 liasa de la P450_{c17} es necesaria para catalizar el paso de 17 α -hidroxipregnenolona a deshidroepiandrosterona (DHEA) que representa el andrógeno adrenal secretado en mayor cantidad, y la 17 α -hidroxiprogesterona a androstenodiona. La enzima se encuentra sujeta a inhibición competitiva, de forma que la progesterona y la pregnenolona inhiben esta actividad liasa (Nakajin y Hall, 1981, 1983). También los estrógenos realizan esta inhibición competitiva (Onoda y Hall, 1981).

La mayoría de la DHEA formada es convertida, por una sulfoquinasa adrenal, a sulfato de deshidroepiandrosterona que se transforma posteriormente a androstenodiona que será convertida a testosterona y estradiol.

La glándula adrenal tiene la habilidad de producir estrógenos, andrógenos y progestágenos en suficiente cantidad para tener efectos biológicos, inhibiendo la secreción de gonadotropinas y reduciendo, por tanto, la actividad gonadal y la producción normal de gametos (Nett, 1993c).

Cameron y Grant (1967) observaron la habilidad de las células de la zona fascicular y reticular para la transformación de la pregnenolona, progesterona, 17 α -hidroxipregnenolona y 17 α -hidroxiprogesterona a cortisol *in vivo*, encontrando que:

- Ambos tipos de células forman cortisol a partir de esos esteroides.
- La transformación es mayor en la zona fascicular

- La formación de 17α -hidroxiprogesterona, desde pregnenolona, es más lenta que la formación subsecuente de cortisol, desde 17α -hidroxiprogesterona.
- La formación de 17α -hidroxiprogesterona, desde 17α -hidroxipregnenolona, es de 2 a 4 veces más rápida en la zona fascicular que en la reticular.
- La 17α -hidroxilación de la progesterona es, además, más rápida en la zona fascicular que en la reticular.

La ACTH regula la acción enzimática de forma que, el aumento en su concentración, estimula la acción de la 11β , 21 y 17 hidroxilasa y 17 - 20 liasa. Entre los factores que inhiben la actividad de la 11β hidroxilasa se encuentra el cortisol, la androstenodiona y la epinefrina (López-Calderón, 1992).

CRONOBIOLOGIA: RITMOS BIOLOGICOS

Los fenómenos biológicos repetitivos se extienden desde el batir de las alas de un insecto a 2000 ciclos por segundo hasta el ciclo de 10 años que sigue la densidad de población del lince canadiense o a los 120 años del ciclo de floración del bambú. Muchos eventos naturales ocurren de forma precisa, tal es el caso de la salida y la puesta de sol, los ciclos lunares o los cambios estacionales (Sharp *et al.*, 1993). La observación de un proceso fisiológico durante un determinado tiempo, por ejemplo, la concentración de glucocorticoides en plasma o la actividad motora diurna, nos lleva a la conclusión de que periodos de máxima actividad o síntesis alternan con periodos de actividad o síntesis escasa o nula.

En la década de los 50 se inició el estudio de los ritmos biológicos (Halberg y Visscher, 1950) y su relación con el ciclo nictameral o sucesión de luz-oscuridad. El

equilibrio de los parámetros fisiológicos, frente a las perturbaciones del medio externo se denomina homeostasis. Esta fue defendida por los fisiólogos clásicos que se resistían a aceptar la presencia de variaciones en los parámetros biológicos, sincronizados por el ambiente geofísico. Actualmente, las variaciones diarias (ritmos circadianos) están ampliamente aceptadas. Los órganos sensoriales perciben información sobre los cambios producidos en un día natural, y ésta es transportada al cerebro donde actúa un reloj sincronizador que controla los ritmos de los órganos (figura 8).

La cronofisiología estudia las variaciones rítmicas de los procesos fisiológicos en el tiempo, prediciendo no sólo cuándo van a ocurrir, aproximadamente, los valores más altos o más bajos, en un determinado día, sino también, cuándo van a ocurrir en una semana o año. Esta ciencia se basa en la demostración de dos hechos:

a) Se ha demostrado que los ritmos biológicos son endógenos, es decir, están programados en el código genético del organismo, la información pertinente se localiza en el gen *per* (período). Estos hallazgos han sido realizados en las moscas de la fruta (Hamblen-Coyle *et al.*, 1986; Hardin *et al.*, 1990 y Young, 1992), aunque este hecho fue documentado con anterioridad en las mismas especies y en otras muchas, mediante el fenómeno de curso libre (Halberg, 1970a y b).

b) Las variaciones rítmicas están sincronizadas por los diversos ciclos temporales que los cambios geofísicos ofrecen, como pueden ser las horas de luz-oscuridad o el magnetismo terrestre y solar. Los factores externos capaces de sincronizar un ritmo se denominan *Zeitgeber* (dadores de tiempo) o sincronizadores, p.e. el ciclo luz-oscuridad; independientemente del término que utilicemos, el sincronizador sólo puede ser interpretado como un donante del tiempo de reloj o de calendario, no del tiempo interno (Halberg *et al.*, 1954; Nelson *et al.*, 1975; Aschoff y Pohl, 1978). Si mantenemos constante el entorno, el ritmo no desaparece sino que entra en lo que se denomina curso libre; es decir, el ritmo ya no depende del sincronizador, sino que es generado por el propio individuo, demostrando su carácter endógeno. En esta situación, el ritmo se suele desfazar del ciclo del sincronizador, ya que no siempre el ritmo endógeno tiene el mismo período que el

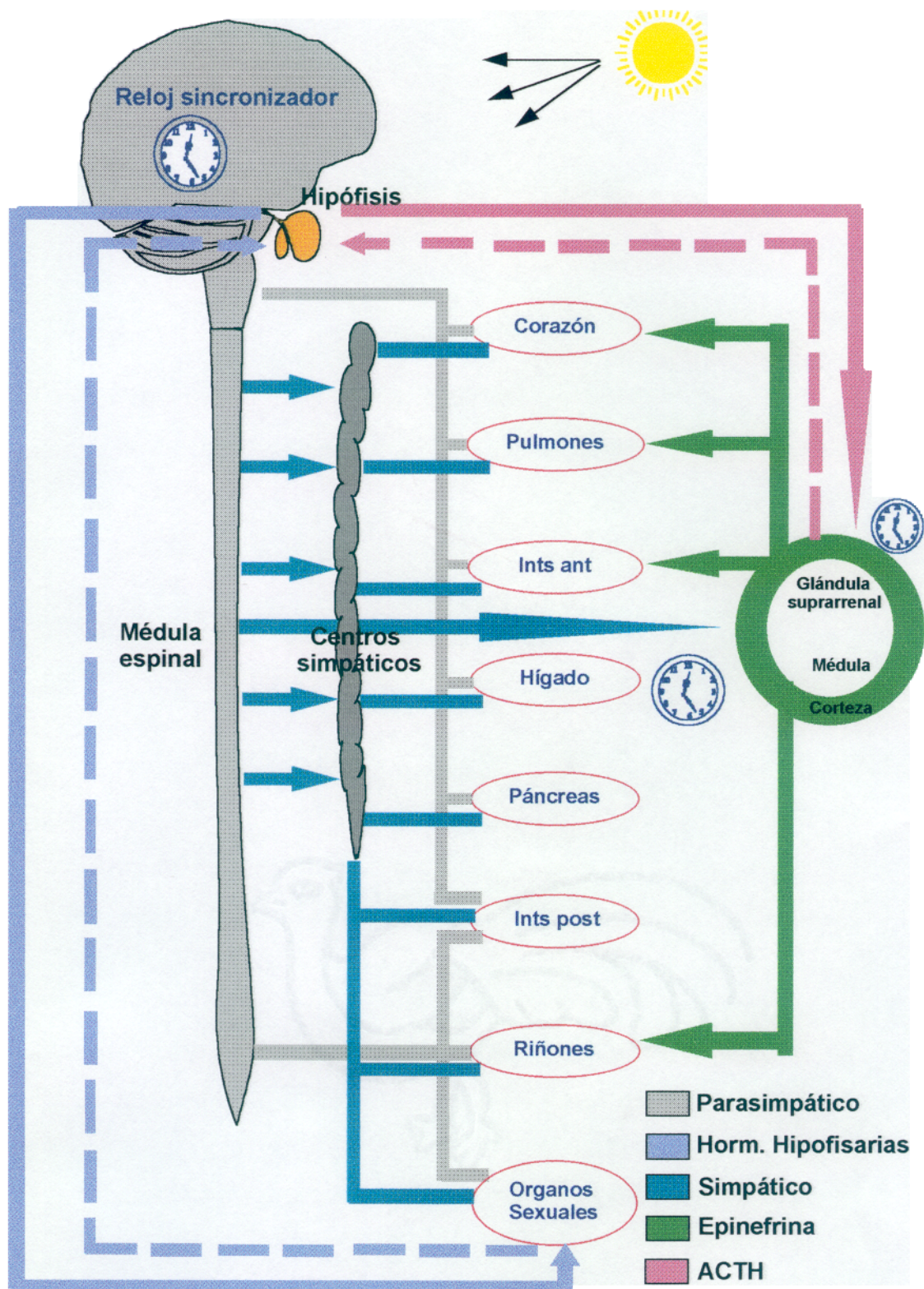


Figura 8

sincronizador. El fenómeno es reversible, de forma que, tan pronto como se restituya el fenómeno que actúa como sincronizador, el ritmo se reajustará al ciclo geofísico. Un ciclo externo, como es el ciclo luz-oscuridad, alternando cada 12 horas, únicamente puede sincronizar un ritmo circadiano. Existe sincronización cuando el período del ciclo externo es cercano al período endógeno natural. En otras palabras, los ritmos circadianos están sincronizados por factores externos como es la luz o la alarma de un reloj, pero no están determinados o producidos por los ciclos ambientales.

Otro aspecto importante de los ritmos circadianos es que una vez sincronizados por cualquier factor ambiental (longitud de día, ingesta o temperatura), se impone la frecuencia del factor ambiental sobre el reloj interno; es decir, el ritmo interno está sincronizado por el tiempo local. Los ritmos hormonales, de conducta, etc., se ajustan a la acción de sincronizadores que a su vez son fenómenos geofísicos repetitivos, como por ejemplo el ciclo de mareas, cambios estacionales, ciclo nictameral, etc.

En otras ocasiones, los ritmos se ven alterados, no sincronizados, por influencias externas; por ejemplo, en otoño se atrasa el reloj y en primavera se adelanta; en estos casos existe cierta dificultad para ajustarse al nuevo horario (1 a 2 semanas) al igual que ocurre cuando se realiza un vuelo transoceánico atravesando distintos husos horarios.

