

**Maria José Martínez-Alesón Sanz**

***"REPERCUSIONES DEL IMPLANTE DE ANABOLIZANTES ANDROGENICOS  
SOBRE LOS PERFILES HORMONALES DE GANADO VACUNO"***

**Departamento de Fisiología Animal  
Facultad de Veterinaria  
Universidad Complutense de Madrid  
1993**

**"REPERCUSIONES DEL IMPLANTE  
DE ANABOLIZANTES ANDROGENICOS  
SOBRE LOS PERFILES HORMONALES  
DE GANADO VACUNO"**

**MEMORIA que para la colación  
del grado de Doctor, presenta la  
Licenciada en Veterinaria Dña.  
Maria José Martínez-Alesón Sanz.**

**ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA  
BAJO LA DIRECCION DE:**



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

**Licenciada Dña. Maria José  
Martínez-Alesón Sanz, aspirante al  
grado de Doctor en Veterinaria.**

**Madrid, Febrero, 1993**

**ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA  
GRACIAS A UN PROYECTO DE COLABORACION  
ENTRE EL EXCMO. AYUNTAMIENTO DE MADRID  
Y LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE A AMBAS  
INSTITUCIONES NUESTRO AGRADECIMIENTO**

## AGRADECIMIENTOS

Aún a riesgo de no citar a todas las personas que han contribuido de alguna manera a la realización de este trabajo, quisiera agradecer profundamente a:

- Dr. D. Juan Carlos Illera del Portal, Profesor Titular del Dpto. Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria de la U.C.M. y Director de este trabajo, todo su apoyo, entrega y esfuerzo. Sus conocimientos, experiencias y "brillantes ideas", sin las cuales el resultado final obtenido, claramente no hubiera sido el mismo. Su capacidad de trabajo y su espíritu de superación es el reflejo del camino a seguir por todo investigador.
  
- Dr. D. Mariano Illera Martin, Catedrático-Director del Dpto. de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria de la U.C.M. , por su imprescindible apoyo en la consecución de todos los medios que en la investigación he podido necesitar. Es el investigador que siempre se quiere tener como maestro, conoce la palabra adecuada para el fenómeno que se desea describir y la gran experiencia que aclara muchas dudas.
  
- Dra. Dña. Gema Silván Granada, Profesora del Dpto. de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria de la U.C.M., amiga y compañera, cuyos trabajos notables en este tema han facilitado la realización de este estudio.
  
- D. Fernando Pescador, Director del Servicio Informático de Somosaguas y a María José Álvarez, por toda su inestimable colaboración en la realización del tratamiento estadístico e informático de los resultados obtenidos .
  
- D. Juan Carlos Bravo y a DEMOSA, por proporcionarnos sus instalaciones para la obtención de las muestras que para toda nuestra investigación hemos requerido.

- A todos mis compañeros del Departamento (Ana P., Ana B., May, Ramón, Joaquin, Pedro, María José Illera, María José Mazarrón) de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria de la U.C.M., por haberme animado en todo momento.
  
- A mi padre, que me ha inculcado el amor por el mundo de la Veterinaria, y a quien le debo todo lo que soy.
  
- A José Luis por su apoyo moral, paciencia y ayuda que me ha prestado para la realización de este trabajo.

*A mi familia*

# **CONTENIDO**

## CONTENIDO

<b>-OBJETIVO</b>	2-4
<b>-INTRODUCCION:</b>	6-61
Metabolismo de las proteínas	9-18
Biosíntesis de las hormonas esteroides	19-31
Hormonogénesis de la glándula tiroides	32-36
Mecanismos de acción	37-41
Anabolizantes	42-49
Seguridad para el consumidor	50-54
Métodos inmunológicos	55-61
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	63-100
A) Animales	
B) Técnica de implantación	
C) Implante	
D) Recogida y procesado de las muestras	



## E) Determinaciones hormonales de las muestras de plasma

### **RESULTADOS**

102-150

1. Diluciones óptimas de anticuerpos
2. Diluciones óptimas de conjugado
3. Trazado de las curvas patrón
4. Validación del ELISA de competición para hormonas esteroides (cortisol, 17 $\beta$ -estradiol, progesterona, testosterona, trenbolona)
5. Intervalo de medición y límite de detección de los test comerciales para hormonas tiroideas.
6. Variaciones de pesos
7. Concentraciones plasmáticas

### **DISCUSION**

152-176

### **CONCLUSIONES**

178-179

### **BIBLIOGRAFIA**

181-208

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

- **A:** Andrógeno
- **ABP:** Androgen Binding Protein
- **ABTS:** Acido 2,2'-Azino-di(3-etilbenzotiazolino sulfónico)
- **Ac:** Anticuerpo
- **ADP:** Adenosindifosfato
- **Ag:** Antígeno
- **ASP:** Anticuerpo Unido a Fase Sólida.
- **ATP:** Adenosintrifosfato
- **BSA:** Albúmina Sérica Bovina
- **CA:** Cromatografía de Afinidad
- **CHOL:** Colesterol
- **% CV:** Coeficiente de Variación
- **DA:** Doble Anticuerpo
- **DASP:** Doble Anticuerpo en Fase Sólida.
- **DES:** Dietilestilbestrol

- **DHT:** Dihidrotestosterona
- **DIT:** Diodotirosina
- **DNA:** Acido Desoxirribonucleico
- **E:** Esteroide
- **E2:** 17 $\beta$ -Estradiol
- **E3:** Estriol
- **EIA:** Enzimoimmunoanálisis
- **ELISA:** Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- **EMIT:** Enzyme multiplied Immunoassay Technique
- **IRMA:** Técnica Inmunoradiométrica
- **E.S.M.:** Error Estándar de la Media
- **FAO:** Organización para la Alimentación y la Agricultura
- **FSH:** Follicle Stimulating Hormone
- **GnRH:** Gonadotrophin Releasing Hormone
- **H:** Hormona sin marcar o libre
- **H\*:** Hormona marcada
- **HPLC:** Cromatografía Líquida de Alta Resolución

- **HRP:** Horse Radish Peroxidase (Peroxidasa de rábano picante)
- **HS:** Hemisuccinato
- **HSA:** Albúmina Sérica Humana
- **IgG:** Inmunoglobulina G
- **IRMA:** Técnica Inmunoradiométrica
- **L.D.:** Límite de detección
- **LH:** Luteinizing Hormone
- **mg:** Miligramos
- **MIT:** Monoiodotirosina
- **ml:** Mililitros
- **NAD:** Dinucleótido Nicotinamida Adenina
- **NADP:** Fosfato de Nicotinamida-adenindinucleótido
- **ng:** Nanogramos
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **OPD:** Ortofenilén-Diamina
- **P<sub>4</sub>:** Progesterona
- **PBS:** Tampón Fosfato Salino

- **pg:** Picogramos
- **PREG:** Pregnenolona
- **R.C.:** Reacción Cruzada
- **RER:** Retículo Endoplasmático
- **RIA:** Radioinmunoanálisis
- **RNA:** Acido Ribonucleico
- **S. 50%:** Sensibilidad al 50 % de unión
- **T:** Testosterona
- **T3:** Tri-iodotironina
- **T4:** Tetra-iodotironina o Tiroxina
- **Tº:** Temperatura
- **Tº:** Tiempo
- **TBA:** Acetato de Trenbolona
- **TBG:** Globulina Fijadora de Tiroxina
- **TBPA:** Prealbúmina Fijadora de Tiroxina
- **Tc:** Tirocalcitonina
- **TG:** Tiroglobulina

- **TSH:**        **Hormona Estimulante de la Tiroides o Tirotropina**
  
- **UV:**        **Ultravioleta**
  
- **μg:**        **Microgramos**

# **OBJETIVO**

La meta principal de los productores de carne para el consumo ha sido siempre la de obtener mayores beneficios de sus productos, bien utilizando razas precoces, con mayor facilidad para el engorde o administrando sustancias que al aumentar el apetito o modificar, de alguna manera, el metabolismo hagan que el animal transforme más positivamente el pienso que se le administra.

Sería demasiado extenso el enumerar toda la cantidad de productos que se han utilizado con los fines señalados, sólo vamos a citar, por haber sido los que más trascendencia han tenido, de cara a la sociedad, a los anabolizantes, entendiendo como tales a todos aquellos productos capaces de mejorar la balanza nitrogenada por un aumento del anabolismo.

La industria fitosanitaria se ha encargado, a través de los tiempos, de poner al alcance del ganadero una serie de productos, cada vez más sofisticados por los rendimientos que proporcionaban, para que al administrarlos a sus reses obtuvieran mejores beneficios. Es más, en algunos momentos se han llegado a desencadenar verdaderas batallas para conseguir un mercado de altos rendimientos.

Sin embargo, en el año 1985 y atendiendo más a razones políticas -se habló de exceso de existencias y a los costes de mantenerlas y, sobre todo, de la existencia de un peligro potencial para los consumidores- que a las puramente científicas se prohibió en Europa el uso de cualquier aditivo que tuviera ese carácter de anabolizante. España, naturalmente, al pertenecer a la CE también prohíbe el uso de esas sustancias.

Esta decisión es fuertemente criticada por los productores de carne, por los productores de los anabolizantes, etc. y lo que es más importante por la propia comunidad científica ya que se celebraron reuniones, mesas redondas, simposia, etc. donde queda demostrado que la utilidad de ciertos anabolizantes, bajo determinadas condiciones no son peligrosos, no entrañan ningún peligro para los consumidores.



De entre las sustancias anabolizantes más ampliamente utilizadas destaca el uso del **acetato de trenbolona** con unos rendimientos significativos en cuanto a los índices de conversión y ganancia de peso se refiere. Esta sustancia queda prohibida por las disposiciones comunitarias y nacionales, lo que no significa que haya dejado de usarse.

Al hacer una búsqueda bibliográfica para tratar de justificar las prohibiciones aludidas encontramos una falta de conocimientos enorme sobre el comportamiento de la trenbolona sobre ciertas constantes fisiológicas, particularmente en el campo de la endocrinología, por ser la especialidad que tiene el laboratorio donde habíamos tratado de llevar a cabo nuestro trabajo.

No habíamos encontrado datos fidedignos sobre la cinética de la trenbolona, conocimiento importantísimo para poder opinar sobre dicha sustancia. Por ello, el primer objetivo del trabajo que aquí se presenta es el de estudiar la cinética de la trenbolona tras su aplicación, en forma de implante, en el ganado vacuno. Se estudian las influencias que esas concentraciones de trenbolona puedan tener sobre las concentraciones de hormonas esteroideas y tiroideas.

En definitiva, nuestro trabajo incluye un capítulo relacionado con el *Metabolismo de las proteínas* para poder analizar y conocer las influencias de los anabolizantes. Se estudia a continuación la *Biosíntesis de las hormonas esteroideas* y el *mecanismo de acción de estas hormonas*, para poder explicar algunas de las acciones del implante sobre las mismas rutas de biosíntesis. Se describen a continuación los *Anabolizantes* más utilizados con estos fines y sus repercusiones en lo que a la *Seguridad de los consumidores* se refiere.

A continuación hacemos una revisión bibliográfica sobre el desarrollo e importancia de los *Métodos inmunológicos* como herramienta fundamental de nuestra parte experimental, haciendo alusiones también a los análisis por *HPLC* que nosotros utilizamos.

La parte experimental propiamente dicha esta constituida por el protocolo de

manejo y tratamiento de los animales y el análisis de las muestras obtenidas, siendo los valores analizados los de *progesterona*, *17 $\beta$ -estradiol*, *testosterona*, *cortisol*, *tri-iodotironina*, *tiroxina* y *hormona estimulante de la tiroides*.

Un amplio capítulo dedicado a la discusión compara nuestros resultados con los encontrados en la bibliografía.

Al final se sacan unas *conclusiones* que entendemos son valiosas ya que hasta la fecha no se habían realizado trabajos experimentales tan profundos y completos como el que aquí se presenta.

# **INTRODUCCION**

La constante evolución de los conocimientos básicos, que constituyen la nutrición animal, da como resultado la aparición de nuevas sustancias, de diversos tipos, y que persiguen el mismo objetivo: el aumento de la productividad animal a través de la estimulación de la velocidad de crecimiento y mejora de los índices de transformación del alimento, en peso vivo.

Entre las sustancias que han ido apareciendo en el campo de la alimentación animal destacan los antitiroideos, con singular importancia los derivados del tiuracilo, sustancias inhibitoras de la función tiroidea, cuya administración, debido a su interferencia en la síntesis de hormonas tiroideas, produce estados hipotiroideos mejoradores del incremento ponderal de peso vivo, en algunas especies zootécnicas.

Otras sustancias muy empleadas son los agentes anabólicos, usados en producción animal, y que fueron clasificados por Hoffmann (1978) según su actividad biológica en: estrogénicos, androgénicos y progestágenos y, de acuerdo con su estructura, en: esteroides endógenos, esteroides sintéticos y compuestos no esteroideos. Todos son utilizados como promotores del crecimiento, produciendo un incremento de la síntesis proteica (Lu y Rendel, 1976). Estos compuestos aparte de su actividad anabólica también ejercen actividad como hormonas sexuales.

El reconocimiento, por parte de la FDA (Food and Drug Administration), de la utilización del dietilestilbestrol (DES) -estrógeno sintético no esteroideo-, empezándose a usar en avicultura en los comienzos de 1947 y en ganado vacuno en 1954, marca el inicio en la utilización de los compuestos anabolizantes en la producción animal (Hoffmann *et al.*, 1975; Karg y Vogt, 1978).

La administración de cualquier clase de "droga" requiere que hagamos una consideración de los posibles riesgos, comparándolos con sus posibles beneficios. En la actualidad, las ventajas del empleo de agentes anabolizantes utilizados como promotores del crecimiento, particularmente en rumiantes, está fuera de cualquier duda (Heitzman, 1976; Heitzman, 1979).

Los agentes anabólicos que estimulan la elaboración de proteínas son una de las soluciones para obtener un mayor rendimiento de los alimentos de origen animal.

Dentro de las modernas explotaciones, de producción cárnica, se admite que los objetivos a alcanzar son:

- Carne de mejor calidad.
- Mínimo consumo de pienso.
- Ciclo de producción corto.

Es indudable que el logro de los objetivos anteriormente señalados no puede hacerse independientemente, sino gracias a la colaboración de genetistas, fisiólogos, patólogos, nutrólogos y demás especialistas en las diversas ramas biológicas. Con frecuencia son los genetistas los que brindan animales con extraordinario potencial de crecimiento, que no podrá manifestarse en su plenitud, si no se les mantiene en la más estricta sanidad y óptimas condiciones de alimentación. Sin embargo, se presentan ocasiones en las que el investigador puede, con habilidad y un adecuado conocimiento del marco fisiológico del animal, alterar ligeramente determinadas funciones fisiológicas, en beneficio de la productividad. Ejemplos de estos los tenemos ante nuestros ojos como son la producción de carnes blancas, empleo de diversas sustancias de tipo estrogénico, etc.

Estos fines sólo podrán alcanzarse en la medida en que la relación de conversión del nitrógeno proteico sea más elevada. Sin embargo, esta conversión es realmente deficitaria en la especie bovina y decrece a medida que aumenta la edad del animal. El potencial de conversión del 70% en los primeros días de vida, baja a un 30% a partir de la décima semana (Van Der Wal, 1975). Van Der Wal y Berende (1983) estudiaron la utilización del nitrógeno alimenticio, en tanto por ciento, del ingerido retenido por los bóvidos en forma de proteínas corporales, llegando a la conclusión que está en relación inversa con el excretado en la orina, aumentando éste último con la edad del animal, mientras que permanece constante el excretado en las

heces.

Esta situación nos atreveríamos a calificarla de "catástrofe metabólica", mejoraría notablemente con la utilización de los anabolizantes -estradiol, acetato de trenbolona-, experimentándose un incremento del nitrógeno retenido en forma de proteínas corporales (Van Der Wal y Berende, 1983).

Ello explica porqué los investigadores han dedicado tantos esfuerzos para intentar reducir las pérdidas de nitrógeno suministradas en la ración alimenticia, que constituye el elemento más caro y con lo que mejoraríamos la rentabilidad de la producción cárnica.

Actualmente, el empleo racional de los anabolizantes es el mejor instrumento puesto a disposición del ganadero, por la investigación, para incrementar de manera notable la fijación del nitrógeno alimenticio.

Así, la utilización de esas sustancias encuentra su principal justificación en la productividad de los animales que la reciben, porque:

- Aumentan la ganancia diaria de peso.
- Aumenta el índice de conversión.
- Mejoran la conformación de la canal.
- Mejoran la clasificación de la canal.

## **METABOLISMO DE LAS PROTEINAS**

Las proteínas constituyen aproximadamente las tres cuartas partes de los sólidos del organismo animal.

Las podemos dividir en: proteínas estructurales, enzimas, genes, proteínas transportadoras de oxígeno, proteínas musculares responsables de la contracción y otras que desempeñan funciones específicas dentro y fuera de las células (Guyton, 1988).

Las propiedades químicas básicas de las proteínas, que explican sus diversas funciones, son muy amplias, por lo que nos limitaremos a estudiar los aspectos específicos del metabolismo de las proteínas que consideremos más importantes para los fines de nuestro objetivo.

### **Biosíntesis proteica**

En la década de los años 70, es cuando se ha producido un gran avance en lo que al conocimiento de la biosíntesis de las proteínas en las células animales se refiere, aún cuando existan, actualmente, muchos puntos oscuros en las interacciones químicas. Si se considera, en líneas generales, la biosíntesis proteica en las células, encontramos que es análoga a las que acontecen en las bacterias, aunque existen unos perfiles, que son, considerablemente, más complicados. Algunos estudios tratan parcialmente (Mazumder y Szer, 1977) o completamente (Pain, 1978; Revel y Groner, 1978; Pain y Clemens, 1980) la síntesis proteica a nivel celular.

Algunos de los conocimientos, que actualmente se tienen, derivan de los modelos introducidos por diferentes investigadores que permiten medir ciertos parámetros, pero que tienen el inconveniente de no ser del todo ciertos a la hora de extrapolarlos a lo que sucede en el organismo vivo. Sin embargo, son esos métodos lo suficientemente demostrativos para los fines que ahora nosotros perseguimos.

La biosíntesis proteica comprende una serie de procesos complejos que afectan a las tres clases de RNA y a un gran número de proteínas (Pain y Clemens, 1980). El orden de inserción de los aminoácidos, en una cadena polipeptídica, está dirigido por la secuencia de las bases nucleótidas en el RNA mensajero (mRNA), el cual es transcrito del DNA, en la región nucleoplasmática del núcleo.

La información genética, representada por la secuencia de bases en el mRNA, es descifrada por el RNA de transferencia (tRNA) y convertida a la secuencia de aminoácidos en proteínas. La estructura tRNA (figura 1) incluye tres distintivos que la capacitan para llevar a cabo estas funciones:

- 1- Una tripleta anticodón de bases, que sirve de unión complementaria al codón en el mRNA, que especifica un aminoácido en particular.
- 2- Un lugar de inserción en el mismo aminoácido en el terminal 3'.
- 3- Un lugar de reconocimiento para la enzima específica, aminoacil-tRNA sintetasa, que cataliza la unión del aminoácido.

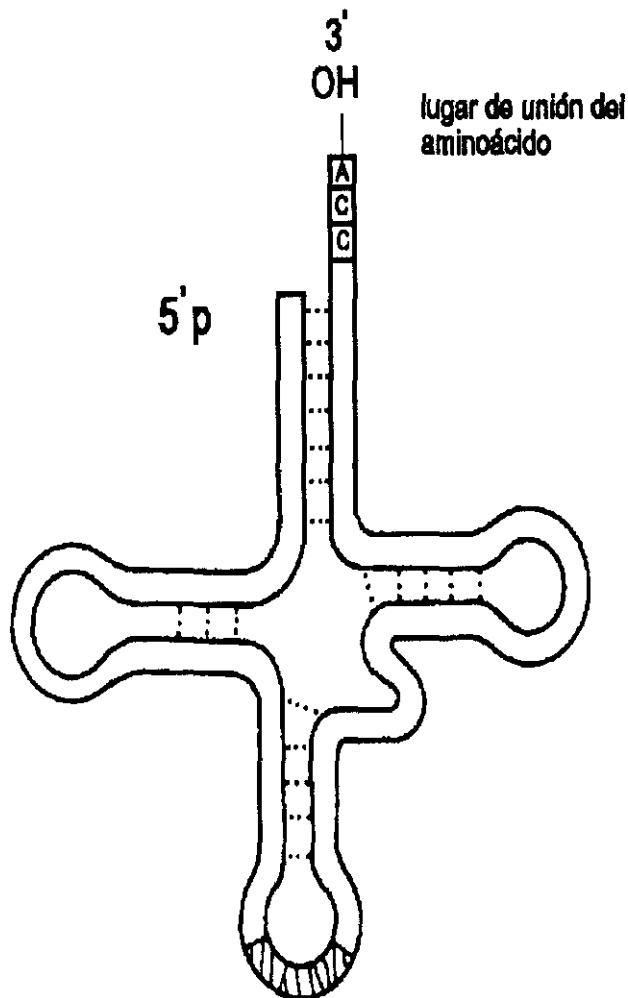
La formación del aminoacil-tRNA implica la hidrólisis de ATP a AMP; por tanto, la preparación de cada molécula de aminoácido para la síntesis proteica requiere el gasto de dos uniones de alta energía.

El tercer tipo de RNA que interviene en la síntesis proteica es el RNA ribosomal (rRNA) que se sintetiza en el nucleolo y se incorpora, junto a unas 70 proteínas, dentro de los ribosomas. Estos orgánulos están formados por dos subunidades, denominadas 40S y 60S, según su gradiente de densidad en sacarosa.

El proceso de síntesis proteica referido a la traslación (Pain, 1978) se puede dividir en tres etapas:

- 1 INICIACION: unión de un ribosoma y de una molécula de iniciador





### Anticodon

Figura 1

específico del tRNA (Met-tRNA) a un lugar particular del mRNA al principio de la secuencia codificante.

**2 ELONGACION:** el ribosoma se mueve hacia el mRNA con lo que se elabora una cadena de polipéptidos, a partir de los aminoácidos, consecuencia dependiente de la información genética codificada según el orden de las bases en el mRNA.

**3 TERMINACION:** el ribosoma, tras la elongación, alcanza el final de la

secuencia codificante sobre el RNA y se libera junto a la cadena proteica recién completada. En estas circunstancias, el ribosoma es capaz de reunirse a la misma, u otra, molécula de mRNA. Si no se precisa de inmediato para la síntesis de otra proteína, el ribosoma permanecerá en el citoplasma, en una especie de "sala de espera" de ribosomas monoméricos, sin unirse al mRNA.

### **Regulación de la biosíntesis proteica**

La síntesis de proteínas, en las células animales, está sujeta a una regulación, tanto cuantitativa como cualitativa. La primera, esto es, el control de la cantidad total de proteína sintetizada es muy importante para determinar el tamaño del tejido y su respuesta a diferentes factores, como pueden ser los nutricionales y los hormonales. La regulación cualitativa o, lo que es lo mismo, el control de tipo de proteína sintetizada es, también, de gran importancia para la inducción hormonal de enzimas y para los procesos de desarrollo y diferenciación.

La medición de los ritmos totales de síntesis proteica "*in vivo*" ha mostrado cambios, en varios tejidos, en respuesta a alteraciones nutricionales y/o hormonales (Henshaw, 1980; Pain, 1980). Estos cambios se pueden considerar, en términos de regulación, como dependientes de:

- a. - Número de ribosomas disponibles en el tejido, lo que posiblemente determina el máximo ritmo de síntesis proteica, en cualquier momento. Hirsch en 1967 y Young en 1970, determinaron la concentración de ribosomas en un tejido midiendo el RNA total.
- b. - Actividad de los ribosomas, o sea, ritmo de síntesis de proteína en el tejido.

Las deficiencias hormonales y/o nutricionales reducen, tanto el número de

ribosomas como el porcentaje de síntesis de proteínas por ribosoma en el músculo (Millward *et al.*, 1973; Flaim *et al.*, 1978). Hecho éste a tener muy en cuenta respecto a nuestros objetivos; si bien por el momento existen grandes dificultades para conocer profundamente la regulación de la actividad de los ribosomas, ya que no existen procedimientos estandarizados capaces de analizar tales cambios.

Hasta hace relativamente poco tiempo se tenía la creencia de que una disminución de la proporción de polisomas en un tejido implicaba, automáticamente, una disminución del ritmo de síntesis proteica, y viceversa (Wool *et al.*, 1968; Jefferson *et al.*, 1974). Sin embargo, y a la vista de los resultados obtenidos, cuando se utilizaba cicloheximida se producía una inhibición parcial de la síntesis de proteínas, lo cual era acompañado de un incremento en ribosomas, impidiéndose el proceso de elongación, más que el de iniciación, llegando a la conclusión que el análisis de los polisomas sólo será útil cuando se coordine con la medida de síntesis proteica/ribosomas más que considerarlo como un sustituto de ésta (Rannels *et al.*, 1978; Li *et al.*, 1979 ).