Se entiende por ritmo biológico la recurrencia de un fenómeno (ciclo) a intervalos más o menos regulares. Cronobiológicamente definido, es la componente periódica en una serie temporal biológica, que es predecible y se demuestra mediante cálculos estadísticos, obteniendo de éstos las llamadas características del ritmo. Los fenómenos rítmicos están muy relacionados con la teoría oscilatoria, de hecho, muchos de los términos utilizados en cronobiología han sido tomados de dicha teoría. La terminología cronobiológica puede parecer extraña y complicada al principio, pero con el tiempo, el contacto con los métodos analíticos cronobiológicos y su uso, estos términos se vuelven familiares. Originalmente, los métodos de determinación para el estudio de un período circadiano se realizaban a mano y se tardaba meses o años en la actualidad, los mismos análisis se realizan en segundos o como mucho en minutos, gracias al uso de ordenadores.

Cambios similares de aproximadamente, pero no exactamente, el mismo tipo y extensión, ocurren en aproximadamente, pero no exactamente, los mismos intervalos, en aproximadamente las mismas secuencias, y a todos los niveles de organización de la vida animal o vegetal, desde procariotas a seres humanos (Halberg, 1969). Podemos encontrarnos con valores máximos y mínimos que se repiten periódicamente, es decir, acontecimientos similares que se manifiestan de forma consecutiva y ocurren en intervalos regulares, formando ciclos manifiestos o bioperiodicidades.

Las periodicidades son más generales que la vida, y se encuentran en muchos de los fenómenos investigados por diferentes disciplinas. Por ejemplo, los organismos multicelulares, así como los animales, exhiben comportamientos cíclicos en sus actividades motoras y de alimentación, durante el crecimiento o el desarrollo y la pubertad. De igual forma, las células adrenales de ratón sintetizan corticosterona *in vivo*, no de una forma arbitraria, sino que cada célula lo hace con una periodicidad similar (Halberg, 1963), al igual que las células pineales perfundidas sintetizan melatonina (Ungar y Halberg, 1963; Leung *et al.*, 1990).

Para estudiar cómo evoluciona un fenómeno rítmico a lo largo del tiempo se hacen mediciones, preferentemente a intervalos fijos. El muestreo se denomina *longitudinal*, si las determinaciones se hacen en un mismo sujeto ($n=1$) durante varios ciclos. El muestreo se denomina *transversal*, si se realiza en varios sujetos ($n>1$) a lo largo de un sólo ciclo. En la actualidad los estudios se suelen realizar de forma mixta; es decir, combinando la toma de muestra longitudinal y transversal.

El muestreo debe realizarse a intervalos lo suficientemente cortos para resolver algunos ritmos con relativas altas frecuencias, y durante un tiempo lo suficientemente largo, para obtener algunos de los componentes de baja frecuencia. Se deberían tomar más de 6 muestras por período, para poder ajustar una función sinusoidal a la variable considerada y obtener un margen de confianza suficiente. También se debe tener en cuenta que un mismo proceso fisiológico puede estar sujeto a más de un ritmo.

El término **circadiano** (del latín *circa*, alrededor de, y *diem*, día) significa que el período del ritmo endógeno se aproxima, pero no suele ser igual, a las 24 horas. Frecuencias mayores o menores que éstas son denominadas **ultradianas** (período $[\tau]$ menor de 20 horas) e **infradianas** ($\tau > 28$ horas), respectivamente. Ritmos de, aproximadamente, 7 días se denominan **circaseptanos**, de, aproximadamente, 30 días **circatrigintanos** y de, aproximadamente, 1 año **circanuales**. Estos tres últimos se encuentran dentro de la clasificación infradiana. A continuación vamos a citar algunos de estos ritmos biológicos, con sus ejemplos respectivos.

REGION DEL DOMINIO	MARGEN	EJEMPLO
Ultradiano	$\tau < 20 \text{ h}$	
circaoctohorano	$\tau = 8 \pm 1 \text{ h}$	Presión sanguínea (PS)
circasemidiano	$\tau = 12 \pm 2 \text{ h}$	Frecuencia cardíaca (FC)
Circadiano	$\tau = 24 \pm 4 \text{ h}$	PS, FC, Temperatura
Infradiano	$\tau > 28 \text{ h}$	
circasemiseptano	$\tau = 3,5 \pm 1 \text{ d}$	Muerte repentina en humana
circaseptano	$\tau = 7 \pm 1 \text{ d}$	Rechazo de transplantes
circadiseptano	$\tau = 14 \pm 3 \text{ d}$	Excreción 17-oxoesteroides
circatrigintano	$\tau = 30 \pm 5 \text{ d}$	PS
circanual	$\tau = 1 \pm 2 \text{ m}$	Prolactina y cortisol

Para considerar un fenómeno *diurno* significa que sucede durante el día y no implica una base circadiana, aunque un ritmo diurno podría ser circadiano. El término *nictameral* relaciona ritmos que ocurren durante el día y la noche; por ejemplo, la secreción de melatonina.

Se ha demostrado que la secreción de hormonas suprarrenales en el hombre, presenta un ritmo circadiano relacionado con los períodos de sueño-vigilia, con un máximo de secreción por la mañana temprano y un mínimo justo antes de dormir. Halberg

(1959,1969) presentó y documentó el ciclo circadiano adrenocortical como una entidad endógena que presenta curso libre, al producir una enucleación bilateral del nervio óptico en los ratones, pero sincronizado por un ciclo que alterna la luz con la oscuridad (Halberg *et al.*, 1954, 1959). Portela *et al.* (1993) e Illera *et al.* (1993c), demostraron la existencia de variaciones circadianas del cortisol en conejos sometidos a distintos ciclos de luz-oscuridad.

Al igual que en otras especies, se han determinado variaciones circadianas de cortisol en el caballo (Hoffsis *et al.*, 1970; James *et al.*, 1970; Bottoms *et al.*, 1972; Seren y Venturini., 1972; Flisinska-Bojanowska *et al.*, 1974; Evans *et al.*, 1977; Kirkpatrick *et al.*, 1977; Larsson *et al.*, 1979; Glardon y Schatzmann, 1982; Stull y Rodiek, 1988; Toutain *et al.*, 1988; Flisinska-Bojanowska *et al.*, 1991).

Además del ritmo circadiano existe una secreción episódica, es decir, la secreción de cortisol no es continua, sino intermitente durante periodos de tiempo de apenas unos minutos. En estos periodos la corteza puede no secretar cortisol durante minutos e incluso durante horas (López-Calderón, 1992; Weitzman *et al.*, 1971). Asimismo, se ha observado este tipo de secreción en el perro (Kemppainen *et al.*, 1984), en el toro (Thun *et al.*, 1981), en la oveja (Fulkerson y Tang, 1979) y en el caballo (Toutain *et al.*, 1988; Nett, 1993b).

Se ha demostrado la existencia de variaciones circadianas de testosterona en conejos (Silván *et al.*, 1990), en corderos (Garnier *et al.*, 1977), en hamsters (Ottenweller *et al.*, 1987), en el toro (Sanwall *et al.*, 1974), en el hombre (Alford *et al.*, 1973; Reinberg *et al.*, 1978), en el semental (Sharma, 1976; Kirkpatric *et al.*, 1976; Bono *et al.*, 1982; Byers *et al.*, 1983) y en ponies (Kumar *et al.*, 1976), así como secreciones de tipo episódico en toros (Thibier, 1976; Lincon, 1976) y en el hombre (Alford *et al.*, 1973) y secreciones de tipo pulsátil en ratas (Bartke *et al.*, 1973).

Estas hormonas también varían estacionalmente en el caballo, con niveles máximos en primavera y verano y niveles mínimos en el invierno (Nett, 1993c). Se ha demostrado la existencia de variaciones en las concentraciones de hormonas gonadales y adrenales en

otras especies (Wong *et al.*, 1983).

Los ciclos reproductores de numerosas especies son ciclos circanuales, ligados al mejor momento para la procreación y el nacimiento. Ciertas características hormonales y seminales, así como muchos aspectos del comportamiento sexual, están afectados por las estaciones; por ejemplo, las células de Sertoli proliferan en el caballo, cuando se acerca la estación sexual (Johnson y Nguyen, 1986; Johnson y Tatum, 1989). Según Berndtson *et al.* (1983) y Johnson y Neaves (1981), la puesta en marcha de la época reproductora está asociada con un aumento en el diámetro de los túbulos seminíferos, junto con el incremento en la concentración de testosterona y en la tasa de espermatogénesis. Durante los meses de noviembre a enero, los testículos son un 25% más ligeros, contienen 35% menos células de Leydig y menos retículo endoplasmático liso. Contienen un 35% menos de células de Sertoli y producen de 40 a 50% menos espermatozoides. El volumen de secreción de las células de Leydig, por testículo, pasa de 12 ml en invierno a 20 ml en verano. Este aumento de volumen procede del incremento en número de las células de Leydig, por testículo (de $1,8 \times 10^9$ en invierno a $2,9 \times 10^9$ en verano) más que de la variación estacional en el tamaño celular (Johnson y Thompson, 1986; Johnson y Thompson, 1987). El aumento en el número de células de Leydig, y por tanto, el aumento del volumen de secreción, se traducen en un cambio en la cantidad de retículo endoplasmático liso por testículo, lo que parece ser el determinante primario de la capacidad esteroidogénica (Zirkin *et al.*, 1980).

La influencia de la estación sobre las características reproductivas del semental se caracteriza por un aumento del tamaño y el peso de los testículos (Berndtson *et al.*, 1983; Johnson y Thompson, 1983; Clay *et al.*, 1987; Pickett *et al.*, 1989), por las características del eyaculado (Pickett *et al.*, 1975; Clay *et al.*, 1987), el establecimiento de la espermatogénesis (Johnson *et al.*, 1991), el establecimiento de la pubertad (Squires, 1993) y el cambio en las concentraciones de testosterona, LH, FSH y estradiol (Raeside, 1978/1979; Berndtson *et al.*, 1974; Thompson *et al.*, 1977, 1978; Harris *et al.*, 1983; Roser y Hughes, 1992a,b). Durante los meses de noviembre a enero la concentración de hormonas envueltas en la función reproductora es menor (Amann, 1993a; Douglas y Umphenour, 1992).

Múltiples estudios, realizados a lo largo de un año, demuestran la influencia del fotoperíodo sobre la producción gonadal de testosterona en sementales (Berndtson *et al.*, 1974; Harris *et al.*, 1983; Thompson *et al.*, 1985; Cox *et al.*, 1988; Clay *et al.*, 1988; Floris *et al.*, 1989) y en la respuesta testicular e hipofisaria a la administración de GnRH (Clay *et al.*, 1989; Blue *et al.*, 1991).

Según Pickett (1993), al aumentar la longitud de los días, en los meses de febrero a abril, se puede maximizar la eficiencia reproductora del semental. La exposición a 16 horas de luz y 8 de oscuridad comenzando a mediados o a finales de diciembre en latitudes norte, y el mantenimiento bajo estas condiciones hasta principios de junio, con 16 horas de luz natural, produce una estimulación máxima de la capacidad reproductora. Para que este proceso sea efectivo el semental debe ser expuesto a las horas de luz decrecientes del otoño, porque, como la mayoría de los reproductores estacionales, el caballo requiere períodos alternantes en la longitud de los días para una apropiada sincronización del ciclo anual.

La actividad gonadal resurge estacionalmente en el caballo al ser estimulado por la mayor longitud de los días de primavera (Argo *et al.*, 1991). Los sementales poseen un ritmo circanual endógeno en la función reproductora, que no está determinado por la relación luz/oscuridad, sino que está sincronizado por los cambios anuales en la longitud de los días (Clay y Clay, 1992; Pickett, 1995). La disminución en la longitud de los días en el otoño actúa como sincronizador del ritmo reproductivo circanual del semental (Clay *et al.*, 1988). Cox *et al.*, (1988) demostraron que al cambiar bruscamente de días largos a cortos se producía una inhibición de la esteroidogénesis, y que al exponer los sementales, de forma continuada, a días largos eran incapaces de mantener elevada su actividad reproductiva y se volvían refractarios a la fotoestimulación.

Como hemos podido observar a lo largo de esta introducción hemos tratado temas, aparentemente, tan independientes como la esteroidogénesis a nivel testicular y en la glándula adrenal, y la influencia del fotoperíodo o los cambios de la luz. En el último apartado de la introducción, la cronofisiología relaciona cada uno de estos temas, aludiendo la sincronización de la ritmicidad hormonal con el medio ambiente.

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES

Para la realización de este estudio se han utilizado un total de 8 animales pertenecientes a la cuadra Valdeolivas situada en el término municipal de Arenas de San Pedro (Ávila), de Pura Raza Española, sexualmente maduros, con edades comprendidas entre los 3 y los 13 años (Naden *et al.*, 1990).

Los sementales fueron alojados en boxes cubiertos, provistos de iluminación natural con unas duraciones aproximadas de los periodos de luz-oscuridad (LO) de:

- LO 16:08 en los días largos,
- LO 09:15 en los días cortos.

En las cuales el primer número se refiere al período de luz (fotofracción) y el segundo a la duración de la oscuridad (escotofracción), en un régimen de luz cíclico de 24 horas.

La alimentación y disponibilidad de agua fue *ad libitum* y el estado sanitario fue controlado semanalmente: temperatura, número de pulsaciones/minuto, número de respiraciones/minuto, estado de las mucosas y tiempo de llenado capilar.

TOMA DE MUESTRAS

1º Material

Fueron utilizados tubos Vacutainer (Becton Dickinson) heparinizados de 16 x 100 mm y agujas especiales para dichos tubos de 21 G (0,9 x 25 mm), así como portagujas especiales para estos tubos.

2° Metodología empleada en la toma de muestras

En nuestro estudio hemos desarrollado la siguiente metodología para llevar a cabo la determinación de los patrones circasemidiano, circadiano, circaseptano y circanual.

En la obtención de las muestras para la determinación del patrón circasemidiano y circadiano de las hormonas testosterona, 17β -estradiol y cortisol, se empleó un estudio transversal con recogida de muestras serialmente dependiente. En este procedimiento, cada semental proporciona 10 muestras de sangre, durante un ciclo de 27 horas. Se recogieron 10 ml de sangre, por punción de la vena yugular, cada tres horas (8:00 a.m., 11:00 a.m., 14:00 p.m., 17:00 p.m., 20:00 p.m., 23:00 p.m., 2:00 a.m., 5:00 a.m., 8:00 a.m. y 11:00 a.m.) tanto en días largos (junio) como en días cortos (noviembre). Las muestras fueron conservadas a 4°C hasta su posterior centrifugado.

Para la determinación del patrón circaseptano, las muestras fueron recogidas diariamente, durante siete días, a la misma hora (11:00 a.m.), obteniendo 7 muestras de cada animal.

El patrón circanual se determinó tomando una muestra semanal (todos los martes), a la misma hora durante 12 meses, obteniendo 52 muestras de cada semental.

Para la obtención del plasma, se utilizó una centrífuga Minifuge RF (Heraeus) a $1.300 \times g$ y a 4°C durante 20 minutos. El plasma obtenido se recogió mediante micropipetas Eppendorf y se almacenó en tubos de plástico de 15 x 50 mm con tapón, sellados con parafilm (American Can Company) previamente etiquetados con el nombre del animal, número de la alicuota, hora de recogida y fecha de la misma.

El plasma se almacenó a -30°C hasta la realización del análisis hormonal.

DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES HORMONALES

1º Validación del Enzimoinmunoanálisis ELISA de competición:

Se realizó la validación del método enzimunoanalítico, ELISA de competición, previamente desarrollado para las distintas hormonas esteroides que se van a analizar (Silván, 1991), con el fin de adaptar este método a la especie animal y a la raza objeto de estudio:

- A) Material y reactivos empleados
- B) Fijación de las condiciones del ensayo: fase sólida, tiempos de incubación, temperatura de realización de las distintas etapas del ensayo, tiempos de lavado y tapizado de las microplacas.
- C) Establecimiento de las diluciones óptimas de trabajo de anticuerpo y conjugado.
- D) Construcción de las curvas patrón.
- E) Desarrollo de la técnica ELISA de competición.
- F) Parámetros de validación.

A) Material y reactivos utilizados:

Material:

- Microplacas de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano y con una capacidad de 350 µl por pocillo (Dynatech).

- Tapas de poliestireno para placas de ELISA (Dynatech).
- Puntas desechables, para pipetas Eppendorf, de 10-200 μ l y de 100-1000 μ l (Comfortips, Eppendorf).
- Puntas de pipeta multicanal, 25-250 μ l (Costar).
- Pipetas automáticas Eppendorf (Merck) de 10-100 μ l y de 100-1000 μ l.
- Pipeta multicanal de ocho canales, de 50-250 μ l (Costar).
- Agitador (Vórtex) Reax 2.000 (Heindolph).
- Pipetas de cristal de doble enrase de 5 y 10 ml (Protón).
- Parafilm (American Can Co).
- Tubos de ensayo de cristal de 16 x 100 mm (Becton Dickinson).
- Lector automático de placas (Eurogenetics).

Reactivos:

- Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) (Merck).
- Ácido 2-[(etilmercurio)benzoico], sal sódica (Thimerosal) (Merck).
- Agua purificada.
- Albúmina sérica bovina, fracción V (Cohn, Sigma & Co).

- Anticuerpos policlonales obtenidos y caracterizados en el Departamento de Fisiología Animal (Facultad de Veterinaria, U.C.M.): antitestosterona, anti17 β -estradiol y anticortisol.
- Conjugados hormona-peroxidasa, preparados y caracterizados en el Departamento de Fisiología Animal (Facultad de Veterinaria, U.C.M.).
- Etanol absoluto (Prolabo).
- Hormonas esteroideas estándar (Steraloids In., N.Y. USA):
 - * 4-Androsten-17 β -ol-3-ona: testosterona.
 - * 1,3,5 (10)-Estratriene-3,17 β -diol: 17 β -estradiol.
 - * 4-Pregnen-11 β , 17 α , 21triol-3,20 dione: cortisol.
- Ortofenilén-diamina dihidroclorhidrato (OPD) (Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA).
- HRP RZ = 3,2 (peroxidasa de rábano picante) (Boehringer Mannheim).
- Di-sodiohidrogenofosfato anhidro (Na₂HPO₄) (Merck).
- Peróxido de hidrógeno: H₂O₂ 30% y 110 vol. (Merck).
- Carbonato sódico (Na₂CO₃) (Merck).
- Citrato di-básico sódico 1^{1/2} Hidrato (NaH₂C₆H₅O₅ · 1^{1/2}) (Panreac).
- Cloruro sódico (NaCl) (Probus).
- Dihidrogenofosfato sódico monohidrato (NaH₂PO₄ · H₂O) (Merck).

- Hidrogenocarbonato sódico (NaHCO_3) (Merck).
- Tween-20 (Merck).

Soluciones tampón

- Carbonato-bicarbonato: 0,05 M: pH: 9,6.

Para 1000 ml de solución:

- * Na_2CO_3 : 1,59 g.
- * NaHCO_3 : 2,93 g.
- * Thimerosal 1%: 5 ml.

Conservar a 4°C.

- Solución tampón ELISA: pH: 7,0.

Para 1.000 ml de solución:

- * $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 5,421 g.
- * Na_2HPO_4 : 8,662 g.
- * NaCl : 8,7 g.
- * Albúmina sérica bovina: 1,0 g.
- * Thimerosal 1%: 5 ml.

Conservar a 4°C.

- Solución tampón sustrato: pH: 4,8.

Para 1.000 ml de solución:

- * $C_6H_8O_7$: 13 g.
- * $NaH_2C_6H_5O_5 \cdot 1^{1/2}$: 28 g.
- * H_2O_2 30% 110 vol: 1ml.
- * Thimerosal 1%: 10 ml.

Conservar a 4°C.

- Solución de lavado: Solución madre (10x).

Para 1.000 ml de solución:

- * NaCl 1,5 M: 87,66 g.
- * Tween-20 0,5%: 5 ml

Conservar a temperatura ambiente.

B) Fijación de las condiciones del ensayo:

Según el criterio de Silván (1991):

- Fase sólida:

Se utilizaron microplacas de poliestireno de 96 pocillos y fondo plano con tapa de poliestireno y parafilm.

- Condiciones de incubación:

- Inmovilización del anticuerpo a la fase sólida: 16 horas a 4°C.
- Reacción de competición: 2 horas en oscuridad a temperatura ambiente.
- Hidrólisis del sustrato: 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente.

La temperatura ambiente no debe superar los 24°C ya que las reacciones enzimáticas no serían estables pudiendo aparecer variaciones en las medidas de absorbancia.

- Tiempos de lavado y tapizado:

- Tiempo de lavado: 5-10 segundos cada uno.
- Tiempo de tapizado con la solución de conjugado: no superior a 10 minutos.

C) Establecimiento de las diluciones óptimas de trabajo de anticuerpo y conjugado:

Para determinar la dilución óptima de anticuerpo y conjugado para las dos hormonas debemos enfrentar diluciones diferentes de anticuerpo y conjugado.

Las diluciones de anticuerpo empleadas son 1/2.000, 1/4.000 y 1/6.000 y para el conjugado 1/20.000, 1/50.000 y 1/60.000.

Las diluciones se distribuyen en la microplaca de la siguiente forma:

- Anticuerpo:

* Columna 1-4: 1/2.000

* Columna 5-8: 1/4.000

* Columna 9-12: 1/6.000

- Conjugado:

* Filas A-B: 1/20.000

* Filas C-E: 1/50.000

* Filas F-H: 1/60.000

A continuación se seleccionan las diluciones que presenten una densidad óptica de 0,6 a 0,8 a 450 nm (Munro y Stabenfeldt, 1984):

- Testosterona: 1/6.000 de anticuerpo y 1/50.000 de conjugado.
- 17 β -estradiol: 1/2.000 de anticuerpo y 1/20.000 de conjugado.
- Cortisol: 1/6.000 de anticuerpo y 1/60.000 de conjugado.