A juzgar por los progresos que se vienen realizando "*in vitro*" sobre este campo, tan apasionante, de la síntesis proteica, a nivel celular, es muy posible que en un futuro, no muy lejano, se disponga de información suficiente para conocer, con toda exactitud, cómo intervienen todos los factores hormonales y/o nutricionales sobre este biomecanismo. Por el momento bástenos conocer los fundamentos anteriormente apuntados.

Dentro de la célula, además del proceso de síntesis proteica juega, también, un papel, muy importante, la degradación de las proteínas aunque no sea tan bien conocido como el anterior ( ver páginas posteriores).

## **Control hormonal del metabolismo proteico**

Uno de los factores que nos indujo a considerar este apartado, es el escaso conocimiento existente en el área de la regulación hormonal del metabolismo de las proteínas, particularmente en lo referente al crecimiento y al uso de hormonas en la producción de proteína animal, con el fin de poder incrementar el suministro de alimento a la población humana.

El sistema endocrino tiene una influencia considerable en el crecimiento del animal, al regular la toma de nutrientes y la división de los mismos por varias vías metabólicas (Baile y Forbes, 1974; Bray, 1978).

Los posibles lugares de actuación hormonal, a nivel celular, en la síntesis proteica, se encuentran representados en la figura 2.

El papel de cada una de las hormonas sobre el metabolismo proteico, lo estudiaremos más adelante en el capítulo de mecanismos de acción hormonal.

### **Degradación proteica**

Al menos se han descrito tres procesos como los responsables de la escisión de las uniones peptídicas intracelulares, que son los causantes del catabolismo proteico:

1. Manipulación de las proteínas por un mecanismo proteolítico co-traslocacional, localizado en el retículo endoplasmático rugoso (RER), que traslada los péptidos "marcados" de las proteínas secretoras (Blobel y Dobberstein, 1975)
2. Rápida degradación de una gran proporción de proteínas recién sintetizadas. Este proceso parece ser el responsable de controlar la cantidad de proteína que se secreta.

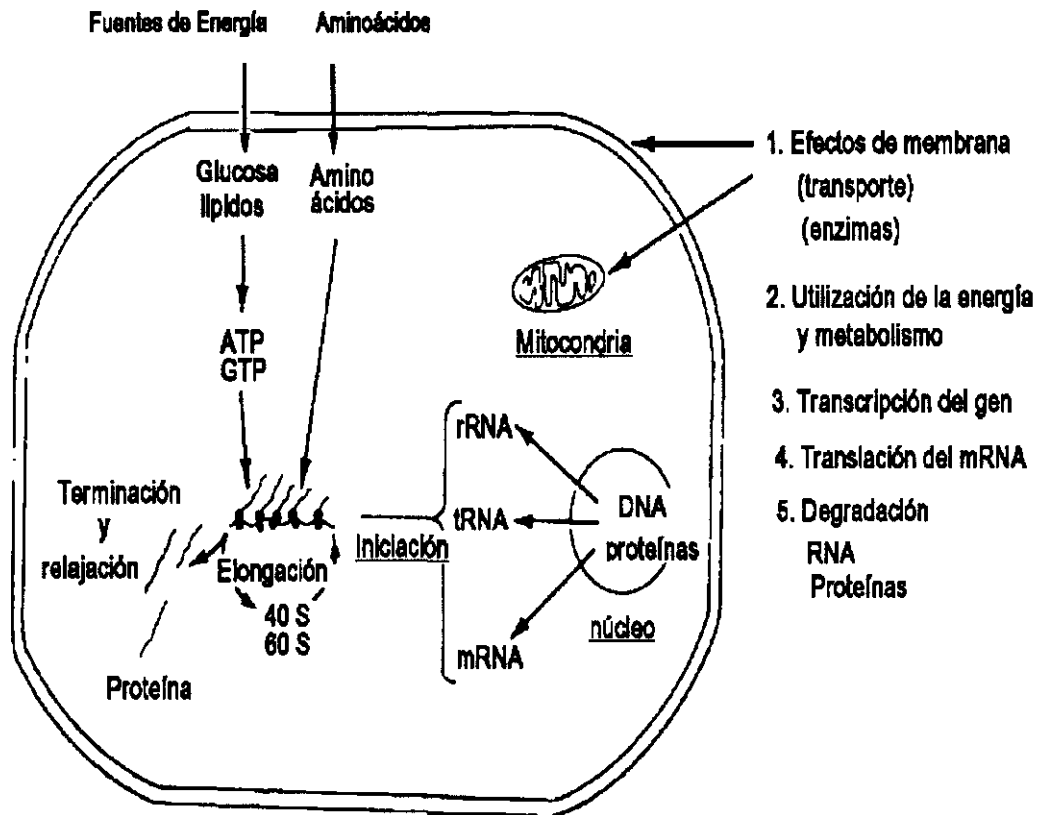


Figura 2

3. Degradación post-traslacional de las proteínas sujetas a degradación fisiológica, también llamada degradación proteica fisiológica.

La degradación proteica fisiológica depende de una serie de factores que se pueden resumir, en dos grupos:

- a- factores relativos a las propiedades de las proteínas como sustratos para la degradación, y
- b- factores que influyen sobre las diferentes enzimas responsables de la degradación proteica.

El sistema de degradación proteica depende de una serie de características de

las propias proteínas (Mc Lendon y Radany, 1978) y que son:

- i- Las subunidades grandes se degradan más rápidamente que las pequeñas.
- ii- Las proteínas ácidas se degradan con más facilidad que las básicas o las neutras.
- iii- Las proteínas con cociente de renovación rápido presentan características hidrofóbicas.
- iiii- Las proteínas termoestables se destruyen lentamente.

Un posible mecanismo regulador de la degradación proteica lo constituye la modificación covalente de las proteínas, por cuanto puede actuar cambiando la conformación y estabilidad de la proteína o generando lugares sensibles a las proteasas, al variar su afinidad a las endomembranas (Ekman *et al.*, 1978).

En cuanto a los mecanismos de degradación, dependientes de la maquinaria celular, son varios autores los que consideran la existencia de más de un sistema proteolítico en la célula. Ballard (1977) y Amenta *et al.* (1977), han propuesto dos rutas independientes para la degradación proteica.

Durante la autofagia, los constituyentes celulares son incluidos en membranas para formar vacuolas, que se fusionan con los lisosomas primarios -autofagolisosoma- donde las proteínas y otras moléculas, son degradadas. Este mecanismo constituye el 30% de la degradación proteica intracelular (Knowles y Ballard, 1976). Ballard (1977) propone que el control de la velocidad de la autofagia es ejercido por variaciones en la capacidad del sistema, como puede ser el número de vacuolas formadas. Existe, en opinión de Ballard (1977), un segundo sistema degradativo, que probablemente afecta a la escisión proteolítica directa y que se encuentra limitado por la capacidad de cada proteína de actuar como sustrato para la proteólisis. Este proceso puede afectar a las

reacciones dependientes de la membrana en las que se inactivan ciertas enzimas, lo que constituiría un primer paso de la degradación (Mayer *et al.*, 1980).

Amenta *et al.* (1977) distingue entre los procesos indiscriminados de autofagia y los que se producen para mantener las condiciones basales de degradación proteica.

Con el acúmulo de proteínas en las células diferenciadas, esta síntesis se puede realizar muy rápidamente, caso de las células de la glándula mamaria, o muy lentamente como en el caso del músculo. El acúmulo proteico (hipertrofia) normalmente ocurre por una hiperplasia de los tejidos y esta hipertrofia no sucede cuando la degradación excede de la síntesis proteica. Sin embargo, las variaciones en la cantidad de proteína o enzimas dependerá, no sólo del cambio cuantitativo y temporal de la síntesis proteica, sino también de los fenómenos de degradación, durante la fase acumulativa en la célula. De este interjuego se desprende que en las células son reconocibles, al menos, tres subgrupos proteicos: proteínas celulares específicas, proteínas secretoras específicas y proteínas no específicas.

### **Empleo de las proteínas plasmáticas por los tejidos**

Cuando en los tejidos orgánicos existe una disminución de las proteínas, éstas pueden ser restituidas, con gran rapidez, por las proteínas plasmáticas. En realidad, los macrófagos tisulares son capaces de embeber las proteínas plasmáticas por el proceso llamado picnocirosis; a continuación, una vez en las células, dichas proteínas se desdoblán en aminoácidos que se transportan de nuevo hacia la sangre y se utilizan por todo el cuerpo para elaborar proteínas celulares. De esta manera, las proteínas plasmáticas funcionan como medio de almacenamiento lábil de proteínas y representan un sitio de rápida disponibilidad de aminoácidos, en todos los casos en los que lo requiera un tejido en particular.

Existe un equilibrio reversible, entre las proteínas plasmáticas y tisulares, dependiendo de la velocidad con la que el hígado sintetice proteínas plasmáticas; la velocidad con la que el hígado sintetiza éstas depende de la concentración de

aminoácidos en sangre circulante, si éstos escasean se reduce la concentración de proteínas plasmáticas. Por otra parte, si existe en sangre exceso de proteínas plasmáticas, éstas se utilizan para elaborar proteínas tisulares. Por lo tanto, se establece un equilibrio dinámico constante entre proteínas plasmáticas, aminoácidos de la sangre y proteínas tisulares.

Cuando en la ración alimenticia al animal no se le suministra la cantidad necesaria de proteína diaria, en el organismo, parte de las proteínas se transforman en aminoácidos que se desaminan y oxidan, produciéndose de esta manera una pérdida de las proteínas totales. Por lo tanto, es preciso ingerir una cantidad determinada de proteína, dependiendo de la especie animal, raza, sexo, edad, etc., estimándose que para el ganado vacuno se deben ingerir al menos 148 g diarios de proteína (Manual Merck de Veterinaria, 1988), ya que con esta cantidad el animal podrá disponer de las proteínas necesarias para un buen funcionamiento de su organismo.

Para que se puedan utilizar la totalidad de las proteínas ingeridas, los aminoácidos que contienen, deben conservar entre sí la proporción que presenten en los tejidos. Por ejemplo, si baja la concentración de uno de los aminoácidos esenciales, los demás no podrán utilizarse, ya que las células fabrican proteínas completas o no fabrican ninguna, en consecuencia se desaminarán y se oxidarán. Una proteína, cuya composición en aminoácidos difiera de la del promedio de proteínas corporales, se llama proteína parcial o incompleta y resulta evidentemente menos útil para la nutrición que una proteína completa.



## BIOSINTESIS DE LAS HORMONAS ESTEROIDES

Creemos oportuno hacer un pequeña revisión de la biosíntesis de las hormonas objeto de nuestro estudio, para una mejor comprensión de los mecanismos de acción, que se verán posteriormente.

Los principales tejidos de síntesis de las hormonas esteroideas (andrógenos, estrógenos, progestágenos, glucocorticoides y mineralocorticoides) son corteza adrenal, ovario y testículos; y en menor medida piel, hígado y riñón. También durante la gestación, la placenta sintetiza estrógenos y algunas otras hormonas (Norman y Liwack, 1987).

Todas las hormonas esteroideas se sintetizan a partir del colesterol. Los trabajos de Bloch (1965) establecieron que los 27 carbonos del colesterol proceden del acetato ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), pudiéndose resumir la producción del colesterol en cuatro etapas:

- Formación del ácido mevalónico (6 carbonos) a partir de 3 moléculas de acetato.
- La conversión de 6 moléculas de ácido mevalónico en esculeno (30 carbonos), a través de una serie de fosforilaciones intermedias.
- Oxidación y ciclación del esculeno produciendo lanosterol (primer éster cíclico).
- Cambios de posición de tres grupos metilo y dobles enlaces, en el lanosterol, producen finalmente el colesterol.

Una vez obtenido el colesterol, sufre una serie de reacciones químicas que dan lugar a la formación de pregnenolona y progesterona (figura 3).

### *Hormonogénesis en la Corteza Adrenal*

La corteza suprarrenal se encuentra constituida por tres capas perfectamente

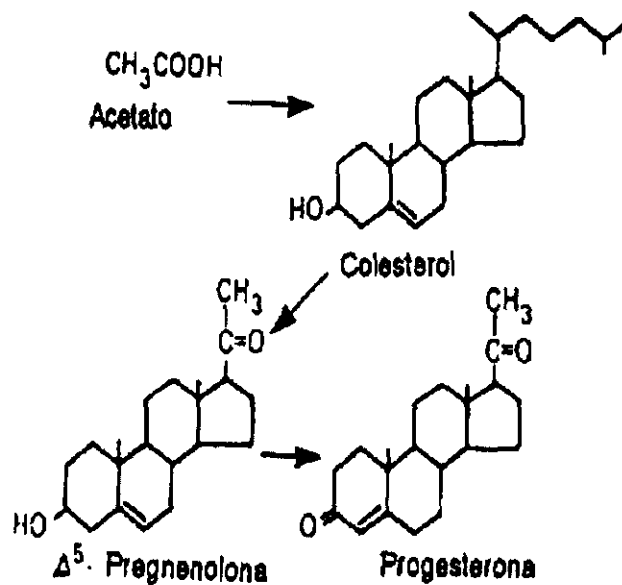


Figura 3

definidas desde la superficie al interior: la zona glomerular es la capa más superficial y de menor grosor, la zona fasciculada o intermedia y la zona reticular que es la capa más profunda.

La zona glomerular secreta aldosterona, mientras que las zonas fasciculada y reticular secretan cortisol y otros glucocorticoides, pero es probable que sea mayor la secreción de las hormonas en la zona fasciculada que en la reticular. Ambas capas secretan, también, andrógenos suprarrenales, pero quizás sea mayor la cantidad sintetizada en la zona reticular (Weber *et al.*, 1950),

La biosíntesis de estas hormonas es a partir del acetato, que desde la sangre se introduce en el retículo endoplasmático de la célula adrenal, donde a través de una serie de reacciones químicas, vistas anteriormente, se forma el colesterol. El colesterol, proviene del retículo endoplasmático y del liberado por las esterasas de los ésteres de colesterol, almacenado en las gotitas lipídicas llega a la mitocondria. En la mitocondria, éste, se transforma en pregnenolona a través de reacciones químicas (la localización a nivel celular de los diferentes estadios en la biosíntesis se encuentran representados en la figura 4).

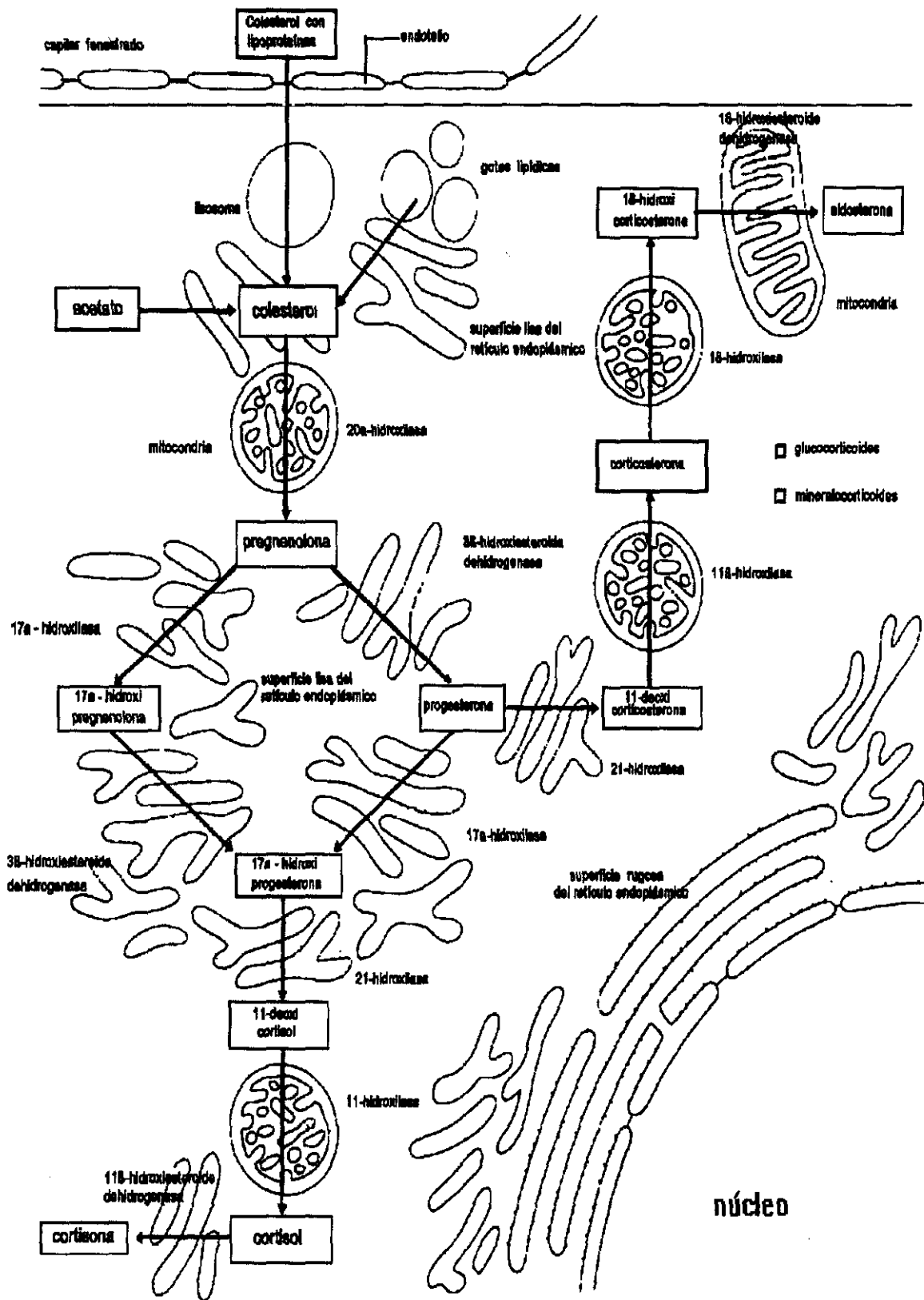


Figura 4

La pregnenolona se transfiere al retículo endoplasmático, donde sufrirá una serie de transformaciones bioquímicas gracias a la colaboración de un equipo enzimático muy desarrollado en las células adrenales (James, 1979). Dichas transformaciones químicas que producen la síntesis de cortisol, se pueden realizar a través de dos vías, una a través de la progesterona (llamada vía delta 4), y otra a través de la  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona (llamada vía delta 5).

La secuencia predominante de las transformaciones enzimáticas es la  $17\alpha$ -hidroxilación seguida de las  $3\beta$ -hidroxiesteroide dehidrogenasa y enzimas isomerasas, 21-hidroxilación y finalmente  $11\beta$ -hidroxilación. Pero esta secuencia puede variar; por ejemplo, la 21-hidroxilación puede preceder a la  $3\beta$ -hidroxiesteroide dehidrogenasa isomerasa. Sin embargo, la  $17\alpha$ -hidroxilación no ocurre nunca después de la 21-hidroxilación (figura 4).

La síntesis de andrógenos adrenales tiene lugar en las zonas más profundas, produciéndose igualmente a partir de la pregnenolona.

El cambio de los carbonos en C-17 para formar andrógenos adrenales requieren primero la introducción del grupo  $17\alpha$ -OH. Como consecuencia se produce  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona que es escindida por la C-17-20 liasa produciendo la dehidroepiandrosterona, que representa al andrógeno adrenal secretado en mayor cantidad. Aproximadamente la mitad de este esteroide es secretado en forma de éster sulfato, que parte procede de los precursores con sulfato y el resto de la sulfatación por la sulfoquinasa.

Los principales andrógenos adrenales: androstenodiona y su análogo  $11\beta$ -hidroxiandrostenodiona pueden ser formados vía delta 5, por la vía delta 4 ó por una vía intermedia. La  $11\beta$ -hidroxiandrostenodiona puede sintetizarse vía cortisol.

La vía sulfato, para la síntesis de sulfato de dehidroepiandrosterona, ha sido investigada *in vitro* e *in vivo* y fue revisada por Wang y Bulbrook (1968). La transformación de sulfato de colesterol a sulfato de pregnenolona y de éste a sulfato

de  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona, y de éste a sulfato de dehidroepiandrosterona, puede tener lugar sin la hidrólisis del grupo sulfato. No obstante, la vía sulfato parece tener poca importancia. Debido al lento transporte de sulfatos en la circulación, la concentración de dehidroepiandrosterona, en el plasma, es relativamente alta. Esto puede servir como almacén de andrógenos en la circulación.

La localización de los diferentes estados en la biosíntesis del cortisol y de los andrógenos adrenales en las fasciculada y reticular son las siguientes como se ven en la figura 5.

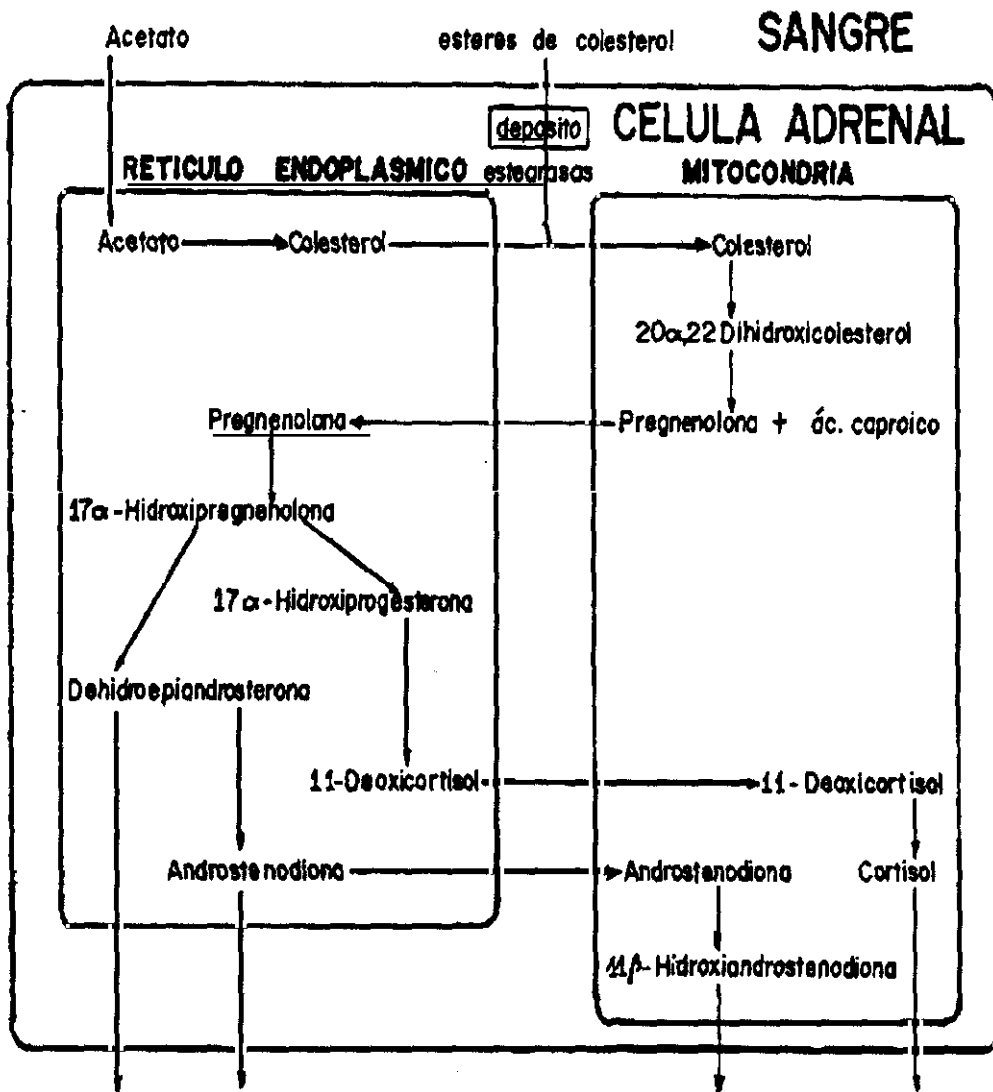


Figura 5

## Hormonogénesis en los Testículos

La función de las células de Leydig de los testículos es la secreción de andrógenos. El principal mecanismo regulador es a través de la secreción pulsátil de la hormona luteinizante secretada por la adenohipófisis (Dufau *et al.*, 1983). Los andrógenos son los responsables del desarrollo y mantenimiento de los órganos genitales internos y externos, de la aparición de las características sexuales secundarias, del desarrollo del sistema músculo esquelético, de la inhibición, por retrofuncionalidad, del eje hipotálamo-hipófisis y de la estimulación de la espermatogénesis. Además, los andrógenos estimulan a otros tejidos como la piel y los riñones (Hall, 1988).