D) Construcción de las curvas patrón:

Para trazar la curva patrón o estándar de cada una de las hormonas se parte de una solución madre, de testosterona, 17 β -estradiol o de cortisol, de concentración conocida: 2 mg/ml en etanol absoluto la cual se va diluyendo sucesivamente hasta obtener una serie de diluciones estándar cuyo margen varíe desde 1 pg hasta 1 ng por pocillo.

Las soluciones estándar se preparan en tubos de cristal de 10 x 50 mm en etanol absoluto, dejando que el alcohol se evapore. A continuación añadimos el conjugado, a la dilución de trabajo, en los distintos tubos con las concentraciones estándar.

El margen de la curva patrón se calcula en función de la concentración esperada de la hormona a determinar, en el plasma de la especie animal utilizada.

E) Desarrollo de la técnica ELISA de competición:

La técnica ELISA de competición se basa en la reacción entre un anticuerpo específico fijado a una fase sólida con una muestra problema que compite, con el conjugado hormona-enzima, por los sitios de unión del anticuerpo. A continuación se mide la fracción de hormona marcada unida al anticuerpo mediante la adición del sustrato y se lee la absorbancia del color desarrollado.

Comprende las siguientes etapas:

- 1) Adsorción de los anticuerpos a la fase sólida.
- 2) Reacción de competición: adición de la muestra y del conjugado.
- 3) Separación de las fracciones de hormona libre y unida a los anticuerpos en la fase sólida.
- 4) Adición del sustrato y del cromógeno.
- 5) Lectura y procesado de los resultados.

1) Adsorción de los anticuerpos a la fase sólida:

Se diluye el anticuerpo convenientemente en solución tampón carbonato/bicarbonato, hasta llegar a la dilución de trabajo correspondiente a cada hormona. A continuación se tapizan los pocillos con 100 μ l, excepto el pocillo A1 que se deja como blanco.

Se sellan las placas con parafilm, se tapan y se incuban a 4°C durante 16 horas.

Seguidamente se lava la placa cinco veces con solución de lavado (200 µl por pocillo) para eliminar el exceso de anticuerpo que no se ha fijado a la placa y se seca enérgicamente mediante volteo en papel de filtro.

2) Reacción de competición

La reacción se produce entre la hormona sin marcar, ya sea de la muestra o estándar, y la hormona conjugada a la enzima u hormona marcada..

Se diluyen los conjugados en solución tampón EIA y se mezclan tanto la muestra problema como la estándar con la dilución de trabajo de conjugado.

Se añade a todos los pocillos 50 µl de tampón ELISA mediante una pipeta multicanal.

Las muestras estándar y problema se determinan por duplicado distribuyéndose 50 µl por pocillo de la siguiente manera (ver figura):

Columna 1: Se añade solamente dilución de conjugado. Es la denominada E₀S.

Columnas 2-3: Se añaden las muestras estándar mezcladas con el conjugado.

Columnas 5-11: Se añaden las muestras problemas mezcladas con el conjugado.

Columna 12: Se añade solamente dilución de conjugado. (E₀E)

DISTRIBUCION DE LA PLACA PARA EIA DE COMPETICION

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANCO	ESTANDAR	E ₀	BLANCO	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	E ₀
B	E ₀	ESTANDAR	E ₀	BLANCO	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	E ₀
C	E ₀	E ₀	E ₀	BLANCO	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	E ₀
D	E ₀	E ₀	E ₀	BLANCO	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	E ₀
E	E ₀	E ₀	E ₀	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	E ₀
F	E ₀	E ₀	E ₀	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	E ₀
G	E ₀	E ₀	BLANCO	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	E ₀
H	E ₀	E ₀	BLANCO	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	E ₀

 BLANCO
  E₀

 ESTANDAR
  MUESTRA

Las placas se sellan con parafilm y con su correspondiente tapa, incubándose durante un período de dos horas en la oscuridad a temperatura ambiente.

3) Separación de las fracciones de hormona libre y unida a los anticuerpos adsorbidos en la fase sólida:

Se realiza por volcado de las placas y posterior lavado con 200 μ l por pocillo (cinco veces). A continuación, los pocillos de la placa se secan perfectamente.

4) Adición del sustrato y del cromógeno:

El sustrato se prepara diluyendo 10 μ l de peróxido de hidrógeno (30%, 110 vol.) en 10 ml de tampón sustrato. Treinta minutos antes de ser utilizado se le añade el cromógeno ortofenilendiamina dihidroclorhidrato (OPD), a una concentración de 1 mg/ml. Esta solución debe ser guardada herméticamente en la oscuridad a temperatura ambiente.

En todos los pocillos de la placa se añaden 100 μ l de la mezcla, se sella con parafilm, se tapa y se incuba una hora en oscuridad a temperatura ambiente.

5) Lectura de las placas:

Una vez transcurrido el tiempo de reacción del sustrato, se procede a la lectura de la densidad óptica del color desarrollado, para ello se emplea un lector automático de ELISA (Eurogenetics) el cual mediante filtros de 450 y 600 nm, realiza una lectura bicromática eliminando el color producido por una posible reacción de fondo.

F) Parámetros de validación:

Los parámetros de validación que se determinan son: especificidad, precisión y repetibilidad, exactitud y sensibilidad.

1º Especificidad

Se determina mediante el estudio de las reacciones cruzadas de los anticuerpos policlonales específicos de cada hormona con distintos esteroides.

2º Precisión y repetibilidad

Consiste en determinar el coeficiente de variación intra e inter-análisis. Para el cálculo del coeficiente de variación intra-análisis, se realizan diez determinaciones, por duplicado y dentro de una misma placa, de distintas concentraciones conocidas de la hormona (5 pg/pocillo, 50 pg/pocillo y 500 pg/pocillo) junto con 20 muestras problema (también por duplicado). Para el cálculo del coeficiente de variación inter-análisis, se repite el mismo análisis durante diez días consecutivos.

3º Exactitud

Se determina calculando el porcentaje de recuperación de concentraciones conocidas de hormona (1,0; 5,0; 10,0 y 15,0 ng/ml muestra) que se añaden a muestras problemas elegidas al azar.

4º Sensibilidad

Puede ser determinada de dos formas:

- Calculando el límite de detección que corresponde a los valores medios de E_0 menos dos desviaciones estándar (D.S.) de ocho ensayos consecutivos. (Abraham, 1975).
- Calculando la concentración de hormona que causa el 50 % de reducción del valor de unión inicial. (Van Weemen y Schuurs, 1975).

2° Análisis hormonal de las muestras

Una vez validada la técnica ELISA de competición para la determinación de testosterona, 17β -estradiol y cortisol, en el plasma equino, se analizan las muestras de plasma de los distintos animales.

La determinación de testosterona, 17β -estradiol y cortisol se realiza directamente en plasma sin extraer.

El primer paso consiste en tapizar con una dilución apropiada del anticuerpo correspondiente los 95 pocillos (100 μ l/pocillo) de la microplaca (el pocillo A1 actuará como blanco) y su posterior sellado con parafilm, tapado e incubación en nevera a 4°C durante 16 horas.

Pasado el tiempo de incubación se realizan cinco lavados con solución de lavado (200 μ l/pocillo) para eliminar el exceso de anticuerpo que no se adsorbe a la placa.

Las muestras se deben preparar para el análisis. Una vez descongeladas se colocan en una gradilla y se introducen en una estufa a 60°C, durante 30 minutos, para su desnaturalización, dado que el esteroide no sufre ningún daño a la temperatura a la que se produce la desnaturalización protéica (Silván, 1991).

A continuación se procede a diluir las muestras en una solución de conjugado en igual proporción: 100 μ l de muestra se diluyen en 100 μ l de conjugado en un tubo de ensayo de cristal de 25 x 70 mm y son cuidadosamente homogeneizadas mediante un vórtex. Utilizamos 50 μ l de esta solución junto con 50 μ l de tampón EIA para tapizar los pocillos de la placa de poliestireno.

Las placas se sellan de nuevo y se incuban durante dos horas a temperatura ambiente en oscuridad.

El último paso consiste en la adición de un sustrato (peróxido de hidrógeno) y el cromógeno (OPD) previo lavado de la placa. La mezcla es preparada media hora antes de ser utilizada, se cierra herméticamente, para prevenir la auto-oxidación y se guarda en oscuridad a temperatura ambiente.

En todos los pocillos de la placa se añaden 100 µl de la mezcla sustrato-cromógeno. Tras sellar la placa con parafilm, se tapa y se deja reaccionar a temperatura ambiente y en la oscuridad durante una hora.

A continuación se realiza la lectura en un lector automático ELISA de lectura bicromática lo que elimina el color producido por una posible reacción de fondo inespecífica. Los filtros utilizados son de 450 nm y 600 nm.

El tiempo que transcurre desde la dilución de las muestras hasta el tapizado del último pocillo no debe sobrepasar los 10 minutos debido a que las variaciones de absorbancia observadas en la determinación de una misma muestra pueden alterar la repetibilidad de la técnica de análisis.

3ª Procesado de los resultados

El procesado de los resultados obtenidos en el análisis hormonal se realiza con la ayuda de un programa informático diseñado especialmente para ello en el Departamento de Informática de la Universidad de California (Davis, USA).

Este programa calcula la curva patrón al enfrentar las concentraciones estándar de cada una de las hormonas con sus respectivas diluciones (eje de abcisas) y el porcentaje de unión de las muestras estándar con el anticuerpo (E/E_0) (eje de ordenadas).

A continuación el programa calcula las concentraciones de las muestras problemas tomando como referencia las curvas patrón. Para expresar estas concentraciones en las unidades correctas es necesario la introducción de un factor de corrección en función de la

dilución que hayamos utilizado. Las concentraciones de cortisol y testosterona se expresan en ng/ml y las de 17 β -estradiol en pg/ml

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

El análisis estadístico de los resultados se realizó por medio del software BMDP (Biomedical Data Program) (Dixon, 1992), en el centro de Cálculo de la Universidad Complutense de Madrid.

Se realizó el análisis de varianza y covarianza con medidas repetidas y el test de comparación múltiple de Bonferroni (BMDP2V), junto con el test no paramétrico de Friedman (BMDP3S) para estudiar la distribución de las variables estadísticas y test de diferencias de medias (BMDP3D), para comprobar si las distintas variables poseen diferencias estadísticamente significativas.

Las variables estadísticas analizadas son:

- Número de animales.
- Concentraciones plasmáticas de testosterona (T), 17 β -estradiol (E₂) y cortisol (C).
- Hora y/o día de la toma de muestra.

RESULTADOS

1. Diluciones óptimas de anticuerpo

Los resultados obtenidos tras las pruebas realizadas para calcular la dilución de trabajo óptima, a emplear, de anticuerpo para EIA de competición fueron:

* Anti-testosterona: 1/6.000.

* Anti-17 β -estradiol: 1/2.000.

* Anti-cortisol: 1/6.000.

2. Diluciones óptimas de conjugado

Este factor es crítico para una puesta a punto óptima del método. Los resultados fueron los siguientes:

* Conjugado HRP-testosterona: 1/50.000.

* Conjugado HRP-17 β -estradiol: 1/20.000.

* Conjugado HRP-cortisol: 1/60.000.

3. Validación del EIA de competición para las hormonas esteroideas (testosterona, 17 β -estradiol y cortisol).

- Precisión y repetibilidad:

Cálculo de los coeficientes de variación intra e inter-ensayo.

$$\% CV = \text{Desviación estándar/medio} \times 100$$

En nuestro caso, los % CV intra e inter-análisis fueron siempre menores del 7% para todas las hormonas estudiadas.

- Exactitud

Los porcentajes de recuperación en todos los casos oscilan entre 85-95% ($p < 0,05$).

- Sensibilidad

Se determinó de dos formas:

- Límites de detección:

Testosterona: 6 pg/pocillo.

17 β -estradiol: 0,3 pg/pocillo.

Cortisol: 3 pg/pocillo.

Sensibilidad al 50 % de unión:

Testosterona: 83 pg/pocillo

17 β -estradiol: 8,3 pg/pocillo

Cortisol: 58,82 pg/pocillo.

4. Concentraciones plasmáticas de las hormonas testosterona, 17 β -estradiol y cortisol a lo largo del año.

En la Gráfica 1 queda reflejado el patrón circanual para la hormona testosterona. La concentración máxima aparece en el mes de julio, más concretamente, en la cuarta semana, con un valor de $4,57 \pm 0,73$ ng/ml; mientras que, la concentración mínima la obtuvimos en el mes de febrero con una media de $1,01 \pm 0,1$ ng/ml. El nadir corresponde a la tercera semana de febrero, con una concentración de $0,85 \pm 0,05$ ng/ml.

La Tabla 1 ilustra las concentraciones (media $\pm$ ES), con las que se ha construido la gráfica citada.

El análisis de varianza con medidas repetidas revela, según el test de comparaciones múltiple de Bonferroni, que existe una variación significativa de la concentración de testosterona ($p < 0,05$) a lo largo del año. El test no paramétrico de Friedman demuestra esta misma variación.

La Gráfica 2 ilustra el patrón circanual de la secreción de 17 β -estradiol. Las máximas concentraciones se obtuvieron la primera semana del mes de julio con $116,58 \pm 21,94$ pg /ml. Seguidamente comienza el descenso brusco hasta llegar a la quinta semana del mes de marzo, donde apareció un nadir de $16,22 \pm 1,66$ pg/ml.

El análisis estadístico (test de Bonferroni y de Friedman) mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En la Tabla 2 aparecen las concentraciones de 17 β -estradiol (media $\pm$ ES) a lo largo del año.

En la Gráfica 3 está recogido el patrón circanual de cortisol, donde aparece la concentración mínima correspondiente a la tercera semana del mes de marzo, con valores de $56,07 \pm 9,37$ ng/ml y la concentración máxima correspondiente a la segunda semana del

mes febrero, con valores de $319,18 \pm 53,10$ ng/ml.

En la Tabla 3 están detalladas las concentraciones de cortisol (media $\pm$ ES) sobre las que se ha construido la gráfica.

El análisis de la varianza con medidas repetidas fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en los dos test empleados (test de Bonferroni y test de Friedman).

5. Concentraciones plasmáticas de testosterona, 17 β -estradiol y cortisol a lo largo de la semana.

En la Gráfica 4 está representado el patrón circaseptano para la hormona testosterona, con unos niveles máximos a comienzos de semana $1,58 \pm 0,23$ ng/ml y unos niveles mínimos a mediados de la misma con $0,92$ ng/ml $\pm 0,07$ ng/ml.

La Tabla 4 revela las concentraciones (media $\pm$ ES) semanales de testosterona.

El análisis estadístico nos muestra que existe una variación significativa de la concentración de testosterona a lo largo de la semana ($p < 0,05$), tanto en el test de Bonferroni, como en el test de Friedman.

En la Gráfica 5 está reflejado un patrón circaseptano en la secreción del 17 β -estradiol, con niveles máximos el sábado, con concentraciones de $43,64 \pm 7,40$ pg/ml y valores mínimos los jueves, con una concentración de $29,00 \pm 3,43$ pg/ml, existiendo diferencias, estadísticamente significativas ($p < 0,05$), entre los días de la semana.

En la Tabla 4 se encuentran representados los valores medios (media $\pm$ ES) de las concentraciones de esta hormona, a lo largo de la semana.

En la Gráfica 6 se exponen las concentraciones de cortisol obtenidas a lo largo de la semana. La concentración máxima se obtuvo el martes ($112,10 \pm 14,80$ ng/ml)

manteniéndose en altos niveles hasta finales de semana.

En la Tabla 4 aparecen todas las concentraciones sobre las que se ha construido la gráfica citada. El análisis estadístico fue significativo ($p < 0,05$) para los dos test empleados (test de Bonferroni y test de Friedman).

6. Concentraciones plasmáticas de testosterona, 17β -estradiol y cortisol a lo largo de días cortos y largos.

La Gráfica 7 refleja la existencia de un patrón circadiano de la testosterona en los días cortos, con un pico máximo de testosterona de $2,10 \pm 0,36$ ng/ml a las dos de la tarde y un segundo pico a las once de la noche con una concentración de $1,47 \pm 0,11$. El primer nadir lo encontramos a las ocho de la tarde con un valor de $0,97 \pm 0,10$ ng/ml. El segundo mínimo de $0,88 \pm 0,10$ ng/ml se produce a las 8 de la mañana del día siguiente.

En la Tabla 5 aparecen los valores (media $\pm$ ES) sobre los que ha sido construida la gráfica.

El análisis de varianza muestra diferencias, estadísticamente significativas ($p < 0,05$), en la concentración de testosterona a lo largo de los días cortos.

El patrón circadiano de días cortos para la hormona 17β -estradiol aparece en la Gráfica 8. El primer nadir aparece a las once de la mañana, con un valor de $31,60 \pm 3,07$ pg/ml, obteniéndose la máxima concentración a las dos de la mañana $47,52 \pm 7,40$ pg/ml.

En el análisis estadístico no aparecieron variaciones significativas ($p > 0,05$), a lo largo del día.

Todos los valores obtenidos a lo largo del día para el 17β -estradiol están representados en la Tabla 6 (media $\pm$ ES).

En la Gráfica 9 se detalla el patrón circadiano en la secreción de cortisol en los días cortos. Nuestro valor máximo se observó a las ocho de la mañana con una concentración de $129,76 \pm 10,75$ ng/ml. El nadir se producía a las ocho de la tarde, con un valor de $58,95 \pm 7,29$. Los valores sobre los que se construyó la gráfica aparecen reflejados en la Tabla 7.

El análisis de la varianza mostró diferencias significativas, en el test de Bonferroni y de Friedman, en la secreción de cortisol a lo largo del día ($p < 0,05$).

En la Gráfica 10 se representan las concentraciones de testosterona en los días largos, no encontrando diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), pero con unas variaciones muy semejantes a las obtenidas en los días cortos. En la Tabla 5 están recogidas las concentraciones de testosterona en los días largos.

En la Gráfica 11 están representadas las variaciones en la concentración de la hormona 17 β -estradiol en los días largos y observamos que tampoco existían variaciones estadísticamente significativas ($p > 0,05$). En la Tabla 6 aparecen los valores medios (media $\pm$ ES) de esta hormona, a lo largo del día.

En la Gráfica 12 se muestra el patrón circadiano del cortisol para los días largos. La máxima concentración se obtuvo a las ocho de la mañana con un valor de $140,22 \pm 24,58$ ng/ml. El nadir se obtuvo a las once de la noche, con una concentración media de $66,73 \pm 12,71$ ng/ml. En la Tabla 7 quedan recogidas las concentraciones de esta hormona a lo largo del día.

Aparecieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la secreción de cortisol, en los días largos, en los dos test empleados.

En las Gráficas 13, 14 y 15 se pueden comparar las diferencias en las concentraciones de la testosterona, 17 β -estradiol y cortisol, respectivamente, en los días cortos y largos.

Encontramos diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las concentraciones obtenidas en los días largos y cortos, en el caso de las dos primeras hormonas. En el caso de la testosterona, estas diferencias posiblemente se deban a variaciones en la concentración, más que a variaciones en el patrón.

TABLA 2.- CONCENTRACIONES PLASMATICAS ANUALES DE 17 β -ESTRADIOL *

	43,00 $\pm$ 6,61		116,58 $\pm$ 21,94
	36,63 $\pm$ 4,50		93,57 $\pm$ 17,76
ENERO	37,55 $\pm$ 4,57	JULIO	96,70 $\pm$ 18,47
	40,83 $\pm$ 3,13		105,13 $\pm$ 19,94
	33,40 $\pm$ 3,97		105,44 $\pm$ 19,06
	40,55 $\pm$ 4,71		79,80 $\pm$ 14,79
FEBRERO	36,72 $\pm$ 4,63	AGOSTO	87,67 $\pm$ 15,83
	39,25 $\pm$ 2,65		63,02 $\pm$ 10,79
			54,80 $\pm$ 9,45
	41,67 $\pm$ 4,54		
	31,49 $\pm$ 5,76		53,31 $\pm$ 9,88
MARZO	22,40 $\pm$ 2,97	SEPTIEMBRE	50,93 $\pm$ 8,28
	20,23 $\pm$ 2,51		47,52 $\pm$ 6,18
	16,22 $\pm$ 1,66		46,76 $\pm$ 7,41
	26,63 $\pm$ 4,22		44,40 $\pm$ 7,26
	34,68 $\pm$ 1,39		36,27 $\pm$ 5,61
ABRIL	35,04 $\pm$ 1,97	OCTUBRE	54,28 $\pm$ 9,80
	36,36 $\pm$ 3,14		47,92 $\pm$ 7,23
	37,85 $\pm$ 3,03		26,84 $\pm$ 3,54
	29,20 $\pm$ 2,45		37,63 $\pm$ 5,59
MAYO	27,43 $\pm$ 3,37	NOVIEMBRE	54,12 $\pm$ 9,33
	28,47 $\pm$ 4,18		38,44 $\pm$ 5,97
			42,56 $\pm$ 7,16
	23,34 $\pm$ 2,78		
	57,58 $\pm$ 10,08		37,29 $\pm$ 6,83
JUNIO	111,65 $\pm$ 19,48	DICIEMBRE	32,81 $\pm$ 0,51
	112,33 $\pm$ 18,26		31,58 $\pm$ 4,98
	114,73 $\pm$ 21,09		41,36 $\pm$ 7,09