Los principales esteroides, secretados por los testículos, son los andrógenos y dentro de éstos, la testosterona es la hormona secretada en mayor cantidad. La androstenodiona y la dehidroepiandrosterona tienen menor grado de androgenidad (Eik-Nes y Hall, 1965). Estas hormonas son sintetizadas por las células de Leydig en los testículos, glándulas que también secretan estrógenos, los cuales son sintetizados por las células de Sertoli (Dorrington y Armstrong, 1975).

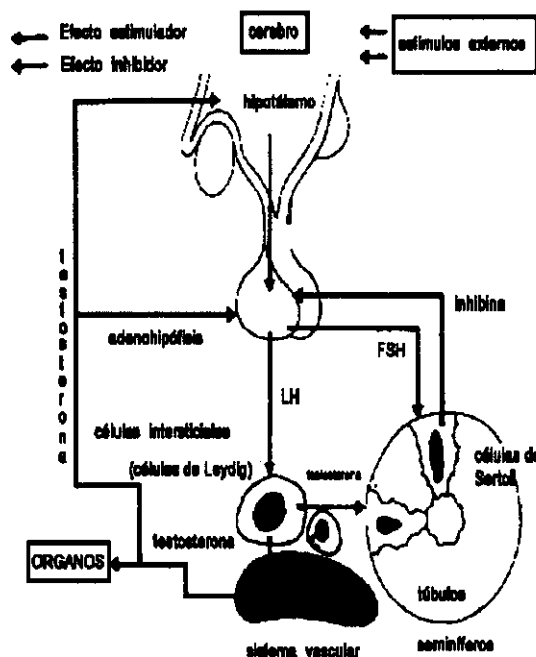


Figura 6

La síntesis de la testosterona es a partir del colesterol, que, a través de una serie de reacciones produce pregnenolona y progesterona. Estas dan lugar a la testosterona, por medio de dos vías paralelas llamadas delta 5 y delta 4. La primera procede de la 17-OH-pregnenolona y la segunda de la 17-OH-progesterona.

Los esteroides intermedios de la vía delta 5 pueden ser convertidos en los correspondientes esteroides de la vía delta 4 por oxidación de la 3 $\beta$ -hidroxil a (oxo) cetona (3 $\beta$ -esteroide deshidrogenasa) seguido por el cambio del doble enlace de C5-C6 a C4-C5 (delta 5 - delta 4 isomerasa). (Figura 7).

La forma hormonalmente activa de la testosterona, en el macho, es la dihidrotestosterona (DHT). El lugar de mayor producción es la próstata y también los testículos, piel y glándulas submaxilares. La reducción de testosterona a DHT es mediada por la enzima delta-3-cetoesteroide-5 $\alpha$ -oxidorreductasa, la cual requiere como cofactor el NADPH (NADP reducido -fosfato denicotinamida-adeninucleótido-). Esta enzima está asociada a los microsomas y a las membranas nucleares de las células prostáticas.

A nivel histológico la biosíntesis de andrógenos ocurre en la mitocondria y en el microsoma de la célula de Leydig, como se puede apreciar en la figura 8.

El sistema enzimático que fracciona la cadena lateral (formado por la adrenodoxinarreductasa, adrenodoxina y citocromo P-450) se encuentra solo en la membrana mitocondrial interna. A partir de colesterol produce pregnenolona, que se transfiere al microsoma, donde es atacada por las enzimas de la membrana, entre las cuales está la enzima fragmentadora de la cadena lateral, que convierte los esteroides de 21 carbonos en andrógenos de 19 carbonos: androstenodiona o dehidroepiandrosterona, según se use la vía delta 5 o delta 4.

Los esteroides testiculares se pueden secretar desde la células de Leydig mediante tres diferentes líquidos extracelulares: sangre, linfa y líquido tubular. La

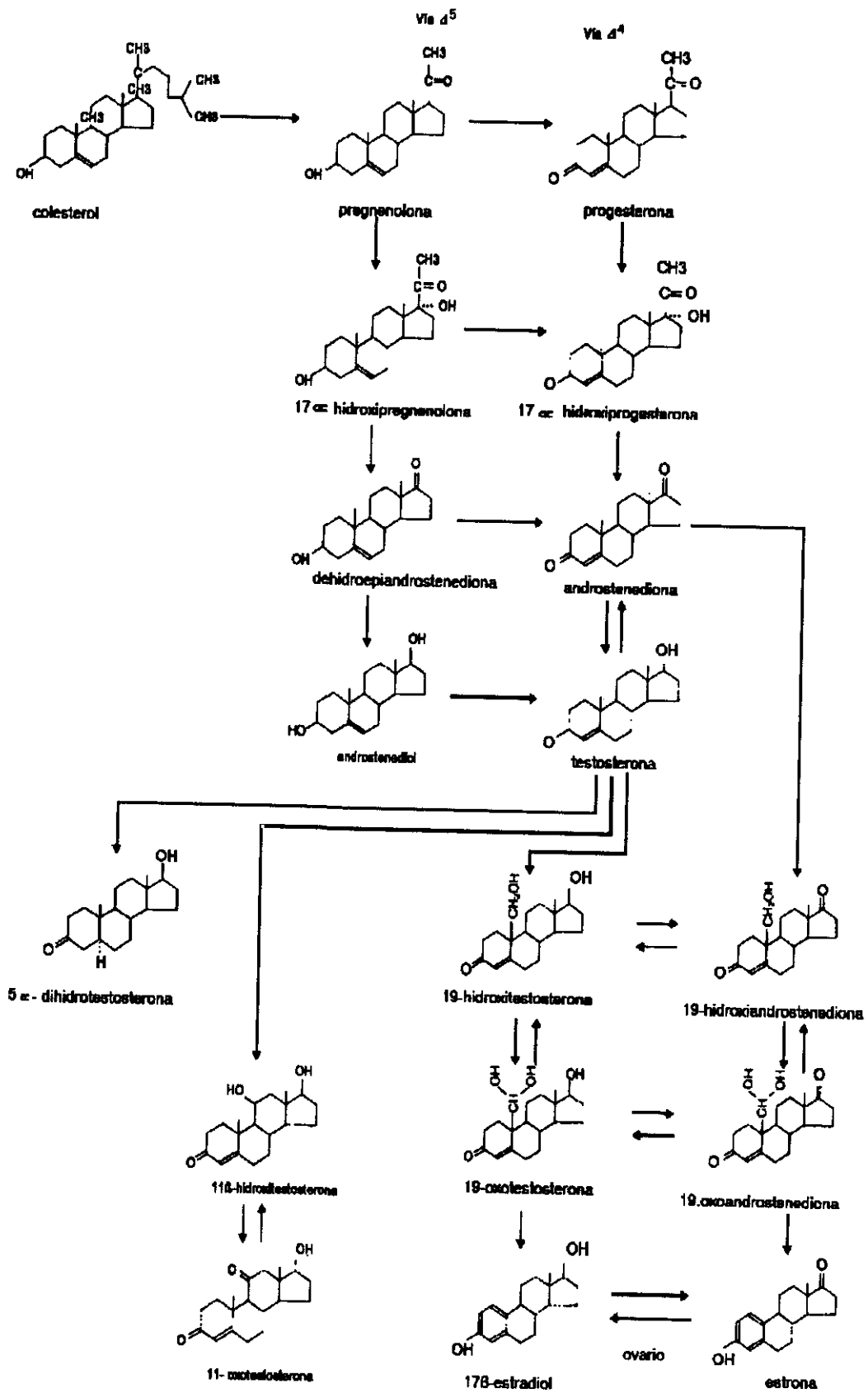


Figura 7



sangre es el principal sistema efluente, con un ritmo de flujo mucho mayor que en la linfa y en el líquido tubular. El mecanismo de secreción más importante de esteroides en esta glándula es el de difusión. Se cree que es así, debido a la correcta correlación entre las concentraciones de testosterona intracelular y extracelular y además debido al hecho de que no existe evidencia real de almacenamiento de esteroides en gránulos subcelulares o vesículas (Illera, 1984).

El hígado se encarga de metabolizar la testosterona, transformándola en androstenodiona, mediante la oxidación del grupo hidroxilo 17 $\beta$ . Posteriormente, la androstenodiona se reduce a dos androstenodionas, que se convierten en androsterona, epiandrosterona y 5 $\beta$ -androsterona, las cuales se secretan por orina y heces en forma soluble.

Además, la testosterona se puede transformar en androstenodiones que se secretan por orina, previamente conjugados. Por el contrario, la dehidroepiandrosterona es hidrolizada por una sulfatasa, transformándose en sulfato de dehidroepiandrosterona, que se puede convertir en testosterona.

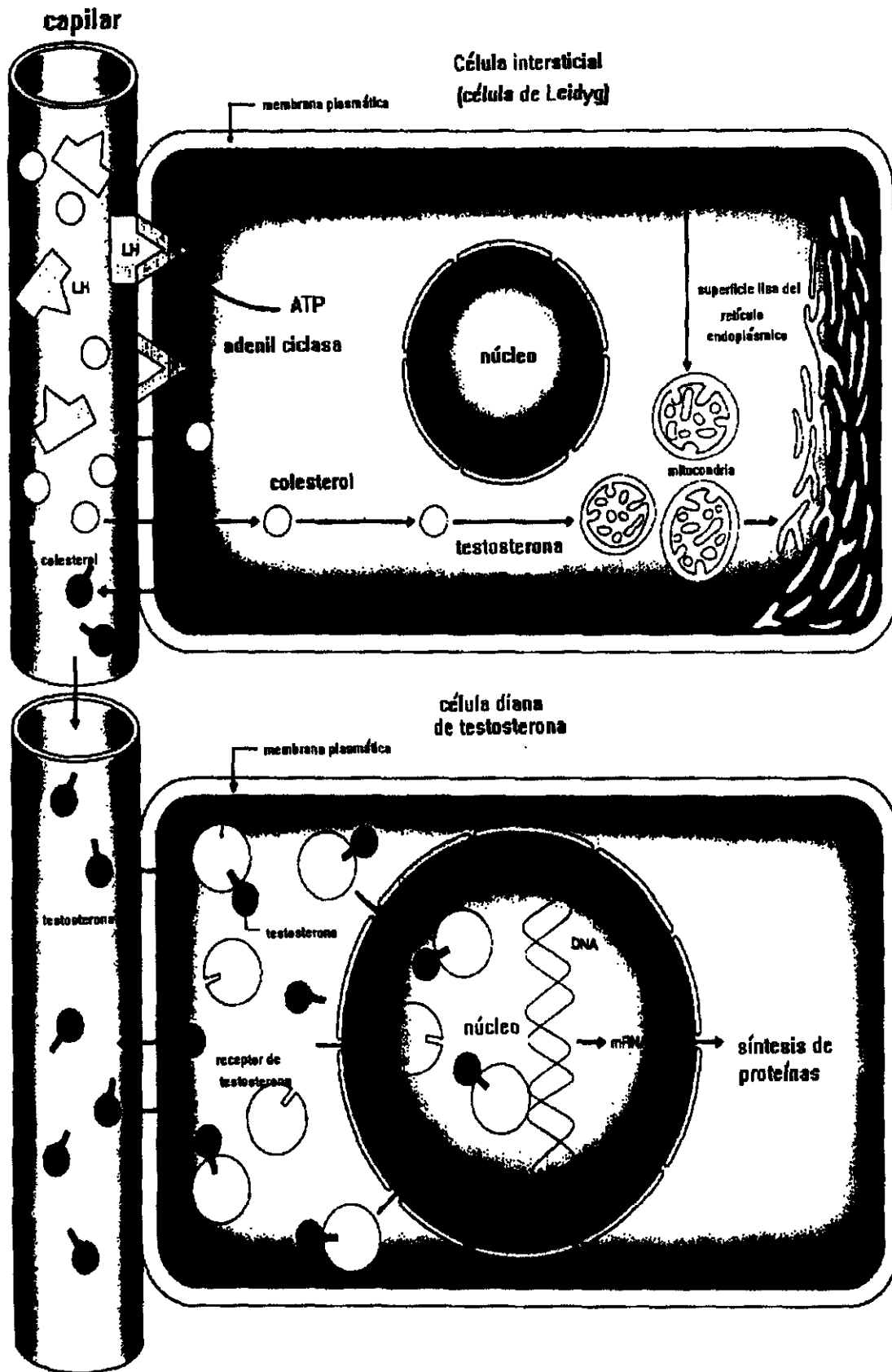


Figura 8

## Hormonogénesis Ovárica

El ovario puede considerarse como un conjunto de tres tejidos endocrinos: el estroma, el folículo y el cuerpo lúteo; éstos tejidos secretan y sintetizan hormonas cuyos compuestos poseen una estructura similar llamada ciclopentano-perhidrofenantreno.

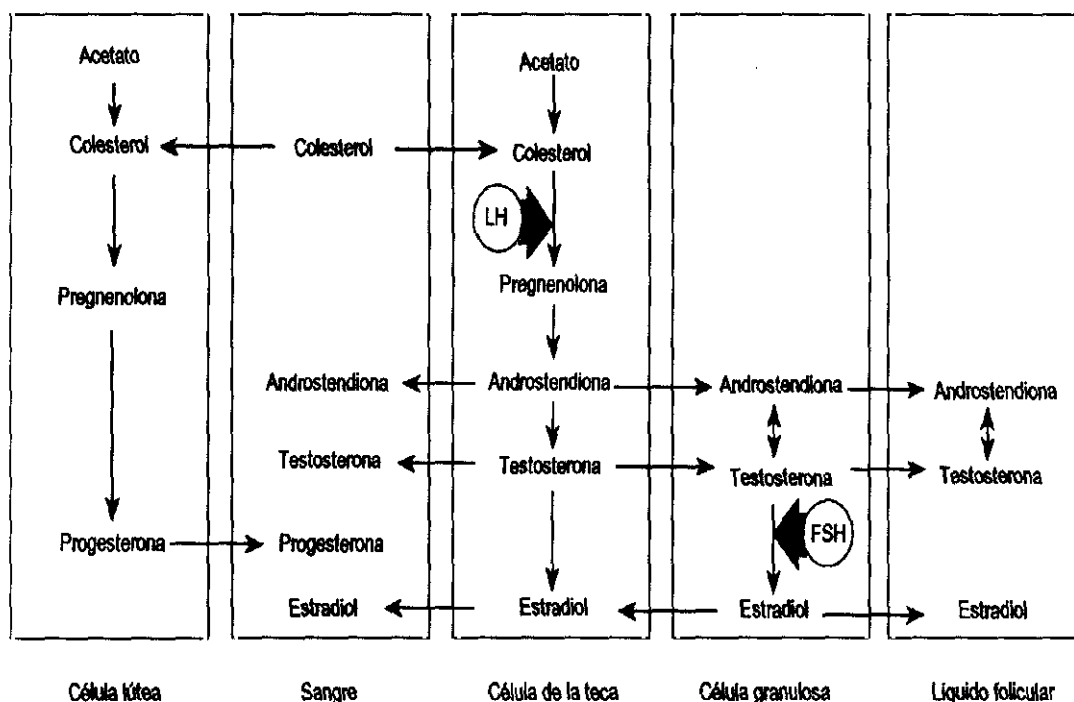


Figura 9

Las principales hormonas esteroides producidas por el ovario son: los estrógenos, andrógenos y la progesterona (Stanbenfeldt *et al.*, 1969; Hansel y Echternkamp, 1972; Schams *et al.*, 1977).

Todos los esteroides se sintetizan a partir del colesterol, procedente, del acetato intracelular o de la propia sangre. Las rutas de síntesis de las hormonas esteroides en el ovario se encuentran representadas en la figura 9.

El principal estrógeno biológicamente activo es el 17 $\beta$ -estradiol, pudiendo

considerar como metabolitos de éste, la estrona y el estriol (figura 10). Todos los estrógenos ováricos derivan de los andrógenos: androstenodiona, testosterona y dihidrotestosterona, siendo las células de la granulosa y de la teca interna del folículo las responsables de la síntesis de estrógenos (Moor *et al.*, 1978). El estroma no puede sintetizar estrógenos a partir de andrógenos.

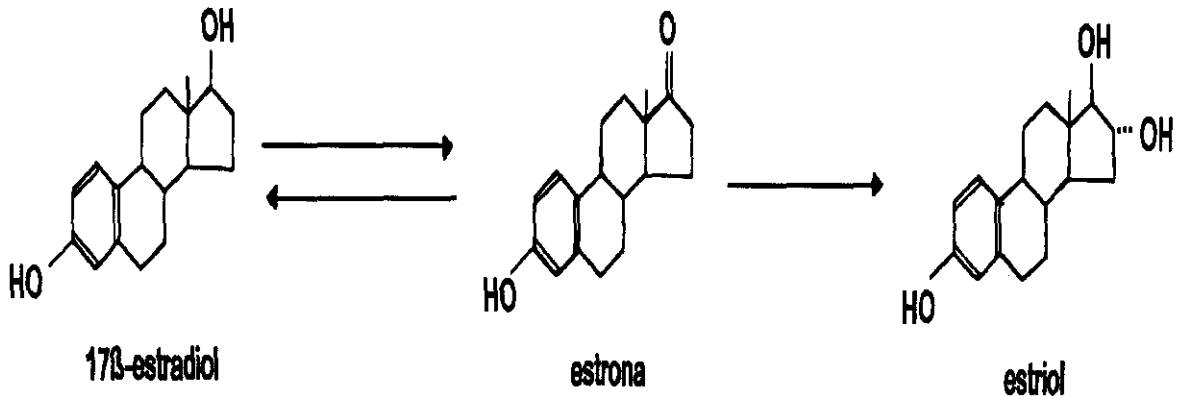


Figura 10

La testosterona, como hormona esteroide, se sintetiza, en las células de la teca interna bajo el control de la LH y FSH, convirtiéndose en 17β-estradiol en las células de la granulosa, mediante la acción de la enzima aromatasa. El 17β-estradiol se vierte en el líquido de los folículos antrales, en desarrollo, y en las venas ováricas. Las concentraciones plasmáticas de 17β-estradiol, presentan un pico muy elevado antes del estro y un segundo pico alrededor de los días 5 y 6 del ciclo, permaneciendo en niveles basales durante la fase luteínica de éste, para ir aumentando desde el desencadenamiento de la luteolisis, alcanzando una meseta aproximadamente 26 horas antes del desencadenamiento del estro (Hansel y Convey, 1983; Peters, 1985; Dieleman *et al.*, 1986). La elevación de la concentración de 17β-estradiol, está relacionada con el crecimiento del folículo ovulatorio, que se produce en la fase preovulatoria del ciclo, en el ovario dominante, (Ireland *et al.*, 1984; Dieleman *et al.*, 1983) siendo este la principal fuente de estrógenos, responsables del comportamiento estral. La alta concentración de 17β-estradiol, durante la fase folicular del ciclo, estimula los picos preovulatorios de las de las gonadotropinas mediante un sistema de retrofuncionalidad positiva, incrementando la sensibilidad de las gonadotropinas a la GnRH y estimulando al mismo tiempo la liberación de esta

hormona (Kesner *et al.*, 1981). Todavía no se conoce exactamente el significado funcional del segundo pico de  $17\beta$ -estradiol, el cual se produce alrededor del día 6 del ciclo, aunque se ha asociado con una de las oleadas de crecimiento folicular (Schallenberger *et al.*, 1984; Ireland, 1987). Las bajas concentraciones de  $17\beta$ -estradiol secretadas por los folículos en desarrollo, durante la fase luteínica actúan sinérgicamente con la progesterona para ejercer un efecto de retrofuncionalidad negativa sobre la secreción de LH. Se ha demostrado que cada pulso de LH, procedente de la hipófisis anterior, está íntimamente relacionado con un pulso de  $17\beta$ -estradiol (Walters y Schallenberger, 1984) esto indica que la LH estimula la secreción inmediata de  $17\beta$ -estradiol en los folículos en desarrollo.

La progesterona es secretada en grandes cantidades por el cuerpo lúteo. Las concentraciones plasmáticas de esta hormona reflejan el desarrollo, mantenimiento y regresión de este cuerpo lúteo. Las concentraciones comienzan a elevarse desde el día 4 del ciclo hasta alcanzar un pico entre los días 8 y 16, posteriormente descienden hasta valores basales antes del estro y la ovulación (Garverick *et al.*, 1971; Wetteman *et al.*, 1972; Schams *et al.* 1977). Esta hormona ejerce un efecto de retrofuncionalidad negativa, sobre la liberación de LH (Roche y Ireland, 1981; Ireland y Roche, 1982; Hansel y Convey, 1983) reduciendo la frecuencia de los pulsos de LH, influyendo en la determinación del pico preovulatorio de  $17\beta$ -estradiol (Aberyardene y Pope, 1987). La progesterona presenta también un patrón pulsátil de secreción, coincidiendo dichos pulsos con los de FSH en la fase luteínica (Walters *et al.*, 1984).

La función de los andrógenos en la endocrinología del ciclo estral bovino aún no está muy clara. Wise *et al.*, (1982) señalan que las concentraciones de testosterona, androstenodiona, dihidroepiandrostenodiona, se incrementan alrededor del desencadenamiento del estro. Se sabe que los andrógenos son intermediarios del  $17\beta$ -estradiol, así como la influencia que ejercen sobre el comportamiento de las hembras en el estro (Peters, 1985).

## *Hormonogénesis de la Glándula Tiroides*

Como glándula de secreción interna y desde el punto de vista fisiológico, en la glándula tiroides se sintetizan y secretan tres hormonas: tiroxina (T4), triiodotironina (T3) y tirocalcitonina (Tc), esta última se libera de la glándula cuando se elevan los niveles séricos de calcio, siendo las dos primeras las más importantes y objeto de nuestro estudio por su efecto sobre el índice metabólico del organismo.

***Hormonogénesis tiroidea:*** la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas llevan implícito tres escalones cada uno de ellos modulados por muchos mecanismos reguladores (De Naver y Vassart, 1980). Como se puede apreciar en la figura 11.

El primer paso en la formación de las hormonas tiroideas, es la síntesis de tiroglobulina (Tg), glucoproteína no hormonal de gran tamaño, la cual se elabora a nivel de la célula tiroidea, no siendo su conformación molecular del todo clara pero sí es cierto que incluye muchos residuos tirosínicos, transfiriéndose por exocitosis al espacio vesicular quedando incorporada al coloide tras una serie de manipulaciones.

La segunda etapa representa la iodación de los residuos de tirosina en el enlace peptídico, dentro de la molécula de tiroglobulina intacta, proceso que se conoce con el nombre de "organificación de la tiroglobulina".

Para esta segunda etapa es necesario el paso previo de oxidación, del iodo extraído del torrente circulatorio en forma de yoduro a iodo molecular, mediante la enzima peroxidasa, localizada en la membrana apical de las células, estando ya en disposición de reemplazar a los grupos hidroxilo de los residuos tirosínicos de la tiroglobulina para formar tironinas que se unen a la tiroglobulina. El paso final de la organificación comprende el acoplamiento o condensación de dos iodotirosinas que se encuentran en la unión peptídica de la molécula de tiroglobulina, para formar las iodotironinas T4 y T3, según se unan dos moléculas de diiodotirosina (DIT) entre sí o una de monoiodotirosina (MIT) con otra de diiodotirosina (DIT) respectivamente, quedando la tiroglobulina iodada en el coloide tiroideo.