(*) Concentraciones de 17 β -estradiol expresadas en pg/ml

TABLA 3.- CONCENTRACIONES PLASMATICAS ANUALES DE CORTISOL*

ENERO	117,17 ± 20,18	JULIO	87,96 ± 11,31
	75,93 ± 7,60		104,79 ± 19,45
	97,29 ± 9,36		85,00 ± 15,18
	89,45 ± 15,78		88,22 ± 15,59
FEBRERO	142,31 ± 27,45	AGOSTO	98,50 ± 17,45
	319,18 ± 53,10		92,64 ± 18,17
	249,70 ± 47,14		109,20 ± 19,18
	132,16 ± 25,21		124,32 ± 17,90
MARZO	98,65 ± 17,68	SEPTIEMBRE	147,72 ± 17,40
	68,94 ± 11,91		95,31 ± 15,82
	56,07 ± 9,37		83,35 ± 12,53
	78,65 ± 13,70		84,28 ± 13,51
ABRIL	100,43 ± 19,80	OCTUBRE	95,26 ± 16,20
	101,66 ± 19,03		103,68 ± 17,12
	118,91 ± 19,71		114,94 ± 13,60
	143,42 ± 28,87		84,89 ± 13,12
MAYO	83,55 ± 15,30	NOVIEMBRE	77,51 ± 9,60
	79,98 ± 11,84		76,21 ± 9,74
	80,76 ± 14,94		93,17 ± 17,87
	74,78 ± 13,97		175,46 ± 24,54
JUNIO	93,85 ± 14,95	DICIEMBRE	140,12 ± 26,64
	69,47 ± 9,97		103,02 ± 14,97
	113,10 ± 16,08		163,36 ± 30,18
	130,33 ± 25,95		187,25 ± 34,23
	188,27 ± 21,35		109,22 ± 16,59
	205,56 ± 39,79		98,73 ± 13,04

(*) Concentraciones de cortisol expresadas en ng/ml.

**TABLA 4.- CONCENTRACIONES PLASMATICAS SEMANALES DE LAS
HORMONAS ESTEROIDES**

	TESTOSTERONA¹	ESTRADIOL²	CORTISOL³
DOMINGO	1,23 ± 0,19	39,35 ± 6,54	57,71 ± 10,03
LUNES	1,48 ± 0,28	40,78 ± 6,83	54,36 ± 10,45
MARTES	1,58 ± 0,23	39,53 ± 4,40	112,10 ± 14,80
MIÉRCOLES	1,34 ± 0,19	39,22 ± 6,00	84,16 ± 15,33
JUEVES	1,17 ± 0,13	29,00 ± 3,43	99,84 ± 17,07
VIERNES	1,02 ± 0,10	35,44 ± 4,64	93,80 ± 14,77
SÁBADO	0,92 ± 0,07	43,64 ± 7,40	87,36 ± 15,10

Concentraciones plasmáticas expresadas en: (1) ng/ml.; (2) pg/ml; (3) ng/ml.

TABLA 5.- CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE TESTOSTERONA*

	DIAS CORTOS	DIAS LARGOS
08:00	1,20 ± 0,24	2,05 ± 0,37
11:00	1,51 ± 0,30	2,61 ± 0,41
14:00	2,10 ± 0,36	2,74 ± 0,48
17:00	2,10 ± 0,13	2,79 ± 0,56
20:00	0,97 ± 0,10	1,95 ± 0,29
23:00	1,47 ± 0,11	2,14 ± 0,29
02:00	1,26 ± 0,17	2,32 ± 0,44
05:00	1,00 ± 0,08	1,86 ± 0,23
08:00	0,88 ± 0,10	1,74 ± 0,23
11:00	1,18 ± 0,10	2,25 ± 0,29

(*) Concentraciones expresadas en ng/ml.

TABLA 6.- CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE 17 β -ESTRADIOL *

	DIAS CORTOS	DIAS LARGOS
08:00	32,24 $\pm$ 4,32	70,37 $\pm$ 6,46
11:00	31,60 $\pm$ 3,07	70,50 $\pm$ 4,35
14:00	35,53 $\pm$ 5,23	71,90 $\pm$ 5,63
17:00	33,78 $\pm$ 3,79	65,02 $\pm$ 7,69
20:00	31,91 $\pm$ 3,96	62,55 $\pm$ 1,73
23:00	40,35 $\pm$ 7,61	70,08 $\pm$ 9,40
02:00	47,52 $\pm$ 7,40	63,71 $\pm$ 8,25
05:00	40,59 $\pm$ 7,65	73,03 $\pm$ 10,09
08:00	45,99 $\pm$ 6,73	63,82 $\pm$ 5,32
11:00	39,81 $\pm$ 5,71	60,16 $\pm$ 6,40

(*) Concentraciones expresadas en pg/ml.

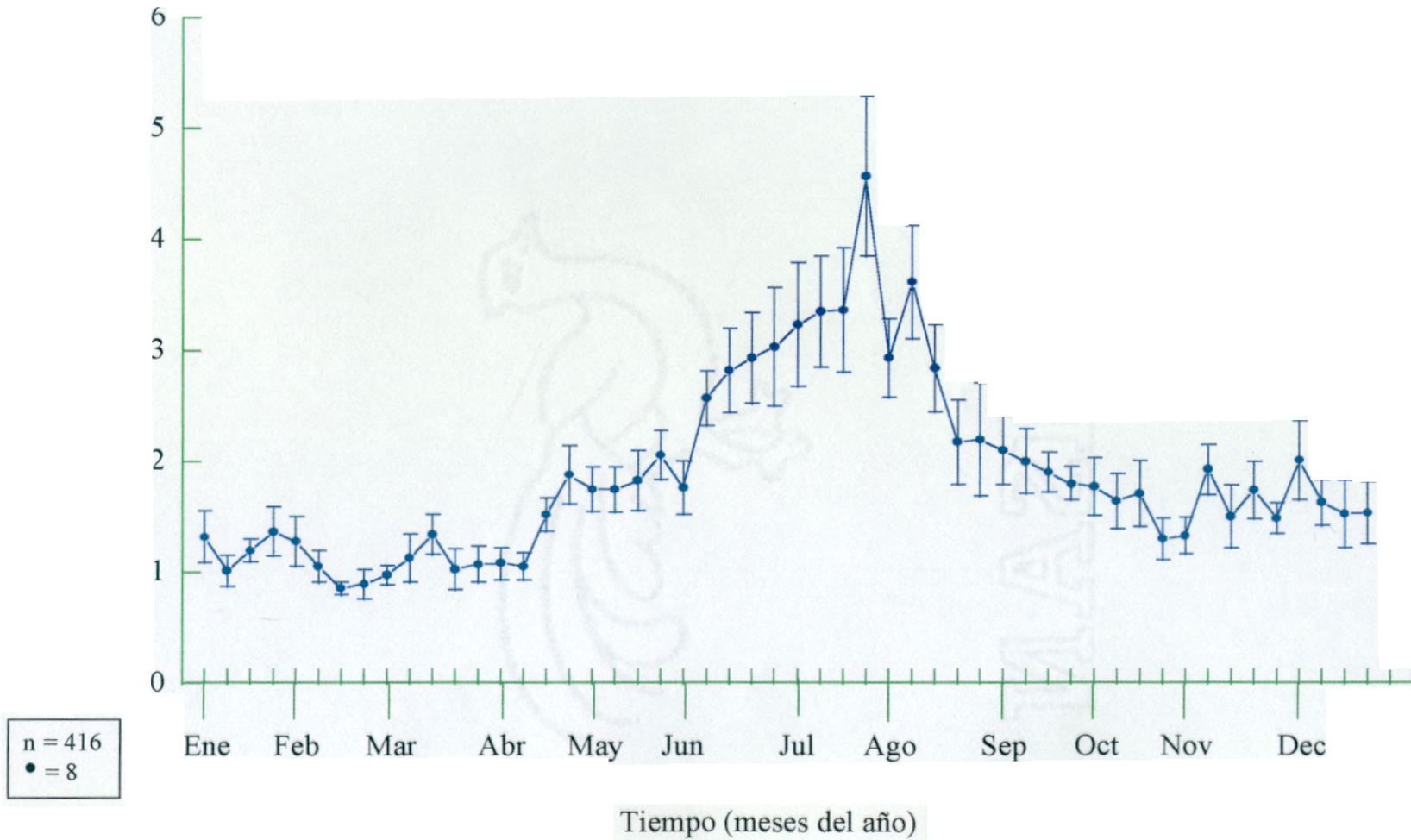
TABLA 7.- CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE CORTISOL *

	DIAS CORTOS	DIAS LARGOS
08:00	129,76 ± 10,75	140,22 ± 24,58
11:00	93,17 ± 17,87	117,49 ± 21,32
14:00	78,86 ± 13,65	109,86 ± 17,15
17:00	63,89 ± 6,41	71,77 ± 13,69
20:00	58,95 ± 7,29	79,43 ± 11,35
23:00	88,00 ± 8,92	66,73 ± 12,71
02:00	91,88 ± 10,39	82,71 ± 12,91
05:00	110,29 ± 13,70	101,57 ± 7,17
08:00	167,78 ± 18,75	149,76 ± 27,85
11:00	131,53 ± 23,78	87,84 ± 16,17

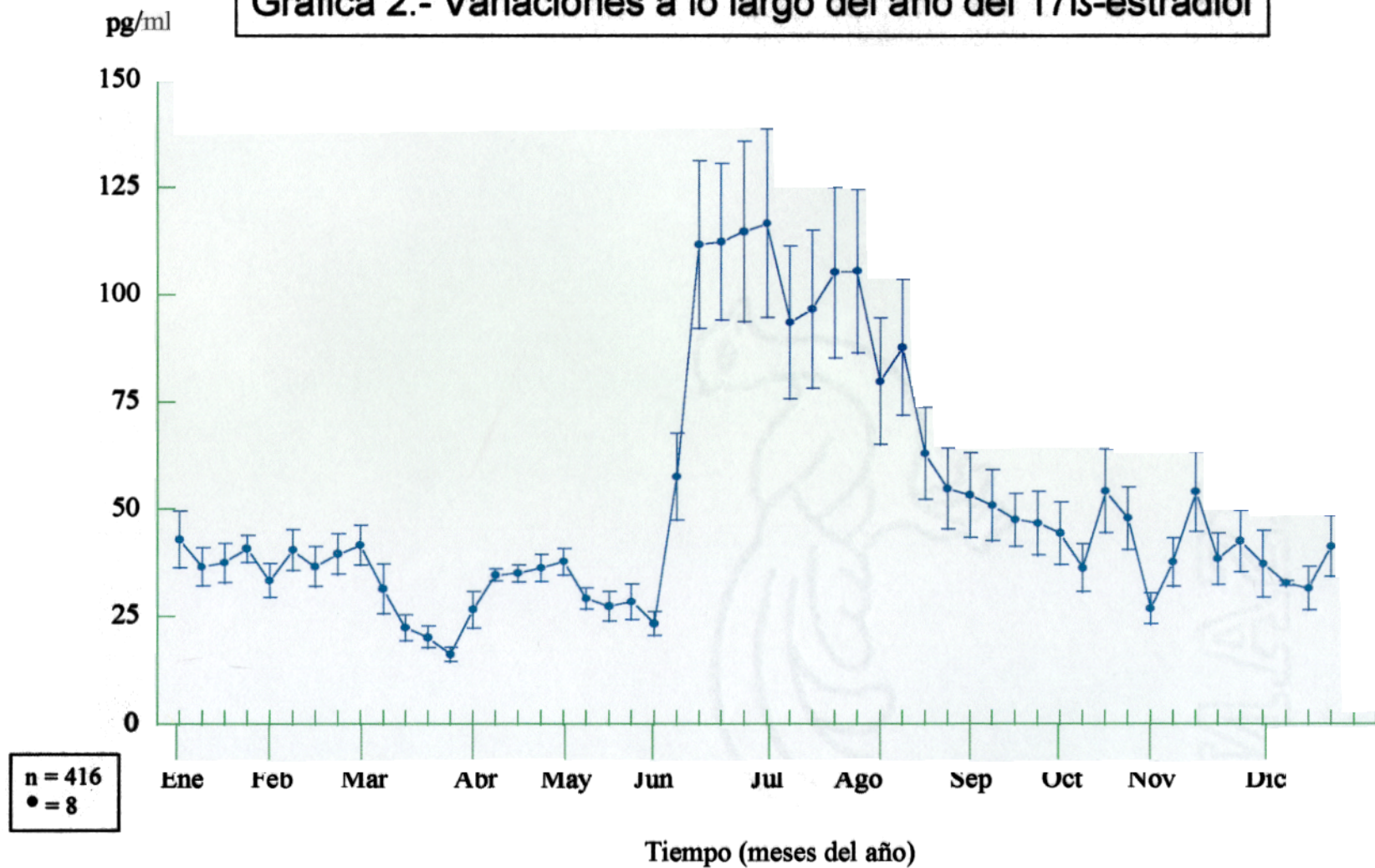
(*) Concentraciones expresadas en ng/ml.

ng/ml

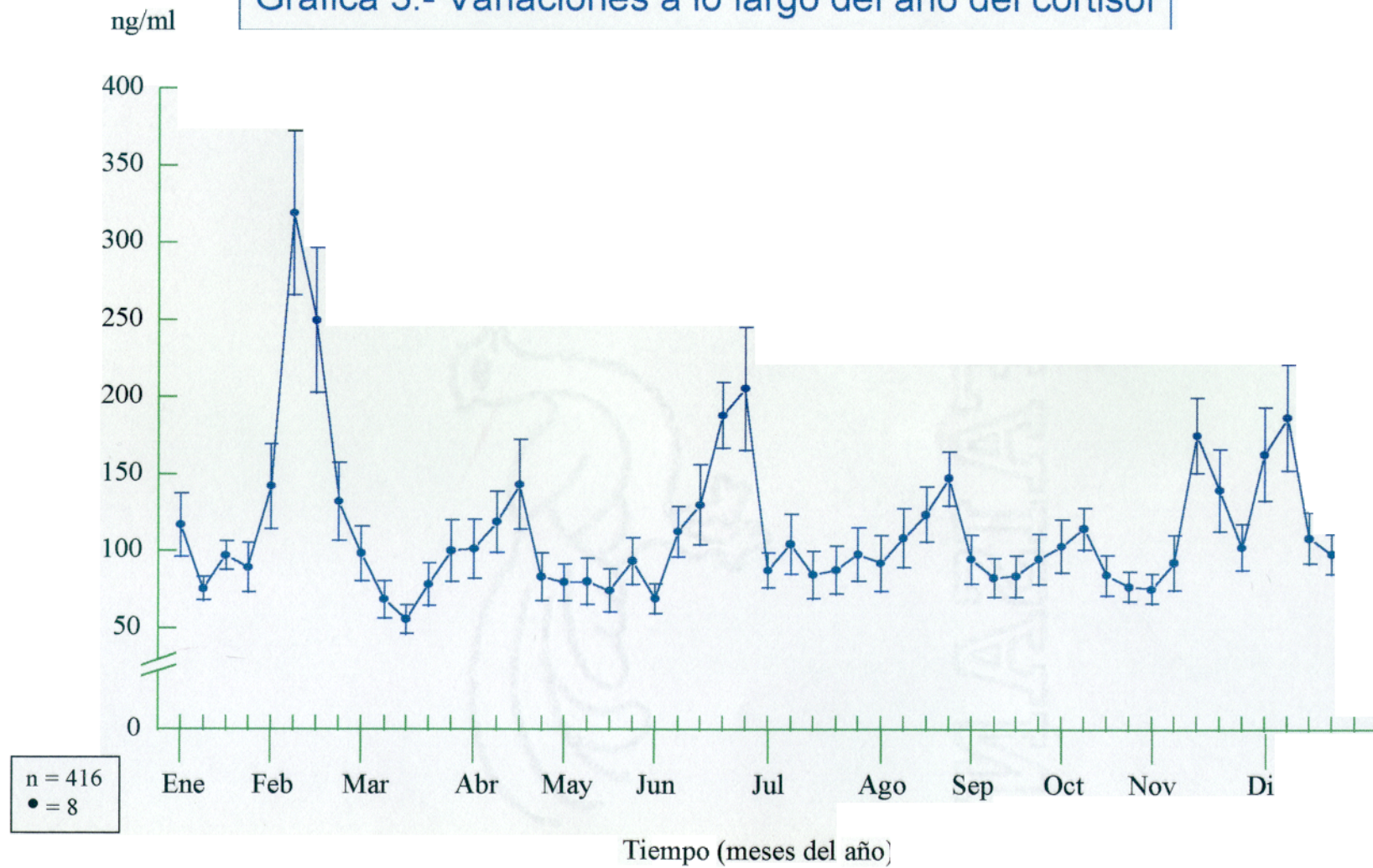
Gráfica 1.- Variaciones a lo largo del año de la testosterona