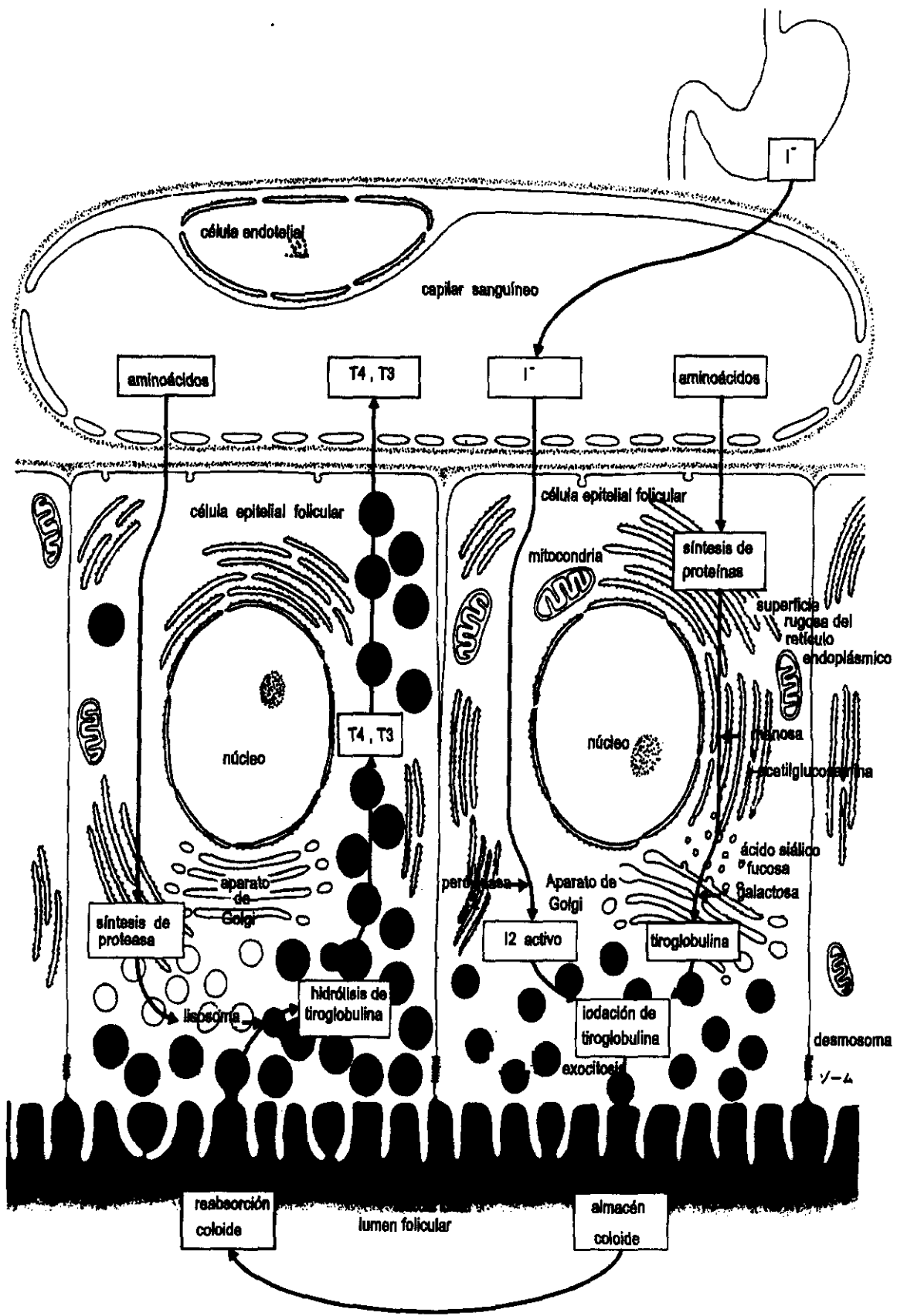


Figura 11. Síntesis y liberación de hormonas tiroideas

La cantidad de T4, contrariamente a la de T3, depende en cierto grado de las cantidades relativas de MIT y DIT que se encuentren. Cuando hay una gran iodación de tiroglobulina, aumenta la relación de DIT con MIT, y como consecuencia la producción de T3 es proporcionalmente mayor. En el hombre, lo mismo que en muchos animales, la T4 es la iodotironina predominante. Sin embargo debemos mencionar, el hecho de que exista una menor proporción de T3 no disminuye necesariamente su importancia fisiológica, dado que la actividad biológica es considerablemente mayor que la de T4. Esta diferencia cuantitativa en cuanto a la efectividad entre T3 y T4 resulta útil desde el punto de vista de la conservación del iodo (Taurog, 1974).

Las hormonas tiroideas, así constituídas, se almacenan dentro de la glándula como iodotironinas incorporadas en la unión peptídica dentro de la proteína tiroglobulina, siendo ésta la única glándula endocrina que almacena su producto de secreción en cantidad apreciable.

La tiroides está inervada por los sistemas simpático y parasimpático. La presencia de esta inervación sugiere la participación del sistema nervioso en el control de la función del tiroides. La regulación de la secreción tiroidea, por tanto, se efectúa principalmente a través de la hormona tirotrópica (TSH) de la hipófisis anterior.

Por medio de la acción de estímulos apropiados (TSH hipofisaria), tendrá lugar la liberación de las hormonas tiroideas al torrente circulatorio. Para esto es necesario que el material coloidal sea "ingerido" por la célula tiroidea mediante picnóctosis, produciéndose por medio de unas proteasas liberadas por los lisosomas de las células tiroideas la hidrólisis de la tiroglobulina con el fin de liberar las hormonas T3 y T4 hacia los capilares que rodean a la célula tiroidea, mientras que la MIT y la DIT no van a la sangre, se deiodan *in situ*, por acción de un enzima con actividad deshalogenásica. El iodo y la tirosina, productos de esta acción enzimática, son probablemente reutilizados por las células foliculares, para siguientes iodaciones de tiroglobulinas. De esta forma las hormonas tiroideas son liberadas hacia la sangre (Brobeck, 1982).



Cuando penetran en la sangre se combinan con las siguientes proteínas plasmáticas: globulina fijadora de tiroxina (TBG), prealbúmina fijadora de tiroxina (TBPA) y albúmina. Cada una de estas proteínas fijan tanto la tiroxina como la tri-iodotironina, pero la afinidad por la tiroxina en cada uno de los casos es 10 veces mayor que para la tri-iodotironina (Snyder *et al.*, 1976; Robbins y Rall, 1979).

Durante el tránsito a través de un órgano (por ejemplo, el hígado) una porción de la hormona fijada se disocia y se transforma en hormona disponible para ser tomada por las células (Hillier, 1971; Hillier, 1975; Pangaro *et al.*, 1980). Al penetrar en las células tisulares, ambas hormonas vuelven a fijarse a proteínas intracelulares.

Existen importantes diferencias cuantitativas en cuanto a la distribución tisular de T3 con respecto a T4, quizás debido a una unión menos firme a las proteínas plasmáticas, de tal manera que, alrededor de un tercio de la cantidad extratiroidea de la T4 es extracelular. El hígado toma más del 80% de la T4 celular total y la mayoría del resto de hormona está distribuída en la piel, músculo y riñón (Oppenheimer *et al.*, 1967). En contraste la T3 es principalmente intracelular; sólo cerca del 15% es extracelular. El hecho de que la T4 sea principalmente extracelular y la T3 intracelular es consecuencia de dos razones: unión plasmática más débil y una unión celular más fuerte de la T3 en comparación con la T4 (Cavaleri y Rivers, 1981)

Figura 12.            Precursores de las hormonas tiroideas.

Figura 13.            Hormonas tiroideas.

Figura 14.            Metabolitos de las hormonas tiroideas.

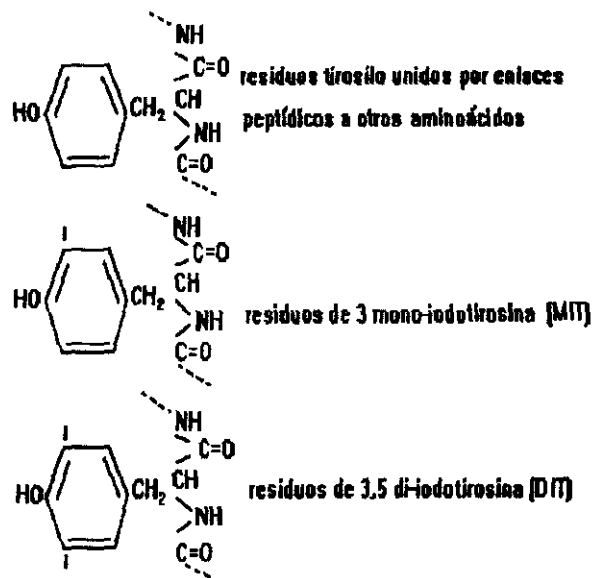


Figura 12

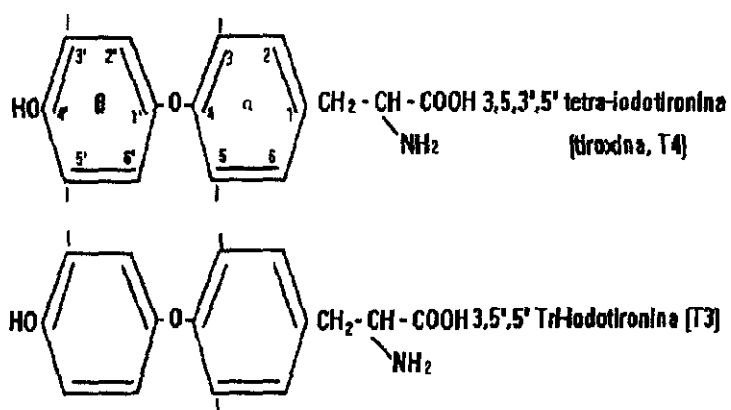


Figura 13

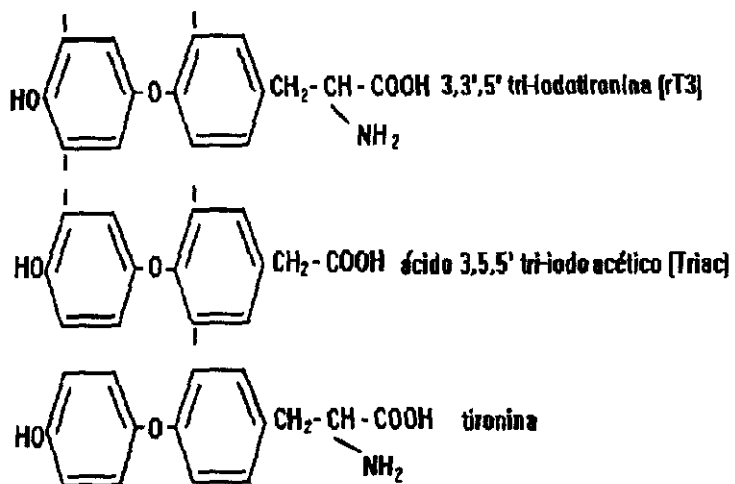


Figura 14

## MECANISMOS DE ACCION

### *Glucocorticoides*

Los glucocorticoides producidos por la corteza suprarrenal disminuyen las proteínas de casi todos los tejidos por lo que se producirá un aumento en la concentración plasmática de aminoácidos. Pueden actuar inhibiendo directamente el DNA, la síntesis proteica y la replicación celular (Loeb, 1976; Gutierrez-Hartman y Baxter, 1987). Sin embargo, estas hormonas aumentan las proteínas hepáticas y sanguíneas, es decir, que ejercen aquí un efecto opuesto al que tienen sobre las proteínas de los demás tejidos.

La acción de los glucocorticoides parece ser debida a un mayor desdoblamiento de las proteínas extrahepáticas, que supone un aumento paralelo de aminoácidos circulantes. A su vez, el hígado aprovecharía este aumento de aminoácidos para sintetizar más proteínas hepáticas y plasmáticas.

Aunque los glucocorticoides podrían actuar inhibiendo la producción de la hormona del crecimiento (Granner, 1979) y, quizás, la producción de somatomedinas, éste no parece ser el único mecanismo, pudiendo existir otros que expliquen la disminución de la ganancia proteica del organismo.

Es posible que los glucocorticoides puedan afectar a los sustratos superiores - como la glucosa-, lo cual, afectaría al crecimiento, o bien pueden inducir la síntesis de proteínas inhibitoras por la formación de complejos que bloqueen la síntesis de RNA.

El efecto de los glucocorticoides sobre el metabolismo proteico repercute, en forma importante, sobre la cetogénesis y la gluconeogénesis hepáticas, así como también puede inhibirse la proliferación del hepatocito (Loeb, 1976). Cuando faltan estas hormonas, los aminoácidos circulantes disminuyen tanto, que la cetogénesis y la gluconeogénesis a partir de las proteínas cesan casi por completo, no pudiéndose producir el catabolismo proteico.

## *Testosterona*

La hormona sexual masculina ejerce un papel regulador importante sobre el metabolismo proteico, actuando directamente sobre el músculo esquelético (Powers y Florini, 1975), siendo éste un papel fundamental de la hormona (Baulieu, 1975).

Se han identificado los receptores de la testosterona en el músculo esquelético (Michel y Baulieu, 1976; Krieg, 1976) existiendo una alta concentración de ellos en los músculos que son más sensibles a los andrógenos (Dube *et al.*, 1976).

La testosterona estimula la síntesis de RNA en el músculo esquelético por medio de un efecto en la cromatina nuclear (Breuer *et al.*, 1966). También, provoca un crecimiento del músculo y de otros tejidos por la deposición de proteína. No se conoce todavía, con exactitud, el mecanismo de producción de dicho depósito pero difiere al de la hormona de crecimiento.

La acción de la testosterona sobre la síntesis proteica en un tejido es limitada. La deposición proteica en el tejido sólo es efectiva mientras haya concentraciones circulantes elevadas de esta hormona, desapareciendo sus efectos al cabo de un determinado tiempo, pasado el cual aunque se produjeran altas dosis de testosterona, ésta ya no tendría efecto sobre la síntesis proteica en los tejidos. No ocurre lo mismo con la hormona del crecimiento, ya que ésta tiene un efecto continuo (mientras existan niveles plasmáticos adecuados se producirá síntesis proteica).

Los andrógenos -testosterona- pueden interferir la unión de los glucocorticoides a sus receptores en el citosol muscular (Mayer y Rosen, 1977). Es por ello que estos investigadores afirman que los glucocorticoides ejercen una respuesta catabólica en el músculo, asociado a una disminución de la síntesis de DNA, RNA y proteínas, opuesto al efecto de la testosterona sobre el metabolismo proteico del músculo, lo que presenta una alternativa del mecanismo de acción de la testosterona, como vía que reduce los efectos catabólicos de los glucocorticoides, por el desplazamiento de éstos de sus receptores. Estos efectos, también, se aprecian cuando utilizamos el esteroide

sintético: acetato de trenbolona (Buttery, *et al.*, 1978).

La testosterona se transporta en el plasma sanguíneo unida a proteínas mediante fijación débil y reversible. La albúmina sérica se une a la testosterona, mientras que la globulina, portadora de glucocorticoesteroides, se une al sulfato  $17\beta$ -testosterona y al glucorónido- $17\beta$ -testosterona. La androstenodiona circulante puede quedar en estado libre o unirse parcialmente a la albúmina o la globulina.

### *Estrógenos*

Los estrógenos naturales como el  $17\beta$ -estradiol y los sintéticos como el dietilestilbestrol, son bien conocidos por sus propiedades anabolizantes, bien utilizados solos o combinándolos con andrógenos.

Los estrógenos, que son la principal hormona femenina actúan también aumentando el depósito de proteínas (Chan y O'Malley, 1978), pero en menor medida que la testosterona. Los esteroides sexuales parecen influir sobre los mismos biomecanismos en sus órganos efectores, lo que sugiere la posibilidad de similares mecanismos de acción.

El papel de los estrógenos tiene importancia especial en rumiantes en virtud de su intenso efecto anabólico proteínico, fácil de comprobar cuando se administran pequeñas cantidades de un estrógeno no esteroideo sintético, dietilestilbestrol, para el engorde de bovinos destinados a la producción de carne (Clegg *et al.*, 1954). La implantación subcutánea de esta hormona produce también efecto anabólico manifiesto (Klosterman *et al.*, 1955). Durante más de 20 años se ha utilizado dicho efecto para aumentar la capacidad de utilización de los nutrientes por parte del ganado relluido en campos para engorde. Desconocemos todavía el mecanismo exacto de semejante estimulación, aunque sí sabemos que aumenta la anabolía proteínica y la retención de agua por el organismo. Este efecto aparece solamente cuando el ingreso de nutrientes digeribles totales se halla cerca del máximo aconsejable (Perry *et al.*, 1955).

Es posible que los estrógenos tengan una acción específica sobre el músculo, existiendo receptores de los mismos en las células musculares. Así, ciertos autores (Dube *et al.*, 1976; Dionne *et al.*, 1979) postulan la existencia de receptores estrogénicos y androgénicos en la célula muscular, mientras que otros autores (Michel y Baulieu, 1980) han encontrado receptores de estradiol y de androgenos pero con muy baja afinidad, por cualquiera de ellos, pudiéndose unir al receptor tanto estrogénico como androgénico, indistintamente. Curiosamente, aunque el estradiol se puede unir a los receptores androgénicos, el dietilestilbestrol, no parece tener la misma afinidad por esos receptores, por lo que es posible la existencia de un mecanismo de acción diferente entre los estrógenos naturales y los sintéticos. Esto puede ser la explicación de por qué los animales tratados *in vivo* con asociaciones de estrógenos y andrógenos dan un mejor resultado del que cabría esperar aisladamente.

Los estrógenos inhiben el crecimiento de los huesos y favorecen la osificación de las líneas epifisarias. Por esta razón, en las hembras cesa el crecimiento después de la pubertad, mientras que en los machos, con una pubertad más tardía, continúan los huesos creciendo antes de que los andrógenos detengan el crecimiento de su esqueleto.

### ***Progesterona***

Es utilizada en producción animal por sus propiedades anabólicas, aunque el mecanismo de acción es peor conocido que el de los otros dos tipos de hormonas anabólicas. La progesterona tiene un mecanismo de acción indirecto a través de los receptores androgénicos, habiéndose demostrado experimentalmente su competición por los lugares de unión a estos receptores. Esto se puso en evidencia al utilizar la nortestosterona, como componente de los progestágenos sintéticos, y ver que ésta se unía a los receptores androgénicos (Krieg, 1976; Michel y Baulieu, 1980).

### ***Hormonas Tiroideas***

Estas hormonas actúan a nivel celular provocando un aumento del metabolismo

basal, por lo que afecta de modo indirecto al metabolismo proteico.

Si los carbohidratos y las grasas no cubren las necesidades energéticas, la tiroxina provoca un rápido desdoblamiento de las proteínas, que se utilizará para producir la energía que falta para cubrir las necesidades del animal.

Por otro lado, si existe un aumento de grasas, glúcidos y carbohidratos, aumentarán los aminoácidos circulantes, la tiroxina actuará aumentando la síntesis proteica, para disminuir las concentraciones altas de aminoácidos. Por el contrario, la falta de tiroxina inhibe el crecimiento en los animales jóvenes, porque suprime la síntesis de proteínas.

En resumen, se cree que la tiroxina no influye de manera directa sobre el metabolismo proteínico, pero tiene un importante efecto general para acelerar los efectos anabólicos y catabólicos proteicos normales.

## ANABOLIZANTES

Se ha definido a los "anabolizantes", en el sentido amplio de la palabra, como toda sustancia, o composición, capaz de favorecer los procesos de síntesis (anabolismo), a expensas de disminuir los procesos de destrucción (catabolismo), de los diferentes componentes de los organismos animales.

Dentro de los anabolizantes, los que más específicamente nos interesan son los anabolizantes protéicos, que han sido definidos por la FAO y la OMS (Roma, 1979) como: "toda sustancia o composición capaz de mejorar la balanza nitrogenada de los animales por un aumento del anabolismo protéico".

Los anabolizantes, al servir de "manipuladores" de la síntesis proteica en los animales de abasto, pueden considerarse como capaces de aumentar la producción de carne.

Las principales sustancias dotadas de propiedades anabolizantes se pueden clasificar de la siguiente manera:

<b>ESTROGENOS</b>	. Esteroides Naturales	. Estradiol y sus Sales
	. Estrógenos vegetales	. Zeranol
	. Estrógenos de síntesis	. DES,Hexestrol, Dienestrol
<b>PROGESTAGENOS</b>	. Esteroides Naturales	. Progesterona
<b>ANDROGENOS</b>	. Esteroides Naturales	. Testosterona
	. Esteroides Xenobióticos	. Acetato de Trenbolona

Se consideran sustancias anabolizantes los estrógenos, progestágenos (hidroxiprogesterona, medroxiprogesterona) y los andrógenos, como los más



principales. El poder anabolizante es particularmente elevado en el caso de asociaciones de estas sustancias. Los anabolizantes empleados pueden ser naturales (17 $\beta$ -estradiol, testosterona y progesterona) o sintéticos, entre los cuales se encuentran los tan comentados estilbenos, cuyo representante más conocido es el dietilestilbestrol (DES). Otros anabolizantes sintéticos frecuentemente utilizados son el acetato de trenbolona y el zeranol. Los anabolizantes androgénicos están relacionados con la testosterona, siendo una de las sustancias más utilizadas, como anabolizante sintético el acetato de trenbolona, cuya semejanza con la hormona se puede apreciar en la figura 15. Las sustancias estrogénicas utilizadas como anabolizantes no son todas esteroides: las más utilizadas son el zeranol, el hexoestrol y el dietilestilbestrol (DES), todos productos sintéticos, con una configuración muy similar al esteroide natural (17 $\beta$ -estradiol).

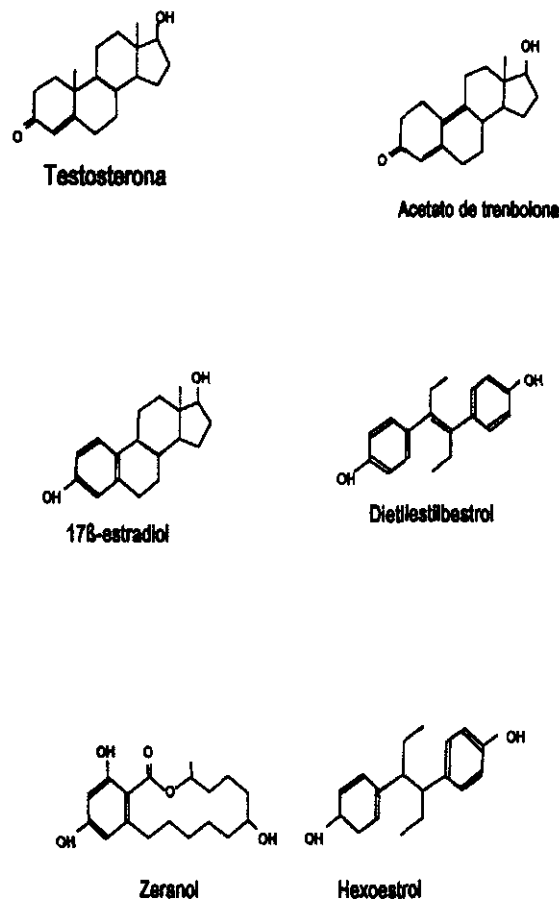


Figura 15

Como consecuencia de que la mayoría de los anabolizantes poseen propiedades fisiológicas similares a las de los esteroides sexuales naturales, con su uso, se pueden conseguir los siguientes efectos:

- \* Aumento del ritmo de crecimiento.
- \* Aumento de la masa muscular.
- \* Mejora de los índices de conversión.
- \* Cambios en la distribución de la grasa corporal.
- \* Mejora del apetito.
- \* Aumento de la capacidad muscular para el trabajo.

Sin embargo, no todos estos efectos ocurren al mismo tiempo y su respuesta depende de varios factores como: especie, sexo, raza, edad, aptitud etc. Así mismo también habrá que tener en cuenta el tipo de sustancia que se utilice, la dosis que se administre y la vía que se emplee.

En el Cuadro I, se indican los órganos productores de hormonas esteroides: testosterona, 17 $\beta$ -estradiol y progesterona, como hemos indicado, las más representativas de todo el arsenal endocrino y que sirven de modelo para los productos que se utilizan como anabolizantes.

## CUADRO I

### ORGANOS PRODUCTORES DE HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES

	TESTOSTERONA	17 $\beta$ -ESTRADIOL	PROGESTERONA
Organo Principal de Síntesis	Testículo	Ovario	Ovario Placenta
Organo Secundario de Síntesis	Ovario, adrenales y placenta	Testículo, placenta y adrenales	Testículo, placenta y adrenales
Otras Fuentes	Transformaciones	metabólicas	periféricas

La actividad anabolizante, de un gran número de hormonas y sus derivados, ha sido reconocida desde hace muchos años al incrementar la síntesis proteica, particularmente del músculo esquelético, por lo que se produce un incremento de peso en el animal.

Las hormonas masculinas y sus derivados han mostrado este tipo de actividad de manera efectiva y así en muchos mamíferos, de la misma especie, la musculatura de los machos está más desarrollada que la de las hembras. Se ha demostrado que la relación existente entre el desarrollo de la musculatura esquelética es androgénicamente dependiente (Papanicolau *et al.*, 1983). La castración de los machos trae como consecuencia una regresión de la musculatura, tal regresión puede hacerse reversible por la administración exógena de andrógenos (Kochakian, 1956).

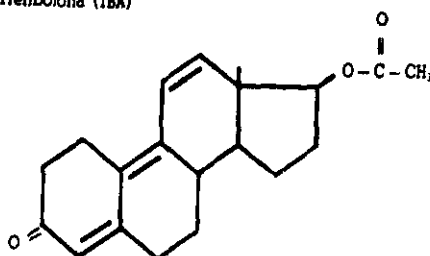
Dentro de los anabolizantes sintéticos que hemos visto anteriormente, uno de los más utilizados en la producción animal es el acetato de trenbolona debido a los

óptimos resultados obtenidos en el índice de conversión de los alimentos ya que éste aumenta la síntesis proteica.

El acetato de trenbolona (17 $\beta$ -acetoxi-estra-4,9,11-trien-3-one; TBA), es un potente anabolizante esteroideo de síntesis.

### **Estructura** (Figura 16)

Acetato de Trenbolona (TBA)



Fórmula molecular  $C_{20}H_{24}O_3$

El acetato de Trenbolona (anabolizante androgénico) se ha revelado como uno de los más potentes promotores del crecimiento animal que existen: en rumiantes (Heitzman y Chan, 1974), en cerdos (Grandadam *et al.*, 1975) y en pavos (Ranaweera, 1977).

El acetato de Trenbolona pertenece a una nueva familia de esteroides que se puede calificar de segunda generación: los trienos; caracterizados por la presencia de tres dobles enlaces en los tres ciclos hexagonales del núcleo esterol.

Los esteroides triénicos sólo pueden obtenerse por el método de síntesis total descubierto y puesto a punto en los Laboratorios de Investigación del Grupo Roussel Uclaf (Francia).

La degradación de esta molécula en los bovinos es bien conocida (Pottier *et al.*, 1975). Los datos principales que se refieren a ella, están resumidos en la siguiente figura 17.

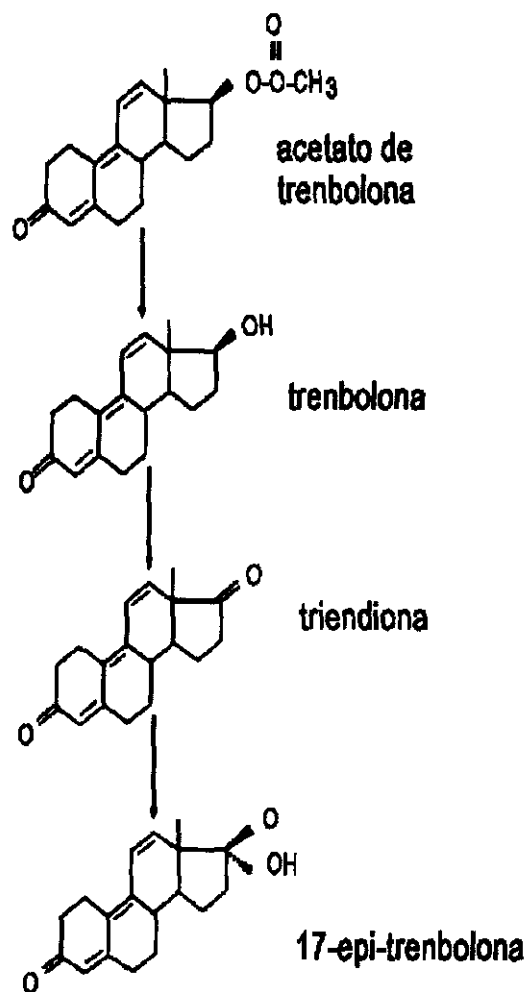


Figura 17

La vía de administración, generalmente, es la subcutánea, en forma de implante de acetato de trenbolona, tras su absorción, es rápidamente hidrolizada por esterasas a trenbolona base (17 $\beta$ -hydroxy-estra-4,9,11-trien-3-ona; TBOH), para sufrir un proceso de oxidación convirtiéndose en triendiona (estra-4,9,11-triene-3,17-diona; TBO); en rumiantes, ésta triendiona, es reducida a 17 $\alpha$ -triendiona o epi-trenbolona (17 $\alpha$  hidroxy-estra-4,9,11-trien 3-ona; epi-TBOH).

La trenbolona es el metabolito predominante en el músculo y en el plasma de rumiantes, mientras que la 17-epi-trenbolona, es el metabolito predominante en hígado, riñon, orina y heces (Jouquey *et al.*, 1983).

Los dos metabolitos mayores, trenbolona y epi-trenbolona (17 $\beta$ -trenbolona y su isómero, 17 $\alpha$ -trenbolona, el cual sólo posee el 20% de la actividad de la 17 $\beta$ -trenbolona) que subsisten en forma libre y, por lo tanto, biodisponibles son hidrolizados en la posición 16, siendo excretados o eliminados en forma de sulfatos y glucurónidos, por medio de la bilis.

Neumann (1975) ha determinado, en ratas las actividades o relaciones andrógenas y anabolizantes, de las principales moléculas androgénicas (testosterona propionato, nandrolona [19 nortestosterona], acetato de metenolona, metandrostenolona, acetato de trenbolona) comprobándose, que el acetato de trenbolona es:

- \* 10 veces más anabolizante que la testosterona (propionato).
- \* 3 veces más anabolizante que androgénico en las condiciones del experimento.

Otros ensayos han demostrado que esta diferencia puede ser incluso superior y que el acetato de trenbolona podría revelarse como 5 veces más anabolizante que androgénico.

En efecto, algunos autores demostraron, en ratas tratadas por vía subcutánea, basándose en los resultados de un test de Hershberger modificado, que el acetato de trenbolona es:

- \* Tan androgénico como la testosterona, pero 5 veces más anabolizante.
- \* 5 veces más androgénico y anabolizante que la 19 nortestosterona.

Estos resultados son ligeramente diferentes a los de Neuman (1975), lo que se debe a pequeñas variaciones de la técnica experimental empleada.

La utilización del acetato de trenbolona ha dado resultados espectaculares, como en el caso de los resultados descritos por Best (1972) en terneras de cebo, con incremento de la ganancia de peso del orden de un 33%.

Su empleo como producto único en forma de implante subcutáneo a una dosis de 300 mg/animal, ha dado buenos resultados tanto en terneras (Chan y Heitzman, 1975), como en vacas de desecho (Beranger y Malterre, 1968), si bien su asociación con estradiol, a dosis de 140 mg de acetato de trenbolona más 20 mg de estradiol, dio excelentes resultados, tanto en hembras como en machos (Tiews *et al.*, 1972; Gropp *et al.*, 1975).

Por lo tanto, el acetato de trenbolona potencia notablemente la actividad anabolizante de los estrógenos, especialmente del estradiol, empleándose principalmente en las hembras. Por su carácter androgénico suele utilizarse también en machos, sólo o asociado a compuestos estrogénicos.

Distinguiéndose el mecanismo de acción de la trenbolona del de la mayoría de los anabolizantes, en el sentido que no parece estimular la síntesis de proteína muscular, sino disminuir el catabolismo proteico, con el consiguiente aumento de la retención proteica tisular y mejora de los índices de conversión (Bouffault y Willemart, 1983).

## SEGURIDAD PARA EL CONSUMIDOR

La utilización de anabolizantes en el ganado de abasto ha sido motivo de polémicas constantes y objeto de legislaciones restrictivas. Algunos investigadores (Illera *et al.*, 1987; Illera *et al.*, 1991), han afirmado en reiteradas ocasiones, que esas prohibiciones responden más a razones políticas que científicas, ya que se ha demostrado que las concentraciones endógenas de las hormonas que poseen características anabolizantes son, en ocasiones, mucho más altas que cuando esos anabolizantes se administran exogenamente, como se puede observar en el siguiente cuadro, que representa los residuos de diversos anabolizantes (expresados en p.p.b.) y tasas fisiológicas de hormonas en diversos tejidos.

El cuadro, muestra que los residuos son, como máximo, del orden de p.p.b., siendo estos niveles notablemente bajos, ya que, un p.p.b. representa un gramo por mil toneladas.

Por otro lado, está perfectamente establecido, siempre con las reservas lógicas de los ensayos *in vivo*, que los esteroides endógenos, sea cual sea su origen, disponen de unas rutas metabólicas por las que se degradan rápidamente; de tal forma que casi se puede afirmar, con todo rigor, que las cantidades de hormonas que como residuos pueden llevar las carnes de los animales tratados con algunos anabolizantes, como el benzoato de estradiol, no afectan a la producción de hormonas en el consumidor, ya que se degradan rápidamente en el hígado. El consumidor produce diariamente cantidades superiores en determinadas ocasiones, se corre el mismo riesgo cuando se ingiere carne o leche de un animal no tratado.

Si transcurre un tiempo prudencial, entre la última dosis de anabolizante y el sacrificio del animal, lo más probable es que la cantidad de residuo sea casi indeterminable. Estudios realizados por Hoffman, (1983), con sustancias radiactivas han evidenciado que las concentraciones de anabolizantes eran del orden de partes por trillón (ppt).



ANABOLIZANTE	ANIMAL	TEJIDO				REFERENCIA
		Músculo	Hígado	Riñon	Grasa	
TESTOSTERONA	Novillo	0,53	0,75	2,80	11,00	Hoffmann y Rattenberger 1977
	Ternera	0,09	0,19	0,60	0,25	
	Ternero	0,02	0,04	0,26	0,69	
	Ternero Tratado*	0,07	0,05	0,69	0,34	
PROGESTERONA	Vaca gestante				360,00	Hoffmann, 1978
	Ternera				16,70	
	Ternero	0,25	0,27	0,46	5,80	
	Ternero Tratado**	0,52	0,33	0,62	12,50	
ESTRADIOL	Vaca gestante	0,37 a 0,68				Hoffmann, 1978
	Ternero	<0,10	<0,10	<0,10	< 0,10	
	Ternero Tratado***	<0,10	<0,10	<0,10	< 0,10	
	Buey		0,20	0,30		
	Ternera	0,10	0,40	0,40		
ACETATO DE TRENBOLONA	Buey Tratado****	0,05	0,23	0,05	0,08	Hoffmann y Oettel,1976
	Ternero Tratado****	0,13	0,52	0,24	0,39	

\* Estradiol 20 mg + Testosterona 200 mg

\*\* Estradiol 20 mg + Progesterona 200 mg

\*\*\* Estradiol 20 mg + Acetato de Trenbolona 140 mg

\*\*\*\* Estradiol 40 mg + Acetato de Trenbolona 200 mg

Las pruebas de toxicología especial incluyen, en particular, una serie de ensayos sobre el animal, con duración de vida real (dos años y más) que pueden precisar la naturaleza de los peligros eventuales.

Las pruebas de toxicidad de sustitución permiten evaluar el impacto sobre el animal que, durante su vida, ingiera carne de animales tratados (por lo tanto, conteniendo el conjunto de los residuos y metabolitos conocidos y eventualmente, desconocidos), con coeficientes de seguridad superiores a 100.

Es preciso señalar que una cantidad apreciable de alimentos corrientes poseen normalmente hormonas sexuales en cantidades a veces no despreciables, como lo muestra el cuadro siguiente, en el que se representan las tasas de hormonas sexuales en algunos alimentos corrientes (p.p.b)

ESTROGENOS	Leche de Vaca	0,08
	Leche de Vaca Gestante	0,13
	Germen de Trigo	4,00
	Aceite de Soja	2.000,00
PROGESTERONA	Leche Entera	0,001
	Crema, Nata	0,07
	Mantequilla	0,13

**Comparación de cantidad de hormonas sexuales en la carne de animales tratados, con las producciones humanas diarias.**

Si se comparan los residuos hormonales contenidos en un filete de 157 g procedente de un animal tratado, con la producción diaria de las mismas hormonas en el hombre, la producción humana resulta ser tantas veces mayor como se indica en el cuadro según Reid 1980.

HORMONA	ESTADIO	VECES MAYOR
ESTRADIOL	Muchacho Impúber	101.000
	Muchacha Impúber	157.000
	Mujer en Fase Folicular	554.000
	Mujer Menopáusica	134.000
	Hombre Adulto	397.000
PROGESTERONA	Muchacho Impúber	77.000
	Muchacha Impúber	128.000
	Mujer en Fase Folicular	215.000
	Mujer Menopáusica	169.000
	Hombre Adulto	210.000
TESTOSTERONA	Muchacho Impúber	41.000
	Muchacha Impúber	20.000
	Mujer con Ciclo	250.000
	Mujer Menopáusica	88.000
	Hombre Adulto	4.000.000

Con la lectura de este cuadro, se puede observar que el aporte de hormonas debido al tratamiento por anabolizantes, representa una parte totalmente despreciable de las producciones diarias humanas independientemente de la edad y del sexo de los consumidores y no puede, por lo tanto, perturbar los equilibrios naturales.

Por otra parte, se tendrá en cuenta que al ser esteroides el TBA, el estradiol, la progesterona y la testosterona, son además inactivados al pasar a través de la pared intestinal y el hígado.

## **Acetato de trenbolona: margen de seguridad**

### **Dosis sin efecto hormonal, para los anabolizantes xenobióticos.**

Después de profundas discusiones entre los especialistas de numerosos países, se ha llegado a un acuerdo sobre el siguiente punto: los únicos efectos secundarios eventuales de estas moléculas están ligados a su actividad de tipo hormonal, siendo de tipo androgénico para el acetato de trenbolona.

Por ello, es suficiente determinar primero la dosis sin efecto hormonal y compararla, a continuación, con las dosis de residuos que subsisten eventualmente en los productos alimenticios, para establecer el margen de seguridad.

El conjunto de datos contenidos en los estudios ha llevado a los expertos nacionales e internacionales, especialmente a lo largo del 25, 26 y 27<sup>º</sup> J.C.F.A. (Comité conjunto FAO/OMS de expertos farmacólogos y toxicólogos) a emitir una opinión favorable sobre el empleo como anabolizantes de cinco moléculas visadas por la Directiva de la C.E.E. del 31-7-81 (estradiol, progesterona, testosterona, zeranol y acetato de trenbolona).

## **METODOS INMUNOLOGICOS DE DETERMINACION DE HORMONAS**

El desarrollo de las técnicas inmunológicas competitivas de determinación hormonal en los años 60 causó una revolución dentro del mundo de la endocrinología veterinaria, y ha permitido a los distintos grupos de investigadores la comprensión de numerosos procesos fisiológicos, patológicos e incluso farmacológicos (Blake y Gould, 1984).

Debido a sus idóneas características para la determinación de hormonas esteroides y de los buenos resultados obtenidos, cada vez son más utilizadas a nivel mundial, incrementándose anualmente a razón de 500 a 1.000 millones de análisis, según Blake y Gould (1984).

Algunas de las características que presentan a estas técnicas como altamente competitivas, para la determinación de las hormonas esteroides, son:

- La alta sensibilidad que poseen, hasta fentomoles ( $10^{-18}$ ), lo cual permite determinar las concentraciones plasmáticas de las hormonas esteroides.
- Elevada especificidad que permite la diferenciación entre los distintos tipos de esteroides, fundamental en estos compuestos pues poseen una estructura química muy similar.
- Disponen de una gran repetibilidad, minimizando los errores debidos al azar.
- Posibilidad de determinación en cualquier fluido biológico: plasma, leche, orina, saliva, líquido folicular (Silván, 1991).
- No requieren de personal altamente cualificado ni de una compleja infraestructura, luego son relativamente económicos de realizar (Silvan, 1991).

Todas estas técnicas inmunológicas están basadas en la formación de un complejo Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac), (Yalow y Berson, 1959, 1960; Abraham, 1969, 1975) comportándose como antígeno las hormonas, añadiendo una parte unida a una sustancia marcadora y la otra, bien como muestra problema o bien en cantidad conocida, y como anticuerpo, una cantidad fija de anticuerpo específico. De esta forma, la hormona libre y la hormona marcada compiten por unirse a los lugares de unión del anticuerpo. Tras un período de incubación se separan las fracciones libres y unida al anticuerpo, midiéndose la cantidad de hormona marcada en una de estas dos fracciones, y se tendrá en cuenta que la cantidad de hormona marcada ligada a los lugares de unión del anticuerpo será inversamente proporcional a la concentración de hormona problema.

Las estructuras químicas de los esteroides son muy similares entre si (tan solo diferenciadas en grupos funcionales, generalmente en los carbonos 3 y 17). Debido a esta característica se pueden utilizar diferentes métodos y variantes para poder identificarlos, pudiéndose clasificar estos en dos grandes grupos, atendiendo a la utilización o no de isótopos radioactivos.

Los sistemas que utilizan isótopos radioactivos tienen la ventaja de que estos producen una señal muy clara y fácilmente detectable pero, por otro lado, una gran número de investigadores pusieron en evidencia una serie de inconvenientes (Schuurs y Van Weemen, 1980; Riad-Fahmy et al., 1981; Blake y Gould 1984; Tijssen, 1985; Munro y Lasley; 1988).

- La radiación puede producir daños, incluso la destrucción de las moléculas de las hormonas marcadas.
- Requieren un equipo costoso y alta cualificación del personal que lo utiliza.
- El manejo de material radioactivo presenta riesgos y puede suponer un peligro potencial para la salud y el medio ambiente.

- Se pueden presentar grandes variaciones entre los lotes de hormonas marcadas radiactivamente ya que la vida media de los isótopos radioactivos es relativamente corta
- La separación de las fracciones unida/libre es complicada, en el caso del RIA, lo que dificulta la automatización de esta técnica.

A pesar de estos inconvenientes han sido muy empleadas, pudiéndose incluir en este grupo las siguientes técnicas:

- \* **Radioinmunoanálisis (RIA):** ha sido muy empleada. Yalow y Berson la utilizaron por primera vez en 1958 para determinar la insulina en sangre. Consiste en un análisis competitivo con hormona marcada en fase líquida.
- \* **Técnicas inmunorradiométricas (IRMA):** Miles y Hales (1968) emplean un anticuerpo marcado con un isótopo radiactivo en fase sólida, pudiendo ser determinado el antígeno o el anticuerpo.
- \* **Análisis Sandwich o de "dos sitios":** En este tipo la fase sólida se adhiere a un anticuerpo, al cual se une el antígeno, detectándose la unión mediante un anticuerpo específico marcado, que en otra variedad de esta técnica es una antiglobulina marcada.

En los últimos tiempos se ha producido un gran desarrollo de las técnicas no isotópicas, denominadas Enzimoimmunoanálisis (EIA) que reúne las ventajas de las anteriores pero sin presentar sus inconvenientes. Sustituyen los isótopos radiactivos por otras sustancias marcadoras, presentando una alta sensibilidad y especificidad, son rápidas y sencillas de llevar a cabo, por lo que permite su utilización en pruebas de campo, además los reactivos son económicos y con una vida media larga no siendo peligrosos para la salud. Permite el uso de anticuerpos monoclonales. Su evaluación es objetiva y son fácilmente reproducibles.

El Enzimoimmunoanálisis (EIA) para determinación de esteroides empezó a utilizarse hace dos décadas, concretamente para la determinación de estrógenos (Van Weemen y Schuurs 1971, 1972). Engvall y Perlmann (1971, 1972) desarrollaron una variante de esta técnica a la que denominaron ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay o análisis enzimático unido a un inmunoabsorbente) donde el antígeno o anticuerpo está absorbido a la fase sólida. La emplearon por primera vez para la determinación de inmunoglobulinas, en conejo.

Los marcadores no isotópicos más empleados para la determinación de hormonas esteroides son los enzimáticos, aunque también se emplean los quimioluminiscentes y fluorescentes (Maggio, et al, 1980; De Boever et al, 1983, 1984, 1986; Tsuji, 1987; Munro y Lasley, 1988). Como marcadores también se han utilizado bacteriófagos (Andrieu et al., 1975), coenzimas (Kohen et al., 1978) y ultimamente, se emplean cada vez más los radicales libres estables (Munro y Lasley, 1988).

El EIA es utilizado en gran número de campos: Microbiología, Virología y Farmacología (Maggio, 1980; Schuurs y Van Weemen, 1980). Debido a esta amplia gama de posibilidades existen varias clasificaciones aunque todas muy similares.

Una primera clasificación los divide en heterogéneos y homogéneos (Van Weemen y Schuurs, 1976, 1979; Engvall, 1980; y Oellerich, 1983):

**A) Heterogéneos**, basándose en los mismos principios que el RIA, ya que tras la formación del complejo antígeno-anticuerpo es necesario la separación de las fracciones unida-libre y determinar al menos la actividad de una de ellas, existiendo tres tipos de separación de las fracciones libre y unida al anticuerpo: el DA o de doble anticuerpo, en el que se utilizan el anticuerpo específico y posteriormente una IgG, antiespecie, de donde se produjo el primer anticuerpo, el DASP o de doble anticuerpo en fase sólida, en el que el segundo anticuerpo está unido a una fase sólida, y ELISA método de separación en fase sólida, que es el más utilizado actualmente en el que mediante el volcado de las fases de la reacción y sucesivos lavados se elimina la fase libre.



**B) Homogéneos** (EMIT: Enzyme-multiplied immunoassay technique, Rubestein *et al.*, 1972), en los que no es necesaria la separación. La actividad de la enzima marcadora depende de la concentración existente de hapteno libre, que compite con el conjugado por unirse al anticuerpo específico (Oellerich, 1983). Se pueden establecer dos tipos:

- La actividad de la enzima marcadora disminuye si se une a un hapteno marcado al anticuerpo específico, por reducir éste la afinidad del sustrato por el lugar activo de la enzima.
- La actividad de la enzima marcadora es inhibida si se conjuga un hapteno, siendo reactivada al unirse al anticuerpo específico.

En principio, los EIA homogéneos servirían para la determinación de sustancias con bajo peso molecular (como los esteroides) pero en la práctica éstos presentan el inconveniente de la posibilidad de contaminación que altere la actividad enzimática, además su escasa sensibilidad (mg/ml o ug/ml) les hace ser inferiores a los EIA heterogéneos (Dhar *et al.*, 1988). Por otra parte, los amplios conocimientos de enzimología necesarios para su interpretación les hace poco competitivos ante el EIA heterogéneos actualmente más empleados.

Clark y Engvall (1980) clasificaron las técnicas de ELISA en dos grandes grupos:

- **Competitivas:** donde en unos se marca el antígeno con la enzima y en otros es el anticuerpo el que se conjuga a esta. Este tipo es el más utilizado para la determinación de hormonas esteroides.
- **No competitivas:** que a su vez se pueden dividir en tres tipos; de un sólo sitio, sandwich o de dos sitios, e indirecto para la cuantificación de anticuerpos. En este caso, como su nombre indica, no hay competición y la hormona marcada y sin marcar se unen en distintos puntos.

Tijssen (1985) también clasifica los EIA en dos tipos:

- EIA de amplificación de la actividad (AA): se busca la máxima señal posible del compuesto analizado mediante un gran exceso de reactivos.
- EIA de modulación de la actividad (MA): Se utilizan una menor cantidad de inmunorreactivos por lo que la señal producida es resultado de la competición de las moléculas problema y las marcadas por una cantidad limitada de anticuerpo.

Ambos pueden ser homólogos o heterólogos y competitivos o no competitivos, siendo los EIA heterogéneos competitivos de MA los más utilizados para la determinación de hormonas esteroides.

Hay que destacar la importancia de una serie de conceptos para el desarrollo del EIA como son el de homología y heterología (Van Weemen y Schuurs, 1975). Un método es homólogo cuando se utiliza el mismo esteroide, tanto para la producción del anticuerpo específico, como para la conjugación a la enzima, siendo por el contrario heterólogo cuando los derivados utilizados para inmunógeno y conjugado son distintos. El anticuerpo específico reconoce tanto a la hormona esteroide para la cual ha sido producido como al derivado empleado para el conjugado, pero tiene mayor afinidad por este último, con lo cuál hay una gran especificidad, pero disminuye la sensibilidad; sin embargo, mediante la heterología disminuye la afinidad del anticuerpo por el conjugado y permite la competición de la hormona sin marcar, aumentando por tanto la sensibilidad.

Según Van Weemen y Schuurs (1975,1976) proponen tres tipos de heterología, siendo los dos últimos los más utilizados:

- De hapteno: se pueden utilizar dos haptenos distintos.

- De posición: un mismo derivado hapténico pero situado en carbonos distintos.
- De enlace: se usan derivados con grupos distintos.

# **MATERIAL Y METODOS**

## **A) ANIMALES**

Para la realización de nuestro estudio se utilizan un total de 30 animales de ganado vacuno de aptitud cárnica, estirpe Limousine x Charoles, de distintos sexos, con una edad de 6-8 meses y pesos con unas medias 384,20 - 367,80 kg de machos control y tratados respectivamente y de 340,40 - 342,70 kg de las hembras control y tratadas, alojados en la finca "DEHESA DEL MORO S.A." (Toledo), encontrándose en condiciones controladas, tanto de alimentación como sanitarias.

Con el fin de obtener resultados reproducibles, es necesario adoptar una metodología estricta que permita sacar datos fiables hechos sobre los lotes de animales, ya que el empleo de anabolizantes en los bovinos es una forma de aumentar sus resultados zootécnicos, pero para que éstos sean óptimos se ha de contar también con una buena sanidad y buenas condiciones ambientales. En relación a dichas condiciones nosotros realizamos.