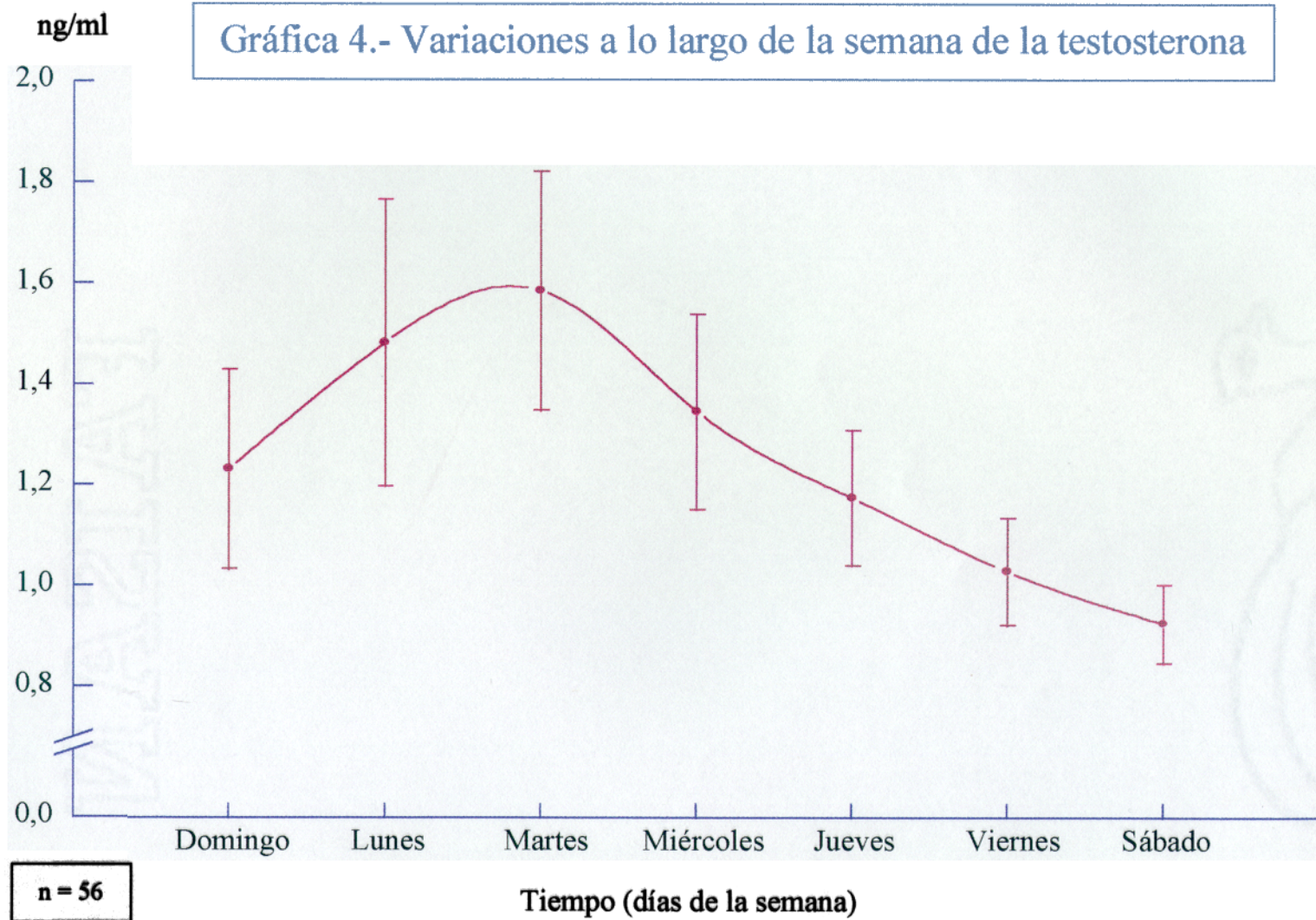


Gráfica 2.- Variaciones a lo largo del año del 17 β -estradiol

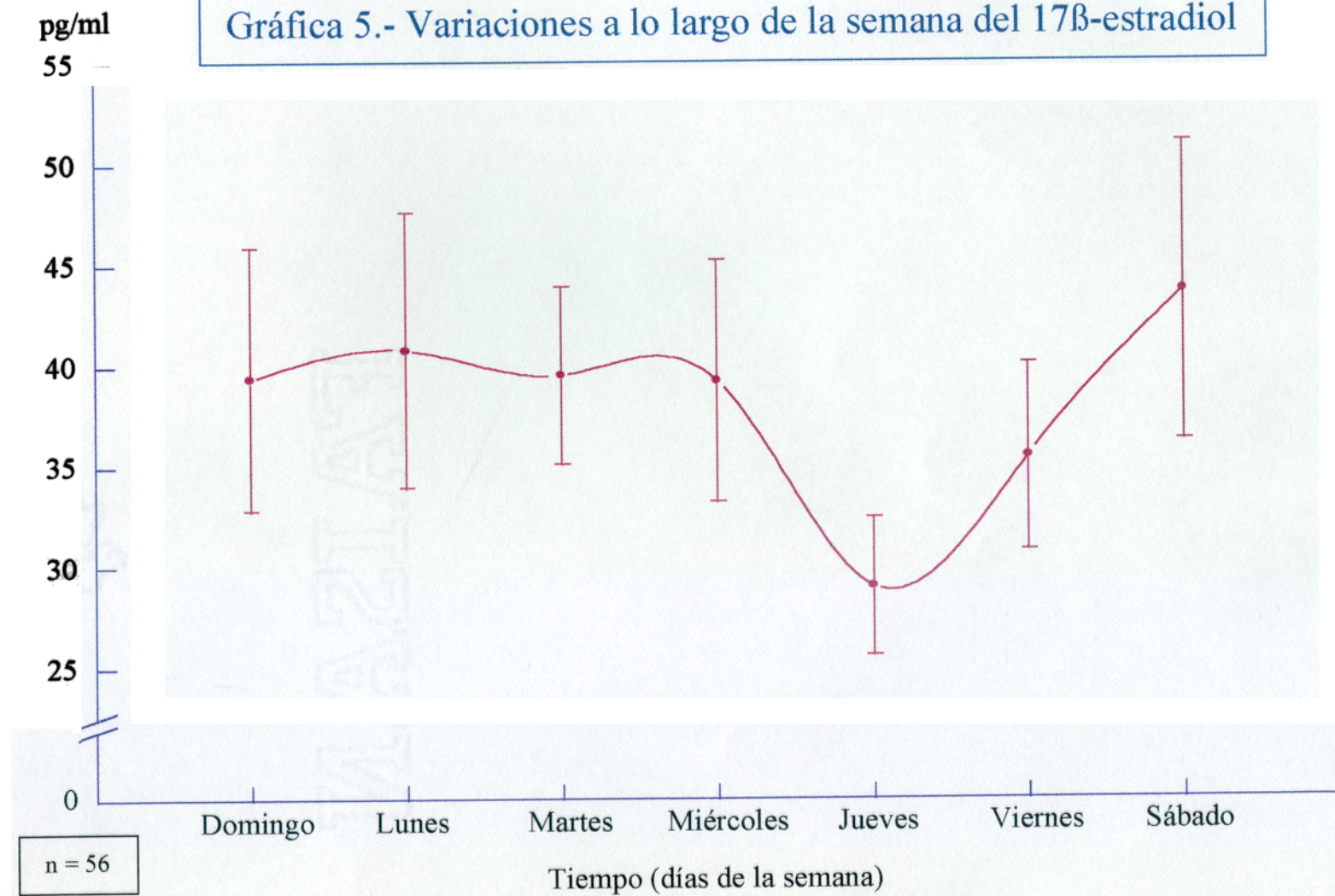


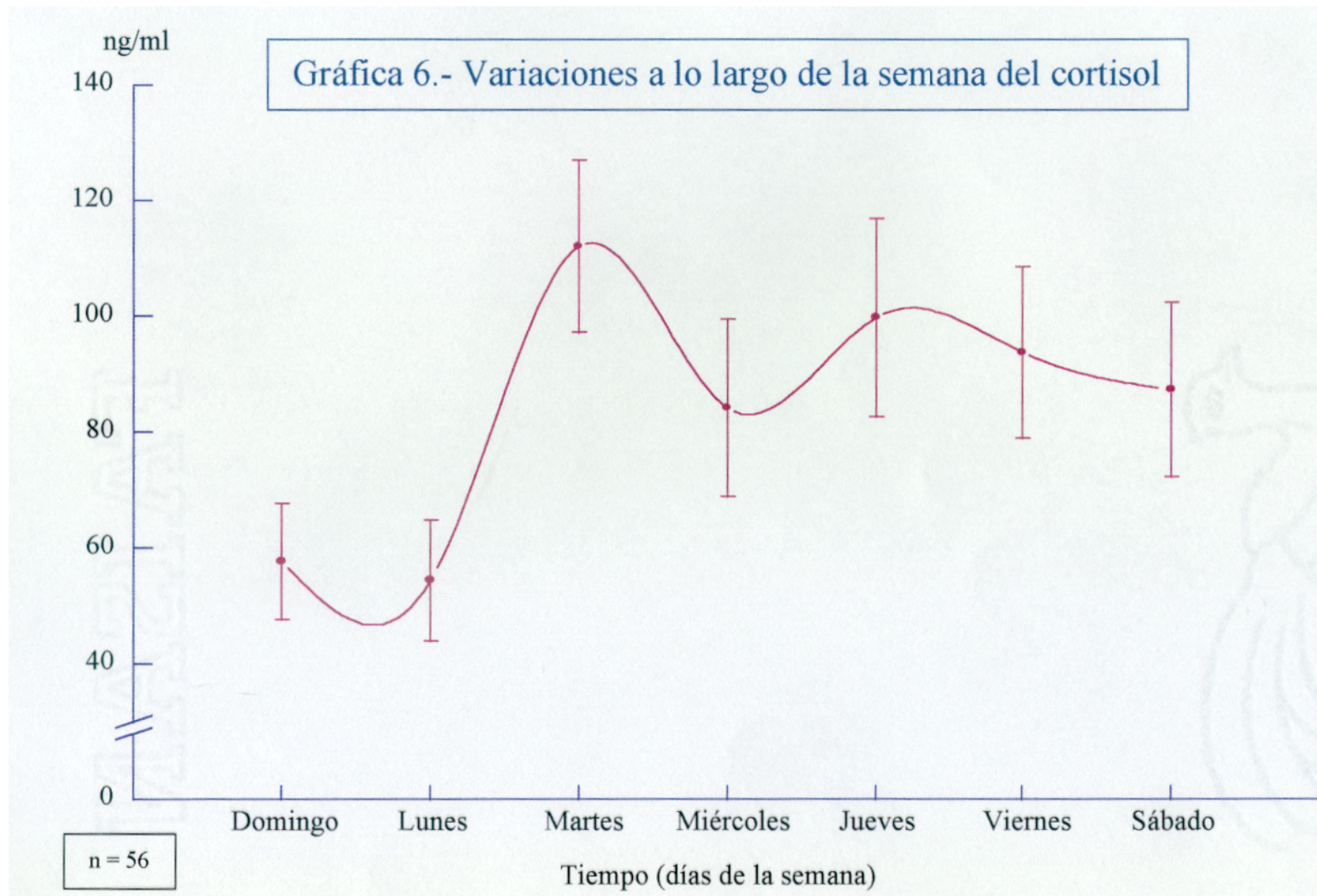
Gráfica 3.- Variaciones a lo largo del año del cortisol

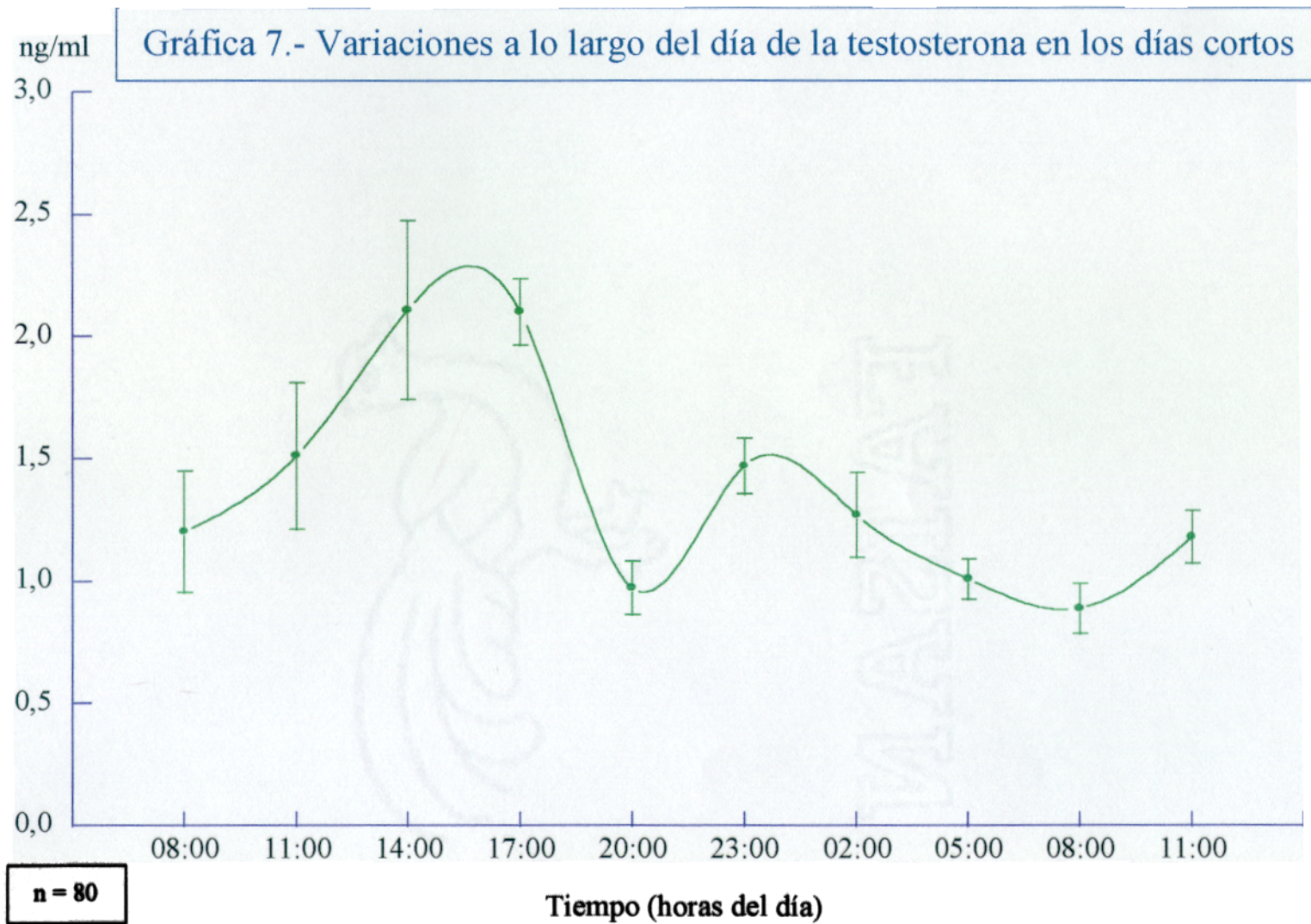




Gráfica 5.- Variaciones a lo largo de la semana del 17 β -estradiol







ABRIR CONTINUACIÓN RESULTADOS