### **Fase pre-experimental:**

#### **- A la llegada de los animales:**

- \* Confort del alojamiento.
- \* Estricto cumplimiento en cuanto a normas de densidad, disponibilidad de comederos, bebederos, aireación.
- \* Pesado y marcaje individual.
- \* Medidas higiénicas, tratamiento antiparasitario externo e interno, parásitos gastrointestinales y pulmonares (estrongilos), parásitos hepáticos (fasciola), parásitos externos (piojos y ácaros). Por lo que se refiere a este último punto creemos conveniente destacar que numerosos ensayos practicados en diversas universidades

norteamericanas han demostrado que la administración de un estrongilicida al comienzo del período de cebo aumenta considerablemente los resultados de crecimiento de los animales tratados con anabolizantes.

- \* Adaptación a la nueva alimentación. Por lo que se refiere a este tema nos parece importante subrayar la necesidad de un correcto aporte mineral en los animales tratados con anabolizantes. Los oligoelementos desempeñan un papel esencial, ya que influyen sobre cofactores o constituyentes de algunos elementos de la sangre, sobre enzimas o grupos de enzimas que intervienen en la síntesis proteica. Se ha comprobado que en el animal tratado, cuando se le disminuye la calidad del alimento, se produce un descenso de los rendimientos zootécnicos. Por tanto, nosotros suministramos al animal un alimento perfectamente equilibrado y correspondiente a la fase que se encontraba.

Incluyendo:

-	Soja 44	20,0 %
-	Maiz nacional	20,0 %
-	Cebada	55,5 %
-	Grasa By-Pass	1,5 %
-	Corrector	3,0 % (Carbonato, fosfato y oligoelementos)

- \* Pesaje individual y reparto en lotes homogéneos.
- \* A las hembras se las practicó una sincronización del celo previa, con el fin de minimizar las variaciones hormonales derivadas de los diferentes estadios cíclicos interanimal.

Los animales se mantuvieron en régimen semiextensivo y realizamos controles sanitarios a lo largo de toda la duración de la experimentación.

Los animales los clasificamos en los siguientes grupos, realizados al azar:

**A.1 - GRUPOS CONTROL:** animales que no recibieron tratamiento.

Divididos según el sexo:

- Hembras (n=5).
- Machos (n=5).

**A.2 - GRUPOS TRATADOS:** animales que recibieron el tratamiento.

Divididos según el sexo:

- Hembras (n = 10).
- Machos (n = 10).

Tanto a los machos como a las hembras se les aplicó un implante de acetato de trenbolona, tomando como punto de partida de la experiencia el momento de la colocación del implante.

## **B) TECNICA DE IMPLANTACION**

Se realizó un único implante a cada animal problema, por vía subcutánea, de forma que los "pellets" quedasen colocados en el tejido conjuntivo subcutáneo, entre la piel y el cartílago, de la parte posterior, de la cara externa del pabellón auricular, mediante la utilización de una pistola diseñada para tal fin, teniendo especial precaución con los vasos marginales de dicha zona y previa desinfección de la misma con el fin de prevenir infecciones, abscesos y reacciones inflamatorias importantes que pudieran provocar la formación de una dureza conjuntiva que impidiese una buena reabsorción.

### **C) IMPLANTE**

Se ha utilizado como implante el acetato de trenbolona (TBA), comercializado como "Finaplix -h" de los Laboratorios Russel Uclaf (Francia).

Cada implante contiene 200 mg de acetato de trenbolona, formado por 10 pequeños "pellets", incluidos en un único cartucho, lo que constituye el total de la dosis aplicada a cada uno de los animales tratados.

Se mantuvieron las debidas precauciones de manipulación del producto, como fuerón; guardarlos en refrigeración entre 2 y 8 °C y protegido de la luz, antes de su aplicación.

### **D) RECOGIDA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS**

Para la recogida de la sangre se siguió la misma metodología y frecuencia en ambos grupos.

Salvo en los casos de horarios detallados, la toma de muestras se llevó a cabo entre las 8 y 10 a.m., en la vena caudal, recogiendo aproximadamente 10 ml de sangre por animal, realizándose según el siguiente proceso:

#### **PROTOCOLO DE FRECUENCIA DE RECOGIDA DE MUESTRAS**

<b><u>MUESTRA N°</u></b>	<b><u>TIEMPO DESPUES DE LA ADMISTRACION DEL IMPLANTE DE TREN BOLONA</u></b>
--------------------------	---

1	0 horas
2	2 horas
3	8 horas
4	24 horas
5	2 días



6	3 días
7	4 días
8	5 días
9	6 días
10	7 días
11	8 días
12	9 días
13	10 días
14	12 días
15	14 días
16	16 días
17	18 días
18	20 días
19	24 días
20	28 días
21	32 días
22	36 días
23	40 días
24	45 días
25	50 días

La sangre se recoge mediante agujas especiales para los tubos vacutainer de 0,9 \* 40 mm (20 G\* 1<sup>1/2"</sup>) de Becton Dickinson, en tubos Vacutainer con heparina sódica de 16 \* 100 mm, también de Becton Dickinson.

Tomando como punto de partida en la recogida de sangre, el momento del implante (hora 0), se sigue el siguiente protocolo para la obtención de un total de 25 muestras. Dentro de las primeras 24 horas tras el implante, se realizan 3 tomas, pasando posteriormente a una toma diaria durante 10 días consecutivos. A continuación se recogen las muestras en días alternos hasta la toma 18, a partir de la cual se realizó cada 4 días, finalizando con la toma número 23, las dos últimas se realizarón a intervalos de cinco días. Según se muestra en el esquema adjunto.

La sangre recogida se separó en sus dos componentes mediante centrifugación a 1.300 x g durante 20 minutos por medio de una centrifuga "Angular-6" (Selecta, S.A.).

El plasma que se obtiene, por medio de una pipeta pasteur (Brand), se guardó en tubos de plástico de 3 cc, realizándose una alícuota por determinación, que fueron taponadas y selladas con parafilm (American Can Company), así como debidamente codificadas (con el número de animal, toma, número de alícuota, fecha de recogida y sexo).

Las alícuotas se congelaron a -30°C hasta su posterior análisis en el laboratorio.

### **DETERMINACIONES HORMONALES DE LAS MUESTRAS DE PLASMA MEDIANTE ENZIMOINMUNOANALISIS**

Se utiliza el enzimoinmunoanálisis, ELISA de competición en placa, desarrollado en nuestro Departamento por la Dra. Silván (1991), para la determinación de las hormonas esteroides: progesterona, 17β-estradiol, testosterona y cortisol.

Para las determinaciones de tri-iodotironina (T<sub>3</sub>), tiroxina (T<sub>4</sub>) (ELISA de competición) y hormona estimulante de la tiroides (TSH) (ELISA Sandwich) se utilizó el kitt comercial "Enzymun Test" en tubo de los Laboratorios Boeheringer Mannheim.

Para la determinación de Trenbolona se utiliza la metódica del enzimoinmunoanálisis, ELISA de competición en microplacas, con las adaptaciones pertinentes para poder ser utilizado para nuestro tipo de muestra.

## **Determinación de: cortisol, 17 $\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona mediante la técnica ELISA de competición**

### **Estadarización del Enzimoimmunoanálisis ELISA de Competición**

Después de obtener los anticuerpos y conjugados necesarios para desarrollar el método enzimoimmunoanalítico, ELISA de competición, se realizó la puesta a punto del mismo:

- Calidad de los materiales y reactivos empleados.
- Fijación de las condiciones del ensayo: fase sólida (microplacas), tiempos de incubación, temperatura de realización de las distintas etapas del ensayo, tiempos de lavado y tapizado de las microplacas.
- Establecimiento de las diluciones óptimas de trabajo, tanto del anticuerpo como del conjugado.
- Finalmente, se construyó la curva patrón, para cada hormona, con la ayuda de una serie de diluciones estándar de las hormonas.

### **Material**

- Microplacas de 96 pocillos de fondo plano de poliestireno y de una capacidad de 350 microlitros por pocillo (Dynatech).
- Tapas de poliestireno para placas ELISA (Dynatech).
- Puntas desechables, para pipetas Eppendorf, de 10-200  $\mu$ l y de 100-1.000  $\mu$ l (Comfortips, Eppendorf).
- Puntas de pipeta multicanal, 25-250  $\mu$ l (Costar).

- Pipetas automáticas Eppendorf (Merck) de 10-100  $\mu$ l y de 100-1000  $\mu$ l.
- Pipeta multicanal de ocho canales, de 50 -250  $\mu$ l (Costar).
- Agitador (Vórtex) Reax 2.000 (Heindolph).
- Pipetas de cristal de doble enrase de 5 y 10 ml (Protón).
- Parafilm (America Can Co).
- Tubos de ensayo de cristal de 16 x 25mm (Beckson Dickinson).
- Lector automático de placas (Eurogenetics).

#### **Reactivos**

- Acido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ) (Merck).
- Acido 2-[(etilmercurio)tio] benzóico, sal sódica (Thimerosal)(Merck).
- Agua purificada.
- Albúmina sérica bovina, fracción V (Cohn. Sigma & Co).
- Anticuerpos obtenidos y caracterizados en el Departamento de Fisiología Animal (Facultad de Veterinaria. U.C.M.): anti- testosterona, anti- progesterona, anti-cortisol, anti-17 $\beta$ -estradiol.
- Conjugados hormona-peroxidasa, preparados y caracterizados en el Departamento de Fisiología Animal (Facultad de Veterinaria.UCM, Madrid): anti-testosterona, anti-progesterona, anti-cortisol anti- estradiol-17 $\beta$ .

- Di-sodiohidrogenofosfato anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Merck).
- Etanol absoluto (Prolabo).
- Eter de petróleo (Panreac).
- Hormonas esteroides estandar (Steraloids Inc., N.Y., USA)
  - \* 4-Andostren-17 $\beta$ -ol-3-ona: Testosterona.
  - \* 1,3,5(10)-Estrien-3,17 $\beta$ -diol: 17 $\beta$ -Estradiol.
  - \* 4-Pregnen-3,20-diona: Progesterona.
  - \* 4-Pregnen-11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-triol-3,20 dione 3CMO (Cortisol 3-CMO): Cortisol.
- Ortofenilén-diamina dihidroclorhidrato (OPD) (Sigma).
- Peróxido de hidrógeno:  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% y 110 vol.(Merck).
- Sodio Carbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Merck).
- Sodio citrato di-básico 1 $^{1/2}$  Hidrato ( $\text{NaH}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_5 \cdot 1\frac{1}{2}$ ) (Panreac).
- Sodio Cloruro ( $\text{NaCl}$ ) (Probus).
- Sodio dihidrogenofosfato monohidrato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (Merck).
- Sodio hidrogenocarbonato ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Merck).
- Tween-20 (Merck).

## Soluciones tampón

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

Para 1.000 ml de solución:

$\text{Na}_2\text{CO}_3$ : 1,59 g.

$\text{NHCO}_3$ : 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.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 8, 662 g.

$\text{NaCl}$ : 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:

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ : 13 g.

$\text{Na}_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_5 \cdot 1\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ : 28 g

$\text{H}_2\text{O}_2$  30%, 110 vol: 1 ml.

Thimerosal 1%: 10 ml.

Conservar a 4°C

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

Para 1.000 ml de solución:

NaCl 1,5M: 87,66 g.

Tween-20 0,5%: 5 ml.

Conservar a temperatura ambiente.

### **Condiciones del ensayo:**

Siguiendo el criterio de Silván (1991), son las siguientes:

#### **Fase sólida:**

Se utilizan microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Dynatech), con tapa de poliestireno (Dynatech) y parafilm.

#### **Condiciones de incubación:**

- 1) Inmovilización del anticuerpo a la fase sólida: 16 horas, 37°C.
- 2) Reacción de competición: 2 horas en oscuridad a temperatura ambiente.
- 3) Hidrólisis del sustrato: 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente.

La temperatura ambiente debe ser de 20-22°C, en ningún caso superior a 24°C, ya que a esa temperatura las reacciones enzimáticas no son estables, lo que puede conducir a variaciones en las medidas de absorbancia (Zarco, 1988).

#### **Tiempos de lavado y tapizado:**

- 1) Lavados: de 5-10 segundos cada uno.

- 2) Tapizado de las placas con la solución de conjugado: no debe ser superior a 10 minutos, porque en caso contrario, se observan variaciones en los valores de absorbanza de las columnas tapizadas en los últimos lugares (Silván, 1991).

**Determinación del comportamiento de los anticuerpos y conjugados en ELISA:  
determinación de las diluciones óptimas de trabajo en el ensayo**

Con el fin de poder determinar las diluciones óptimas de trabajo, de los anticuerpos, y de conjugados, frente a las citadas hormonas esteroideas (cortisol, 17 $\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona), es necesaria la realización previa de una serie de pruebas que consisten en el enfrentamiento de diluciones variables tanto de anticuerpo como de conjugado.

Las diluciones empleadas son las siguientes:

- Para los anticuerpos: 1/1.000; 1/2.000; 1/4.000 y 1/8.000.
- Para los conjugados: 1/10.000; 1/20.000; 1/40.000 y 1/60.000.

Dichas diluciones crecientes, para cada una de las hormonas, se distribuyen en microplacas de fondo plano de la siguiente manera:

**Anticuerpos:**

Columnas 1-3: 1/1.000  
Columnas 4-6: 1/2.000  
Columnas 7-9: 1/4.000  
Columnas 10-12: 1/8.000



### **Conjugados:**

Filas A-B: 1/10.000

Filas C-D: 1/20.000

Filas E-F: 1/40.000

Filas G-H: 1/60.000

Siguiendo el criterio de Munro y Stabenfeldt (1984), seleccionamos aquellas diluciones que presentaran una densidad óptica de 0,6 - 0,8 a 450 nm.

**Cortisol: Anticuerpo: 1/8.000. Conjugado: 1/60.000**

**17 $\beta$ -Estradiol: Anticuerpo: 1/2.000. Conjugado: 1/20.000**

**Progesterona: Anticuerpo: 1/4.000. Conjugado: 1/40.000**

**Testosterona: Anticuerpo: 1/8.000. Conjugado: 1/60.000**

### **Trazado de las curvas estándar**

Para el trazado de la curva estándar o patrón se parte de una de solución madre de concentración conocida 2 mg/ml en etanol absoluto de cada una de las hormonas: cortisol, 17 $\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona, las cuales se van diluyendo sucesivamente dentro del margen de 1 pg hasta 1 ng.

Las diluciones se realizan en tubos de cristal de 10 x 50 mm, con etanol absoluto, dejando que el alcohol se evapore con el fin de conseguir la solubilización del esteroide.

Se deja evaporar el alcohol y, a continuación, se añade el conjugado con la dilución de trabajo en cada tubo, con distinta concentración estándar. Se analizan por ELISA de competición, para establecer las medidas de densidad óptica a 450 nm.

Con las medidas de la absorbancia se trazan las curvas estándar, que permiten luego calcular la concentración de cada hormona, en una muestra problema, relacionando las absorbancias obtenidas con las concentraciones que se corresponden a la curva patrón.

Para el trazado de la curva se sitúan en el eje de abscisas las concentraciones estándar con sus respectivas diluciones y en el eje de ordenadas la relación  $E/E_0$  que indica el % de unión de las muestras estándar con el anticuerpo.

Para calcular las concentraciones de las muestras problema se utilizó un software especial (Informatic Department, Universidad de California, Davis, USA) que relaciona los datos de las absorbancias con las curvas patrón, y nos proporciona las concentraciones de las muestras problema que deseamos conocer.

El margen de la curva estándar varía en función de la concentración esperada de la hormona a determinar. En el caso de testosterona, progesterona, cortisol es de ng/ml y para  $17\beta$ -estradiol es de pg/ml.

### **Desarrollo de la técnica ELISA de competición**

En la técnica de ELISA de competición, una cantidad limitada de anticuerpo específico se fija a la fase sólida, lavando posteriormente el anticuerpo que no haya reaccionado, añadiendo a continuación la muestra problema y el conjugado hormona-enzima. Se lava para eliminar la hormona sin conjugar y se mide la fracción unida mediante la absorción del sustrato y la lectura de la absorbancia del color desarrollado.

Comprende las siguientes etapas:

- 1) Adsorción de los anticuerpos a la fase sólida (microplacas de poliestireno).
- 2) Reacción de competición: adición de la muestra o del estándar 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:**

Las microplacas, de fondo plano, se tapizan con 100  $\mu$ l en todos los pocillos menos uno (A1), que se deja como blanco. Las diluciones pertinentes del anticuerpo se llevan a cabo en agua bidestilada desionizada hasta alcanzar la dilución deseada de trabajo.

A continuación las placas se sellan con Parafilm, se tapan e incuban 16 horas en estufa a 37°C.

La adsorción de los anticuerpos a 37°C y su dilución en agua reduce la reacción de fondo inespecífica (Coll, 1988).

Con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo que no haya sido adsorbido a la placa, se practican tres lavados con solución de lavado (200  $\mu$ l por pocillo), así como un completo secado mediante volteo en papel de filtro.

**2) Reacción de competición:**

Esta reacción tiene lugar entre la hormona libre (estándar o problema) y la conjugada al enzima. Los conjugados se diluirán en solución tampón de EIA a la dilución de trabajo para cada una de las hormonas, mezclándose tanto las muestras

problema como las estándar con la dilución apropiada de conjugado.

Las muestras estándar y problema se determinan por duplicado distribuyéndose en la placa: (Según se muestra en el esquema I)

Columna 1: La denominamos EoS; en ella sólo añadimos dilución de conjugado.

Columna 2-3: En ellas se añaden las distintas diluciones de las hormonas estándar diluidas en el conjugado.

Columna 5-11: En ellas se añaden las muestras problema por duplicado diluidas en el conjugado.

Columna 12: Se denomina EoE y en ella se añade dilución de conjugado.

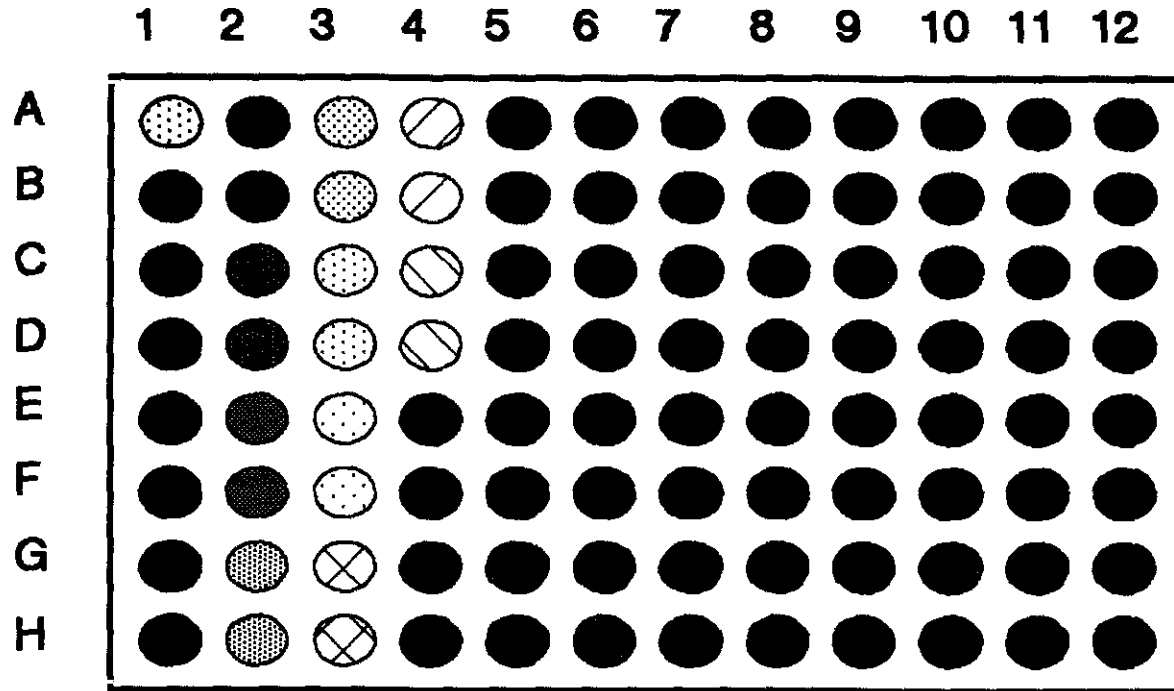
Para llevar a cabo la reacción de competición se tapiza la placa con 50  $\mu$ l de tampón ELISA, en todos los pocillos, por medio de una pipeta multicanal, para después añadir 50  $\mu$ l de los reactivos siguiendo el orden preestablecido con anterioridad.

Las placas se sellan con parafilm y con su correspondiente tapa, incubándose durante un período de dos horas en la oscuridad a temperatura ambiente; ésto es un factor determinante para el desarrollo de la correcta reacción debiendo estar controlado y mantenido lo más uniformemente posible con el fin de no alterar la reacción de competición.

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

Se realiza mediante el volcado de las placas, efectuándose tres lavados con 200  $\mu$ l de la solución de lavado, así como un secado perfecto.

# DISTRIBUCION DE LA PLACA PARA ELISA DE COMPETICION



BLANCO



ESTANDAR



$E_0$



MUESTRA

Esquema I

#### **4) Adición del sustrato y del cromógeno:**

El sustrato utilizado se obtiene diluyendo 10  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$  30%, 110 vol), en 10 ml de tampón sustrato, al que se le añade, 30 minutos antes de ser utilizado, el cromógeno, ortofenilendiamina dihidroclorhidrato (OPD), a una concentración de 1 mg/ml, guardando las debidas precauciones en la preparación y conservación de esta mezcla para prevenir la autoxidación, como son: guardarla en la oscuridad, cerrarla herméticamente y conservándola a temperatura ambiente.

En todos los pocillos de la placa se añaden 100  $\mu$ l de la mezcla de sustrato cromógeno, realizándose, de nuevo, una incubación, por un período de tiempo de una hora, en las mismas condiciones que la anterior.

#### **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 los filtros de 450 y 600 nm, realiza una lectura bicromática que elimina el color producido por una posible reacción de fondo.

### **Análisis de hormonas esteroides de las muestras procedentes de los grupos de animales**

Una vez puesta a punto la técnica ELISA de Competición, para la determinación de **cortisol**, **17 $\beta$ -estradiol**, **progesterona** y **testosterona**, se analizan las muestras de plasma de los distintos grupos de animales, utilizando un método directo, sin extracción previa de la muestra.

El primer paso consiste en la preparación de las muestras para el análisis. Para ello, se procede a la planificación de la distribución de la placa, y la descongelación de las muestras correspondientes, colocándolas en orden en una gradilla, hasta su completa descongelación, tomándose de cada una de ellas, por medio de una pipeta monocal,

75 $\mu$ l de plasma, en tubos de cristal (10 x 70 mm), procediéndose a continuación a la desnaturalización o inactivación de la proteína mediante calor, ya que el esteroide no sufre ningún tipo de alteración a la temperatura a la cual se produce la desnaturalización proteica, (60°C durante 45 minutos) considerando este tiempo más que suficiente para llevar a cabo la desnaturalización de la proteína (Silván 1991).

El segundo paso consiste en la dilución de la muestra desnaturalizada con la solución de conjugado, previamente determinada la dilución de trabajo. Las muestras se analizan por duplicado; tomando 75  $\mu$ l de plasma, a tubos de ensayo de cristal (10 mm x 70 mm) que se disuelven en 75  $\mu$ l de conjugado. Después, se homogeniza cuidadosamente con ayuda de un agitador.

Se tapizan los pocillos de la placa con 50  $\mu$ l de esta dilución.

### **Validación de la técnica**

**Especificidad** : Se estudian las reacciones cruzadas de los anticuerpos con los distintos esteroides.

**Precisión y repetibilidad**: Se determina realizando el cálculo de los coeficientes de variación intra e inter-análisis, para lo cual se emplean concentraciones conocidas (altas, medias, bajas) de cada una de las hormonas y un número determinado de muestras problema:

- 5 pg/pocillo, 50 pg/pocillo y 500 pg/pocillo. Se realizan diez determinaciones por duplicado, de cada concentración dentro de una misma placa, repitiéndose el análisis diez días consecutivos.
- Se determinan por duplicado 20 muestras problema (10 de machos problema y 10 muestras de hembras problema), en la misma placa y el mismo análisis se repite diez días consecutivos.

**Exactitud:** Se determina calculando el porcentaje de recuperación, añadiendo concentraciones conocidas de cada una de las distintas hormonas a determinar.

**Sensibilidad:** Se determina de dos formas:

- Mediante el cálculo del límite de detección: valores medios de  $E_0$  menos 2 E.S.M., en ocho ensayos consecutivos (Abraham, 1975).
- Mediante el cálculo de la concentración de la hormona que causa el 50% de reducción del valor de la unión inicial ( $E_0$ ) (Van Weemen y Schuurs, 1975).

### **Determinación de las hormonas Tiroideas por técnicas enzimoimmunoanalíticas**

Para valorar la función tiroidea determinamos el contenido total, en plasma de tri-iodotironina ( $T_3$ ), tiroxina ( $T_4$ ), hormona estimulante de la tiroides (TSH), por medio de la técnica inmunoenzimática ELISA.

Con el fin de poder llevar a cabo estas determinaciones de una manera rápida, sencilla así como con un alto grado de fiabilidad y especificidad, se eligió el kitt comercial de Laboraratorios Boehringer Mannheim: Enzymun Test.

Para la determinación hormonal tri-iodotironina ( $T_3$ ), tiroxina ( $T_4$ ) se utilizó el sistema ELISA de competición y para la determinación de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) o tirotropina, ELISA Sandwich.

### **ELISA de competición para $T_3$ Y $T_4$**

**Material de laboratorio:**

- Puntas desechables, para pipetas Eppendorf, de 10-200  $\mu$ l y de 100-1.000



$\mu$ l (Comfortips, Eppendorf).

- Pipetas automáticas Eppendorf (Merck) de 10-100  $\mu$ l y de 100-1000  $\mu$ l.

### Reactivos

- Tubos de plástico recubiertos de los anticuerpos respectivos para la determinación hormonal de  $T_4$  y  $T_3$ ; anticuerpo anti-tiroxina (oveja). Capacidad de fijación aproximada 25 ng ó 32 pmol de tiroxina/tubo. Y recubiertos de polihapteno  $T_3$ .
- Tampón de incubación  
Barbiturato 120 mmol/l, pH= 8,7  
Acido 8-anilino-1-naftalinsulfónico (ANS) 1,27 mmol/l (0,04%)  
Tampón fosfato 18,2 mmol/l, pH= 8,6 en el caso de  $T_3$ .
- Conjugado tiroxina- POD. POD  $\geq$  1,0 U/ml.  
Conjugado anticuerpos anti- $T_3$  POD. POD  $\geq$  5 U/ml.
- Estándar. Tiroxina con matriz proteica, con concentraciones conocidas: 0,00; 3,90; 7,70; 14,10 y 26,40  $\mu$ g/dl.  
Estándar  $T_3$ , en suero humano, con diferentes concentraciones. 0,12; 0,86; 1,60; 3,15 y 6,60 ng/ml.
- Substrato/tampón. Fosfato/citrato 100 mmol/l, pH = 4,4  $H_2O_2$  (perborato sódico) 3,2 mmol/l.
- Cromógeno. 2,2 - azino - di- (3-etil-benzotiazolina ácido sulfónico-6)- sal diamónica.(ABTS) 1,9 mmol/l.

## **Equipo**

- Ordenador personal Epson AX2.
- Impresora Epson LQ-500.
- ES33 Photometer 4010.
- Software especialmente diseñado para el cálculo de las curvas patrón y concentraciones (Boehringer Mannheim).

## **Preparación y estabilidad de las soluciones**

### **Estabilidad:**

- \* 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada.
- \* Los estandar se pueden conservar hasta 3 meses a -20 °C siendo posible varias congelaciones, sin ser susceptible de alteraciones.

El tampón de incubación debe protegerse de la luz, y al igual que el resto de los reactivos deben mantenerse a temperatura ambiente 20-25 °C, al menos una hora antes del comienzo del test.

La solución substrato-cromógeno debe ser preparada (mezclar cromógeno y substrato/patrón hasta su completa disolución) por lo menos una hora antes del ensayo, así como protegerla de la luz.

### **Material de muestra**

Se utilizó plasma, al igual que para las demás determinaciones hormonales,

procediéndose a la descongelación de la alícuota correspondiente con el fin de realizar una sólo descongelación, por determinación.

### **Intervalo de medición**

T<sub>3</sub>: 0-6 ng/ml ó 0-9,22 nmol/l

T<sub>4</sub>: 0-25 µg/dl ó 0-322 nmol/l.

### **Factor de conversión**

T<sub>3</sub>: nmol/l x 0,651 = ng/ml; ng/ml x 1,536 = nmol/l.

T<sub>4</sub>: nmol/l x 0,078 = µg/dl; µg/dl x 12,87 = nmol/l.

### **Límite de detección**

El límite de detección inferior definido para T<sub>3</sub>, se ha indicado como E menos 2S del tercer estándar, y es aproximadamente 0,25 ng/ml ó 0,38 nmol/l.

El límite de detección inferior definido para T<sub>4</sub> es, aproximadamente, de 0,6 µg/dl ó 7,7 nmol/l.

### **Procedimiento de la realización del ensayo**

El primer paso consiste en la colocación de la cadena de tubos con un orden preestablecido previamente:

Posición primera, sin tubo; después, por duplicado, tubos no recubiertos de anticuerpo (se consideran como blancos), y luego tubos recubiertos de anticuerpo, a los

que se les añadirá estándares, suero control y muestras problema, con un volumen definido para cada análisis de 20  $\mu\text{l}$  en el caso de  $T_4$  y 200  $\mu\text{l}$  para la  $T_3$ .

Se añadirá luego, en todos los tubos, 1,0 ml de solución de conjugado, lo que se realizará de una manera automática, con un intervalo máximo de tiempo de 10 minutos, después del pipeteado manual de estandar/ suero control /problemas.

A continuación se procederá, a una incubación de 30 minutos con el posterior lavado y aspiración, de modo automático, mediante solución de lavado seguido de la adición de 1,0 ml de la solución sustrato cromógeno para continuar con una segunda incubación de igual duración de tiempo que la anterior.

Se realizó la lectura de las densidades ópticas a una longitud de onda de 405 nm.

#### **Determinación de tiroxina ( $T_4$ ).**

El método se basa en el principio de competición: se realiza una primera incubación con la tiroxina presente en la muestra y la tiroxina marcada con POD, que compite por una cantidad determinada de anticuerpo anti-tiroxina, ligado a la pared interior de los tubos. A continuación, se elimina el conjugado tiroxina- POD no ligado, junto con los componentes séricos, por medio de una fase de lavado. Se efectúa, seguidamente, una segunda incubación después de añadir el sustrato (ABTS: 2,2-azino - di-(3-benzotiazolona ácido sulfónico 6)- sal diamónica), formándose una solución coloreada cuya concentración corresponde a la actividad enzimática ligada a la pared de los tubos, midiéndose la intensidad de color en el espectrofotómetro a 405 nm.

Según el principio de la competición, la actividad enzimática de la tiroxina marcada será menor cuanto mayor sea la concentración de tiroxina sérica.

Las absorbancias halladas se evalúan mediante una curva patrón obtenida previamente.

### **Determinación de tri-iodotironina (T3).**

Se llevó a cabo por el mismo método anteriormente descrito, con anticuerpos anti-tri-iodotironina.

### **Determinación cuantitativa de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) mediante técnica ELISA sandwich**

El ELISA Sandwich o de "dos sitios", consiste en: un primer anticuerpo que se adhiere a una fase sólida (tubo de plástico), a él se une el antígeno (si lo hubiera en la muestra) y la unión se detecta mediante la adición del mismo anticuerpo específico marcado.

En una primera incubación, el antígeno TSH de la muestra, se liga a los anticuerpos anti-TSH, fijados a la pared de los tubos.

Debido a que la TSH tiene varios determinantes antigénicos, se realizó una segunda incubación añadiendo anticuerpos anti-TSH marcados con POD, de tal manera que se formasen complejos sandwich-TSH-POD.

La cantidad de estos complejos formados era proporcional al contenido de TSH en la muestra.

Para eliminar el conjugado POD no ligado, se efectuó una fase de lavado. Seguidamente, se añade el substrato-cromógeno (ABTS) determinando fotométricamente la actividad de POD, ligada a la pared de los tubos.

Como en los casos anteriores, los valores obtenidos se llevaron a la curva patrón elaborada con anterioridad.

## Reactivos

- Tubos de plástico recubiertos de estreptavidina. Capacidad de fijación aproximada 14 ng de biotina /tubo.
- Tampón de incubación  
Tampón fosfato 80 mmol/l, pH= 7,4 anticuerpos anti- TSH monoclonales con biotina: 1,5 mg/l.
- Conjugado anticuepos anti-TSH-POD.  
POD  $\geq$  5 U/ml.
- Estándar,  
TSH con matriz proteica con concentraciones 0,00; 0,29; 2,55; 14,50 y 41,50  $\mu$ U/ml.
- Sustrato/tampón  
Fosfato/citrato 100 mmol/l, pH 4,4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (perborato sódico) 3,2 mmol/l.
- Cromógeno  
2,2 - azino - di- (3-etil-benzotiazolina ácido sulfónico-6)- sal diamónica.  
ABTS 1,9 mmol/l.

## Preparación de las muestras

Se procede a la descongelación de las alícuotas de plasma de los distintos grupos de animales para la realización del análisis, ya que se utiliza un método directo sin extracción previa de la muestra.

Todos los reactivos que se utilizan, se mantuvieron a temperatura ambiente como paso previo a su posterior uso.

**Intervalo de medición:**

0-40  $\mu\text{U/ml}$ .

**Límite de detección:**

El límite de detección inferior, definido como  $E + 3S$  del primer standard (0,00  $\mu\text{U/ml}$ ), es aproximadamente 0,07  $\mu\text{U/ml}$ .

**Preparación del ensayo**

Después de la colocación de la cadena y tener todos los reactivos la temperatura idónea, se procede a dispensar manualmente de 100  $\mu\text{l}$  de estándar, suero control y muestras problema en los tubos correspondientes, siguiendo la misma secuencia que para las otras determinaciones (primero de la cadena ausente, segundo y tercera posición del tubo no recubierto blancos, colocaremos siempre los tubos por duplicado, con el fin de realizar el análisis con un intervalo de error menor).

Se añade luego, de forma automática, 1,0 ml de la solución 1a (solución de conjugado), procediéndose a una incubación durante 60 minutos a 25°C ó 70 minutos, si la temperatura del laboratorio es menor de 25°C. Una vez pasado el tiempo de incubación, los tubos se lavan con solución de lavado de forma automática.

Posteriormente, se añade 1 ml de la solución substrato-cromógeno. Incubándose durante 30 minutos para que se produzca la reacción de color.

Pasado el tiempo de incubación se procederá a la medida de las densidades ópticas a una longitud de onda de 405 nm.

Por medio del software indicado (Boehringer Mannheim), se calcularán, de una manera automática las curvas estándar y las concentraciones, utilizando el factor de corrección apropiado, al igual que se realizaba para las hormonas esteroideas.

## **Determinación de trenbolona mediante ELISA de competición**

Para determinar, cuantitativamente, el nivel de trenbolona en las muestras de plasma utilizamos un método inmunoenzimático, como es el ELISA.

La trenbolona (antígeno), si está presente en la muestra, compite con la trenbolona marcada con peroxidasa (conjugado), por un número de anticuerpos presente en la placa.

**Reactivos necesarios para la realización del ensayo:**

- Anti-trenbolone (Randox).
- Patrones (Randox).
- Conjugado (Randox).
- Control positivo, negativo producción propia.
- Soluciones tampón:

Carbonato-Bicarbonato: 0,05 M: pH= 9,6

Solución tampón ELISA: pH= 7,0

Solución tampón sustrato: pH= 4,8

Solución de lavado: solución madre (10x).



## **Desarrollo de la técnica**

Como paso previo, a la estandarización de la técnica, es necesario determinar las diluciones óptimas de trabajo frente a trenbolona y su respectivo conjugado. Se efectúan una serie de pruebas, consistentes en enfrentar diluciones variables, tanto de anticuerpo como de conjugado.

El anticuerpo utilizado fue anti-trenbolona (Randox), obtenido en conejo (el inmunógeno fue Trenbolone-Hemi-BTG) y el conjugado fue trenbolona-HRPO (Randox).

Las diluciones empleadas fueron las siguientes:

Partiendo del anticuerpo puro, se realiza una dilución madre 1/10 en carbonato-bicarbonato y una serie de diluciones, en agua bidestilada:

1/250; 1/500; 1/1.000; 1/2.000

Para una dilución de conjugado 1/2.000, suministrada por los laboratorios Randox, se realizan las siguientes diluciones, en ELISA tampón:

1/25.000; 1/50.000

Las diluciones se distribuyen en la placa de la siguiente manera:

### **Anticuerpos:**

Columnas 1-3: 1/250

Columnas 4-6: 1/500

Columnas 7-9: 1/1.000

Columnas 10-12: 1/2.000

### **Conjugados:**

Filas A-D: 1/50.000

Filas E-H: 1/25.000

Siguiendo el criterio de Munro y Stabenfeldt (1984), se seleccionaron aquellas diluciones que poseían una densidad óptica de 0,6-0,8, a 450nm.

**Trenbolona: anticuerpo: 1/1.000 Conjugado: 1/50.000**

### **Trazado de la curva estándar**

Se traza una curva patrón o estándar para trenbolona con concentraciones conocidas que cubren un rango entre 1 pg/pocillo y 1 ng/pocillo.

Las concentraciones estándar se obtienen a partir de una solución madre de 2 mg/ml de trenbolona. Se preparan las siguientes diluciones: 1-1.000 pg/50  $\mu$ l. Las diluciones se realizan en tubos de ensayo, de cristal, de 10 x 50 mm, con etanol absoluto, permitiendo que el alcohol se evapore para poder solubilizar el anabolizante.

Una vez que el etanol se evapora, las concentraciones estándar se disuelven en una solución de conjugado y con ellas se realiza un ELISA de competición para determinar los valores de densidad óptica a 450 nm.

Con las medidas de absorbancia de los estandares se traza la curva patrón para trenbolona. A esta curva se referiran las absorbancias obtenidas de las muestras problema, lo que permite calcular la concentración de trenbolona.

### **Adsorción de los anticuerpos a la fase sólida**

Las microplacas, de fondo plano las tapizamos con la dilución apropiada de anticuerpo. Los anticuerpos se diluyen en tampón carbonato-bicarbonato y, a

continuación, se dispensan 100  $\mu$ l de esta dilución en todos los pocillos de la placa, menos en el primero (A1), que se deja como blanco.

Las placas se tapan y sellan con parafilm, permaneciendo durante un espacio de tiempo de 16 horas a 37 °C.

Pasado el tiempo de incubación se efectúan tres lavados con 200  $\mu$ l, de la solución de lavado, por pocillo. Dichos lavados tienen la finalidad eliminar el exceso de anticuerpos que no han sido adsorbidos a la placa. Antes de realizar la siguiente etapa, las placas se deben secar perfectamente, dejándolas invertidas sobre papel de filtro.

Algunos autores someten a las muestras de plasma a procesos de extracción previa con dietileter, pero nosotros hemos comprobado que este paso no es necesario y simplificamos la técnica.

Se procede a descongelar las alícuotas programadas, con anterioridad, para la realización del test, así como todos los reactivos que vayan a ser utilizados con el fin que alcancen la temperatura ambiente (20-24 °C) a la hora de la analítica.

Se toman 75 $\mu$ l de plasma, por muestra y se procede a la desnaturalización proteica por medio del calor a 60 °C, durante treinta minutos.

### **Reacción de competición**

Tiene lugar entre la hormona libre (estándar o problema) y la conjugada al enzima. Tanto la muestra estándar como las problema se mezclan con la dilución de conjugado apropiada, el conjugado se diluye en solución tampón de ELISA a 1/50.000. Es recomendable realizar el test por duplicado, así como una cuidadosa homogenización con la ayuda de un agitador.

La distribución en la placa, fue igual que la utilizada para las hormonas esteroides representadas en el esquema I.

Se hicieron dos incubaciones, entre las cuales se realizó el lavado de la placa, con el fin de separar las fracciones de hormona libre y la unida al anticuerpo adsorbido a la fase sólida; así como la adición del sustrato, siguiendo igual protocolo que en el caso desarrollado con anterioridad, para las hormonas esteroides naturales.

La lectura de las placas se realizó a una densidad óptica de 450 nm.

## **Procesado de los resultados**

### **1. Procesado de los resultados obtenidos en el análisis hormonal:**

El procesado de los resultados, obtenidos del análisis hormonal de las muestras de plasma procedentes de los animales tratados, se realizó con la ayuda de un software diseñado especialmente para ello en el Departamento de Informática de la Universidad de Davis, California, USA, el cual fue cedido a nuestro departamento, y consiste en;

#### **a) Trazado de las curvas patrón**

Se hizo enfrentando, en el eje de ordenadas, la relación  $E/E_0 * 100$ , es decir, el porcentaje de unión de las muestras estándar con el anticuerpo y, en el eje de abscisas, las concentraciones estándar de cada hormona.

Estas curvas patrón se utilizan de referencia para el cálculo de las concentraciones hormonales de las muestras problema.

#### **b) Cálculo de las concentraciones hormonales de las muestras problema.**

El programa, tomando como referencia la curva patrón, calcula las concentraciones en las muestras problema. Se debe introducir un factor de corrección para expresar estas concentraciones en las unidades correctas, ya que las muestras sufren distintas diluciones.

Las concentraciones de trenbolona, en plasma, se expresan en ng/ml.

### **c) Validación de la técnica**

Se realizó mediante la determinación de los parámetros

Especificidad

Precisión y repetibilidad

Exactitud

Sensibilidad

De la misma manera que en el caso anterior de las hormonas esteroides (véase el esquema I)

#### **Límites de sensibilidad**

Suero y plasma = 0,25 ng/ml.

#### **Especificidad**

La especificidad de la técnica se realiza mediante la obtención de las reacciones cruzadas que presenta el anticuerpo utilizado frente a otras hormonas esteroides, y se calcula igual que la metódica realizada para las hormonas esteroides.

## **DETERMINACION DE TREN BOLONA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)**

Se ha desarrollado un método propio para determinar la concentración de trenbolona en plasma. El plasma obtenido, mediante centrifugación de las muestras de sangre, se purificó por un Cartucho C<sub>18</sub> (Waters, España). El eluato se extrajo con n-hexano, que se concentró y se inyectó en un sistema cromatográfico de HPLC.

## **Material**

### **Equipo cromatográfico**

- **Columna:**

Tipo: C<sub>18</sub> ODS-HYPERSIL (Shandon)

Longitud: 25 cm.

Diámetro interno: 4,6 mm.

Diámetro externo: 0.25 ins.

Diámetro de partícula: 5  $\mu$ .

- **Inyector:**

Válvula Rheodyne (Loop fijo 10  $\mu$ l)

Válvula de purga

Soporte para válvulas

- **Bomba:**

Gradiente ternario, con mezcla a baja presión de doble pistón. Virtualmente exenta de pulsaciones con repetitibilidad de composición superior al 99%. No necesita mezclador exterior. Margen de flujo 0,01 a 10 ml/min, P max 6000 psi (Spectra Physiccs)

- **Detector:**

Longitud de onda variable ultravioleta-visible (ISCO).

- **Integrador - registrador:**

DataJET (Spectra- Physics).

- **Bombona de Helio C-50** (Carburos metalicos)

## **Material de laboratorio:**

### - Equipo de filtración:

Recipiente de vidrio de 250 ml con base para embudo esmerilado 34/45, erlenmeyer de 1000 ml 34/45, tapón de vidrio, pinza, portafiltros SS y rejilla con 10 juntas de teflón.  
Bomba de vacío.

### - Equipo de desionización de agua (Labconco).

### - Filtros tipo HV de 0,45µm de poro (Millipore).

### - Pinzas.

### - Jeringa Hamilton Rheodyne, volumen 0.25 ml.

### - Evaporador de muestras orgánicas (Zymarc) .

### - Viales de cristal.

### - Cartuchos Sep-Pak C<sub>18</sub> de extracción en fase sólida, para muestras biológicas (Waters), con jeringa de 10 ml u otro dispositivo para cartuchos (Sep Pak Rack (Waters) o similar).

## **Reactivos**

### - Solventes para cromatografía de líquidos

Metanol, CH<sub>3</sub>OH, Pm = 32,04 (Panreac).

Acetonitrilo, CH<sub>3</sub>CN, Pm = 41,05 (Panreac).

Agua destilada para HPLC (Panreac).

- Acetato de Trenbolona (Roussel Uclaf)

### **Preparación del patrón**

#### **a) Solución patrón**

Solución patrón de Trenbolona: Pesar 10 mg de trenbolona, con una precisión 0,2 mg, disolver en 10 ml de la fase móvil.

#### **b) Solución patrón de trabajo**

Se toman 10  $\mu$ l de la solución anterior y se llevan hasta 10 ml de líquido de la fase móvil (agua/metanol/acetonitrilo: 20%/75%/5%), en un tubo de cristal de 10 mm x 100, se agita la mezcla para homogeneizarla. Luego se realizan distintas diluciones patrón (concentración conocida) hasta llegar a concentraciones que cubran un rango pg/ml y ng/ml.

### **Procesado de las muestras**

Después de la descongelación del plasma, se procede a la activación del cartucho C<sub>18</sub> Sep PaK, con 2ml de metanol y 2 ml de agua, respectivamente. Se eluye el cartucho con 4ml de metanol/agua 80%. El eluato se evapora a 45 °C, por medio de una corriente de nitrógeno, hasta que queden 0,4 ml. Se añaden 0,6 ml de agua y esta solución acuosa se extrae tres veces con 2ml n-hexano. El residuo se redissuelve en 200  $\mu$ l de líquido de la fase móvil.

### **Espectro de absorción**

El espectro de absorción realizado en el Departamento de Fisiología Vegetal U.C.M., nos reveló una absorbancia máxima de longitud de onda a 338 nm, de la trenbolona en nuestra fase móvil.



## **Cálculo del flujo**

Se calcula el flujo óptimo, de la fase móvil, con objeto de obtener la máxima eficacia. Determinándose este en 1ml/min.

## **Condiciones cromatográficas**

Fase móvil: agua/metanol/acetonitrilo: 20%/75%/5%

Flujo: 1ml/min

Detector (longitud de onda) para trenbolona: 338 nm

Velocidad de papel: 0,25 cm/min

Atenuación: 16

Tiempo (aproximado) de retención: 6,50-6,57 min

## **ANALISIS ESTADISTICO DE TODOS LOS RESULTADOS OBTENIDOS**

El análisis estadístico de los resultados se realizó por medio del software BMDP: "Biomedical Data Program", en el Centro de Cálculo de Somosaguas, U.C.M.

Se determinó el análisis de la varianza, para estudiar la distribución de las variables estadísticas y test de diferencias de medias, para comprobar si entre los grupos problema y control de nuestro estudio y las distintas variables poseen diferencias estadísticamente significativas.

Las variables estadísticas analizadas son:

- Número de animal.
- Hora o día de toma de la muestra.
- Concentraciones plasmáticas de: cortisol (C), 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>),

progesterona ( $P_4$ ), testosterona (T), trenbolona, tri-iodotironina ( $T_3$ ), tiroxina ( $T_4$ ), hormona estimulante de la tiroides (TSH).

- Grupo tratado y testigo.
- Sexo.
- Peso inicial
- Peso final.

# **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 ELISA de competición fueron:

- \* Anti-cortisol: 1/8.000.
- \* Anti-17 $\beta$ -estradiol: 1/2.000.
- \* Anti-progesterona: 1/4.000.
- \* Anti-testosterona: 1/8.000.
- \* Anti-trenbolona: 1/1.000.

La especificidad de los anticuerpos policlonales producidos frente a las cinco hormonas esteroides se pueden observar en los cuadros del I al V, donde está reflejado el porcentaje de reacciones cruzadas que presentan los cinco anticuerpos utilizados en el ELISA de competición.

Los anticuerpos para las hormonas tiroideas fueron:

Tri-iodotironina: **anticuerpo**, tubos de plásticos recubiertos de polihapteno T<sub>3</sub>.

Tiroxina: **anticuerpo**, tubos de plástico recubiertos de anticuerpos anti-tiroxina (oveja), con capacidad de fijación aproximada 25 ng o respuesta 32,2 pmol de tiroxina/tubo.

## ELISA variedad Sandwich:

Para la hormona estimulante de la tiroides la dilución óptima de anticuerpo fue: **anticuerpo**, tubos de plástico recubiertos de anticuerpos monoclonales anti-TSH, con capacidad de fijación aproximada 40 mU de TSH/tubo.

Las reacciones cruzadas de las hormonas tiroideas se encuentran representadas en los cuadros VI, VII y VIII.

### 2. Diluciones óptimas de conjugado:

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

- \* **Conjugado HRP-cortisol : 1/60.000.**
- \* **Conjugado HRP-17 $\beta$ -estradiol : 1/20.000.**
- \* **Conjugado HRP-progesterona : 1/40.000.**
- \* **Conjugado HRP-testosterona : 1/60.000.**
- \* **Conjugado HRP-trenbolona : 1/50.000.**

Para las hormonas tiroideas fueron los siguientes:

Tri-iodotironina: **Conjugado anticuerpos anti-T<sub>3</sub>-POD, POD $\leq$  5 U/ml.**

Tiroxina: **Conjugado, tiroxina-POD, POD $\leq$  1,5 U/ml.**

ELISA variedad Sandwich:

Para la hormona estimulante de la tiroides la dilución óptima de **Conjugado anticuerpos-anti-TSH-POD**  $\leq 5,0$  U/ml.

### 3. Trazado de las curvas patrón

El trazado de las curvas patrón para cada una de las hormonas esteroides se realizó mediante un software especialmente diseñado por el Departamento de Informática de la Universidad de Davis, U.S.A.

En la Gráfica I, se encuentran reflejados las curvas patrón de 17 $\beta$ -estradiol, siendo para las demás hormonas esteroides la realización de la curva de la misma forma.

El trazado de las curvas patrón para las hormonas tiroideas, se realizó mediante el software de los Laboratorios Boehringer Mannheim, estando representado en el Gráfica II la curva patrón de tri-iodotironina. Para las hormonas T<sub>4</sub> y TSH el trazado de la curva patrón se realizó siguiendo igual metodología.

### 4. Validación del ELISA de competición para las hormonas esteroides (cortisol, 17 $\beta$ -estradiol, progesterona, testosterona y trenbolona).

#### - Precisión y repetibilidad.

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

En nuestro caso el % CV fue siempre < 7% para todas las hormonas estudiadas.

- **Exactitud.**

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

- **Sensibilidad**

Se determinó de dos formas:

- **Límites de detección;**

cortisol; 3 pg/pocillo

17 $\beta$ -estradiol; 0,3 pg/pocillo

progesterona; 3 pg/pocillo

testosterona; 6,6 pg/pocillo

trenbolona; 12 ng/ml

- **Sensibilidad al 50 % de unión**

cortisol; 59,82 pg/pocillo

17 $\beta$ -estradiol; 0,83 pg/pocillo

progesterona; 59,82 pg/pocillo

testosterona; 83,17 pg/pocillo

trenbolona; 0,25 ng/ml

**5. Intervalo de medición y límite de detección de los test comerciales para las hormonas tiroideas.**

**- Límites de detección;**

Tri-iodotironina; 0,25 ng/ml

Tiroxina; 0,6  $\mu$ g/dl

TSH; 0,07  $\mu$ U/ml

**- Intervalo de medición;**

Tri-iodotironina; 0 - 6 ng/ml

Tiroxina; 0 - 24  $\mu$ g/dl

TSH; 0 - 40  $\mu$ U/ml

**6. Variaciones de los pesos**

Con los valores de los pesos recogidos tanto de machos como hembras, se realizó la media ( $\pm$  E.S.M.) de los mismos al inicio y final de la experiencia, los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 1.

Para una mejor apreciación de las variaciones de peso experimentados durante



los cincuenta días, se realizó una representación gráfica de los incrementos de los pesos, estando esta reflejada el Gráfico 1.

## **7. Concentraciones plasmáticas**

De los 30 animales analizados, se determinaron las concentraciones plasmáticas de las ocho hormonas objeto de estudio: cortisol, progesterona, testosterona, trenbolona, T3 en ng/ml, 17 $\beta$ -estradiol en pg/ml, TSH en uU/ml, T4 en ug/dl durante los cincuenta días que duró la experiencia. Cuyas concentraciones medias ( $\pm$  E.S.M.) aparecen reflejadas en las tablas de la 2 a la 15 de acuerdo con la siguiente distribución:

- Tabla 2: Concentraciones de trenbolona en machos y hembras.
- Tabla 3: Concentraciones de progesterona en hembras controles y tratados.
- Tabla 4: Concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol en machos controles y tratados.
- Tabla 5: Concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol en hembras controles y tratados.
- Tabla 6: Concentraciones de testosterona en machos controles y tratados.
- Tabla 7: Concentraciones de testosterona en hembras controles y tratados.

- Tabla 8:** Concentraciones de cortisol en machos controles y tratados.
- Tabla 9:** Concentraciones de cortisol en hembras controles y tratados.
- Tabla 10:** Concentraciones de tri-iodotironina en machos controles y tratados.
- Tabla 11:** Concentraciones de tri-iodotironina hembras controles y tratados.
- Tabla 12:** Concentraciones de tiroxina machos controles y tratados.
- Tabla 13:** Concentraciones de tiroxina en hembras controles y tratados.
- Tabla 14:** Concentraciones de hormona estimulante de la tiroides machos controles y tratados.
- Tabla 15:** Concentraciones de hormona estimulante de la tiroides hembras controles y tratados.

Para una mejor apreciación de los perfiles hormonales, durante los días que duro la experiencia, se realizó una representación gráfica con los datos obtenidos comparandolas con los controles Gráfico del 2 al 15.

Así mismo y por último, Tabla 16, se detallan para cada una de las hormonas estudiadas y tomas realizadas el nivel de significación estadística obtenido entre los grupos control y tratados.

**CUADRO I. REACCIONES CRUZADAS DEL ANTICUERPO ANTI-CORTISOL**

<b>ESTEROIDE</b>	<b>REACCION CRUZADA (%)</b>
Cortisol	100,00
11-deoxicortisol	210,00
Corticosterona	16,60
17 $\alpha$ -Hidroxiprogesterona	17,80
Cortisona	17,6
Pregnisona	8,05
Progesterona	1,00
Desoxicorticosterona	1,00
Testosterona	< 0,01
Dexametasona	< 0,01
Estrona	< 0,01
17 $\beta$ -estradiol	< 0,01
Estriol	< 0,01

**CUADRO II. REACCIONES CRUZADAS DEL ANTICUERPO  
ANTI-17 $\beta$ -ESTRADIOL**

<b>ESTEROIDE</b>	<b>REACCION CRUZADA (%)</b>
17 $\beta$ -estradiol	100,00
17 $\beta$ -estradiol-6CMO	130,00
16 Ceto-17 $\beta$ -estradiol	16,70
6 Ceto-17 $\beta$ -estradiol	20,00
2 Hidroxi-17 $\beta$ -estradiol	8,74
6 $\alpha$ Hidroxi-17 $\beta$ -estradiol	12,30
17 $\beta$ -estradiol-3 benzoato	3,28
17 $\alpha$ -estradiol	0,05
Estrona	0,50
Estriol	0,05
Progesterona	< 0,01
Testosterona	0,10
Cortisol	< 0,01

**CUADRO III. REACCIONES CRUZADAS DEL ANTICUERPO  
ANTI-PROGESTERONA**

<b>ESTEROIDE</b>	<b>REACCION CRUZADA (%)</b>
Progesterona	100,00
11 $\alpha$ -Hidroxi-progesterona-11HS	110,00
11 $\alpha$ -Hidroxi-progesterona	14,03
17 $\alpha$ -Hidroxi-progesterona	< 0,01
20 $\alpha$ -Hidroxi-progesterona	< 0,01
20 $\beta$ -Hidroxi-progesterona	< 0,01
Pregnendiona	21,73
17 $\beta$ -estradiol	< 0,01
Estrona	< 0,01
Estriol	< 0,01
Testosterona	0,46
Cortisol	< 0,01

**CUADRO IV. REACCIONES CRUZADAS DEL ANTICUERPO  
ANTI-TESTOSTERONA**

<b>ESTEROIDE</b>	<b>REACCION CRUZADA (%)</b>
Testosterona	100,00
Testosterona-3CMO	100,00
5 $\alpha$ -Dihidro-testosterona	20,00
5 $\beta$ -Dihidro-testosterona	5,00
Androstenodiona	11,50
Androstenodiol	3,50
Androstenolona	3,21
5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol	1,00
5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol	0,10
Epitestosterona	0,10
17 $\beta$ -estradiol	< 0,01
Estrona	< 0,01
Estriol	< 0,01
Progesterona	3,74
Cortisol	0,05

**CUADRO V. REACCIONES CRUZADAS DEL ANTICUERPO ANTI-TRENBOLONA**

ESTEROIDE	REACCION CRUZADA (%)
17 $\beta$ -trenbolona	100,00
17 $\alpha$ -trenbolona	42,00
19-nortestosterona	5,00
Testosterona	< 0,01
Progesterona	< 0,01
17 $\beta$ -estradiol	< 0,01
17 $\alpha$ -estradiol	< 0,01
Pregnenolona	< 0,01
Estrona	< 0,01
Cortisol	< 0,01
Hidroxiprogestrona	< 0,01
Corticosterona	< 0,01
Zeranol	< 0,01
Hexoestrol	< 0,01
Dietilestilbestrol	< 0,01
Dienoestrol	< 0,01
Androsterona	< 0,01
Estriol	< 0,01

**CUADRO VI. REACCIONES CRUZADAS DEL ANTICUERPO  
ANTI-TRI-IODOTIRONINA**

<b>ESTEROIDE</b>	<b>REACCION CRUZADA (%)</b>
L-tri-iodotironina	100,00
D-tri-iodotironina	101,00
L-tiroxina	0,06
D-tiroxina	0,12
Acido tri-iodotiroacético	62,9
Acido tetra-iodotiroacético	< 0,25
3-mono-iodo-L-tiroxina	< 0,06
3,5-di-iodo-L-tiroxina	< 0,06

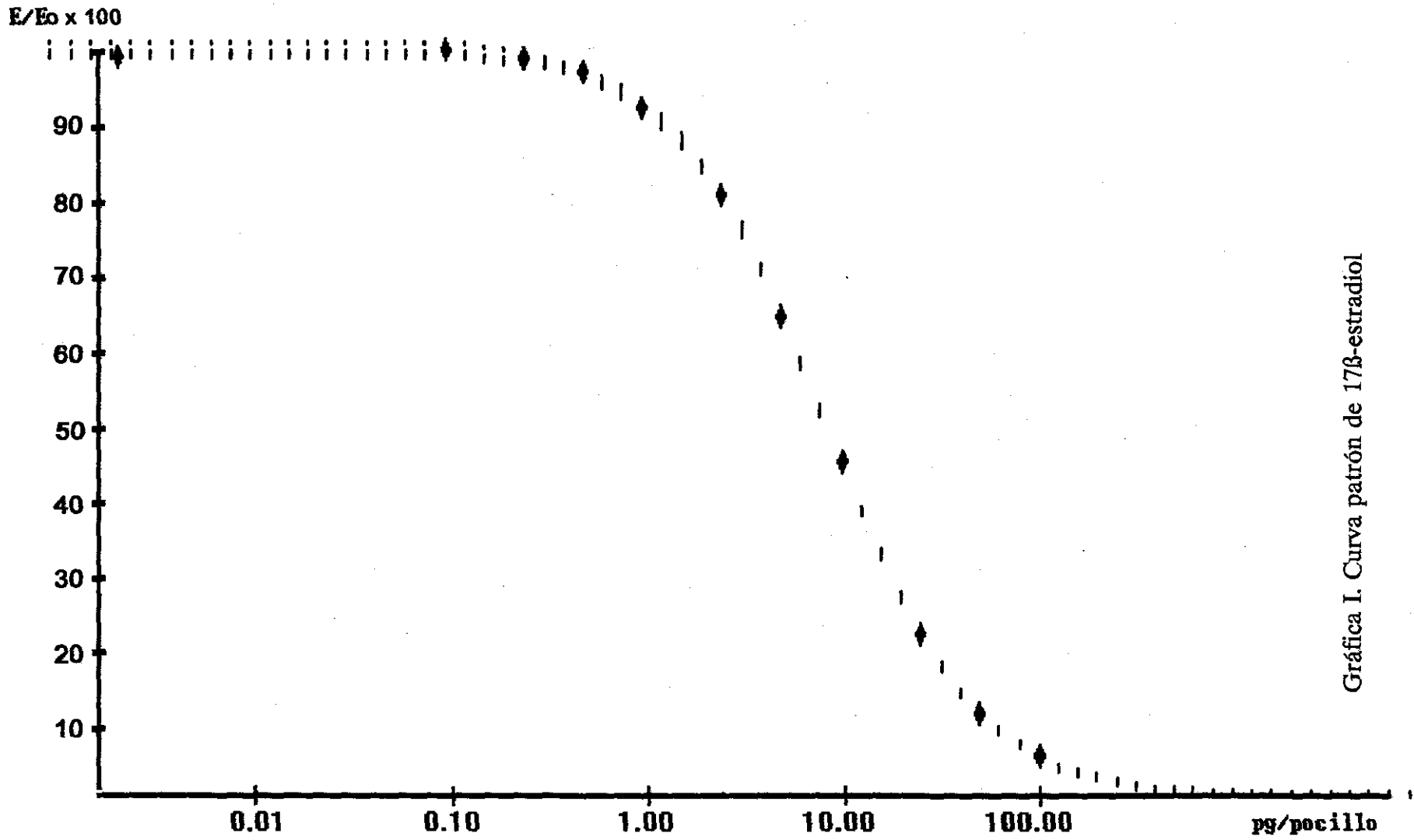


**CUADRO VII. REACCIONES CRUZADAS DEL ANTICUERPO ANTI-TIROXINA**

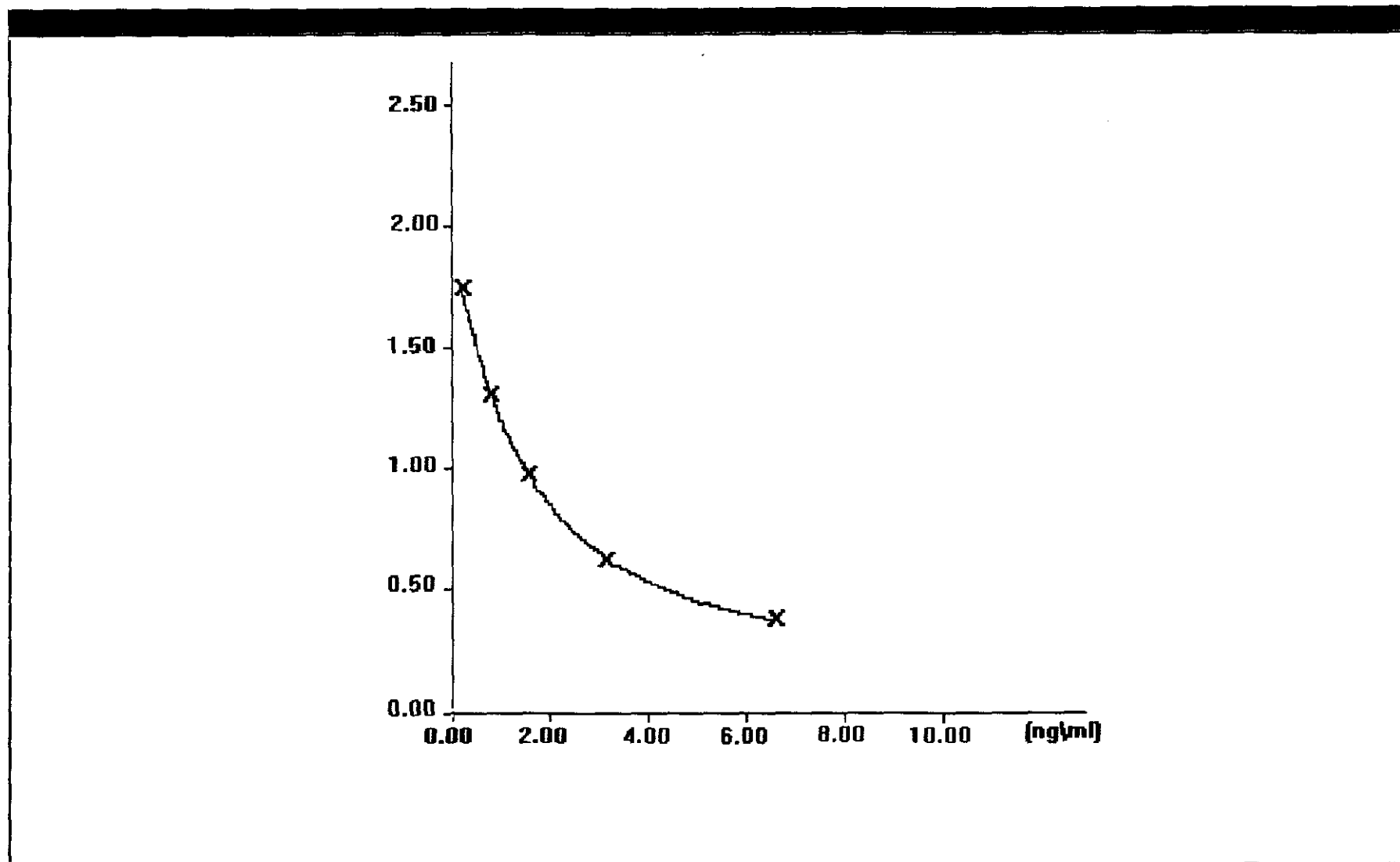
<b>ESTEROIDE</b>	<b>REACCION CRUZADA (%)</b>
L-tiroxina	100,00
D-tiroxina	100,00
L-tri-iodotironina	3,50
D-tri-iodotironina	2,90
Acido tetra-iodotiroacético	20,00
3,5-di-iodo-L-tiroxina	< 0,10
3-mono-iodo-L-tiroxina	< 0,10

**CUADRO VIII. REACCIONES CRUZADAS DEL ANTICUERPO  
ANTI-HORMONA ESTIMULANTE DE LA TIROIDES**

ESTEROIDE	REACCION CRUZADA (%)
TSH	100,00
β-TSH	100,00
HCG	< 0,01
LH	< 0,01
FSH	< 0,01
L-tiroxina	< 0,02
D-tiroxina	< 0,02
L-tri-iodotironina	< 0,02
D-tri-iodotironina	< 0,02
3-mono-iodo-L-tiroxina	< 0,02
3,5-di-iodo-L-tiroxina	< 0,02



Gráfica I. Curva patrón de  $17\beta$ -estradiol



Gráfica II. Curva patrón de tri-iodotironina

**Tabla 1. Pesos ( $\pm$  E.S.M.) de los animales (kg).**

	<b>Machos Controles</b>	<b>Machos Tratados</b>	<b>Hembras Controles</b>	<b>Hembras Tratados</b>
<b>Peso inicial</b>	<b>384,20 <math>\pm</math> 5,06</b>	<b>367,80 <math>\pm</math> 8,36</b>	<b>340,40 <math>\pm</math> 5,15</b>	<b>342,70 <math>\pm</math> 5,24</b>
<b>Peso final</b>	<b>462,36 <math>\pm</math> 7,24</b>	<b>473,79 <math>\pm</math> 12,14</b>	<b>410,58 <math>\pm</math> 8,29</b>	<b>447,49 <math>\pm</math> 9,66</b>

**Gráfico 1. Variaciones de los pesos (kg) en los machos y hembras, control y tratados.**

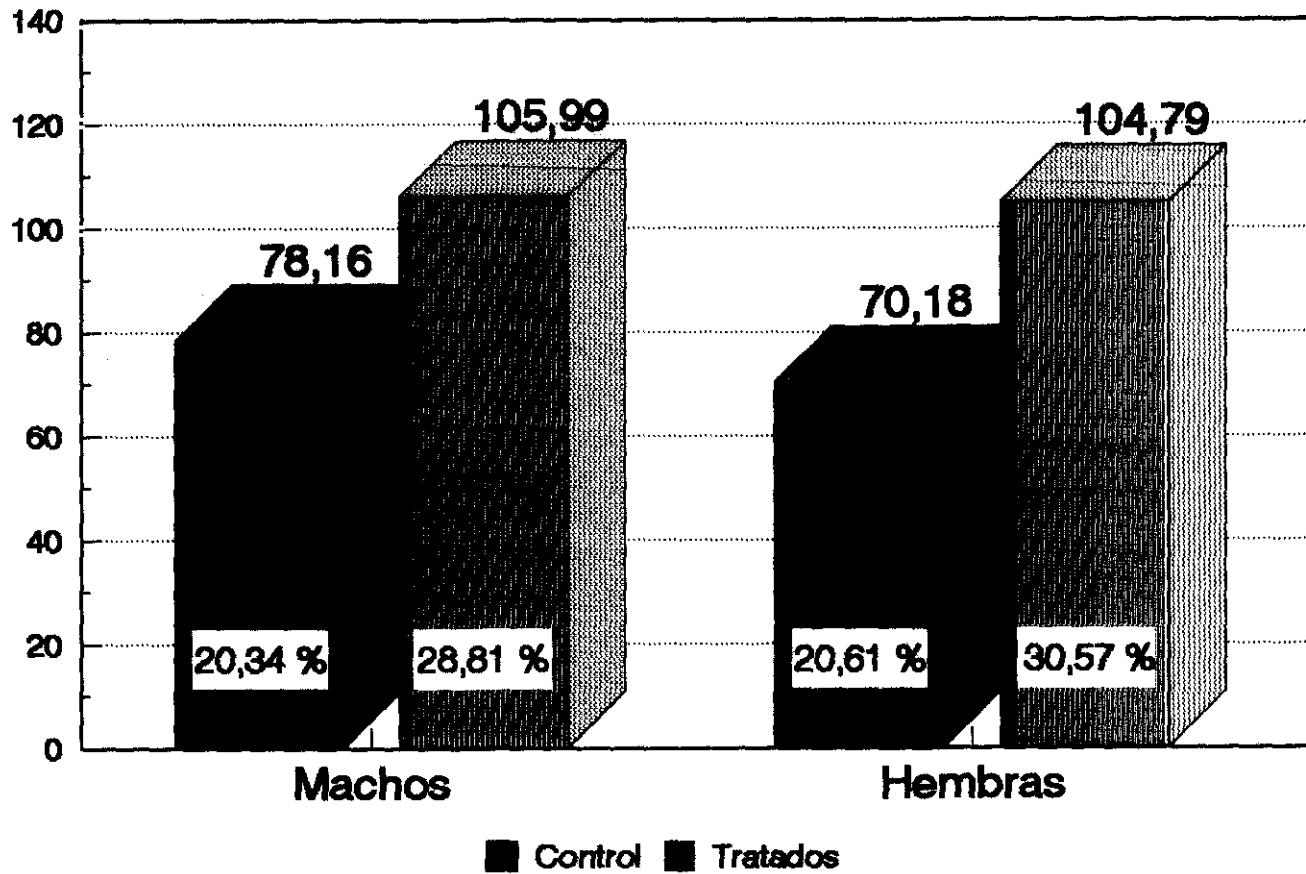


Tabla 2. Concentraciones de trenbolona (ng/ml).

	<b>Machos</b>	<b>Hembras</b>
0 horas	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2 horas	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
8 horas	0,71 ± 0,05	0,66 ± 0,09
1 día	0,85 ± 0,17	2,75 ± 0,58
2 días	2,05 ± 0,46	1,86 ± 0,27
3 días	0,95 ± 0,14	1,13 ± 0,15
4 días	1,08 ± 0,18	0,97 ± 0,17
5 días	2,97 ± 0,64	1,33 ± 0,15
6 días	0,70 ± 0,04	0,58 ± 0,10
7 días	0,33 ± 0,04	1,58 ± 0,15
8 días	0,37 ± 0,02	0,55 ± 0,02
9 días	0,70 ± 0,56	0,29 ± 0,05
10 días	0,39 ± 0,01	0,30 ± 0,05
12 días	0,07 ± 0,02	0,10 ± 0,03
14 días	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

**Tabla 3. Concentraciones de progesterona (ng/ml) en hembras.**

	<b>Controles</b>	<b>Tratados</b>
0 horas	5,65 ± 0,54	5,31 ± 0,46
2 horas	5,39 ± 0,32	5,48 ± 0,48
8 horas	5,84 ± 0,38	5,65 ± 0,39
1 día	5,93 ± 0,26	2,43 ± 0,23
2 días	6,13 ± 0,54	1,64 ± 0,14
3 días	5,78 ± 0,47	1,75 ± 0,18
4 días	5,12 ± 0,31	1,84 ± 0,09
5 días	4,13 ± 0,22	1,13 ± 0,15
6 días	3,58 ± 0,18	2,15 ± 0,16
7 días	2,22 ± 0,09	1,03 ± 0,32
8 días	1,05 ± 0,07	2,13 ± 0,27
9 días	0,98 ± 0,06	1,14 ± 0,07
10 días	1,22 ± 0,10	1,89 ± 0,08
12 días	1,65 ± 0,12	2,14 ± 0,12
14 días	3,15 ± 0,24	2,15 ± 0,16
16 días	4,84 ± 0,18	1,64 ± 0,32
18 días	5,96 ± 0,31	1,89 ± 0,12
20 días	5,84 ± 0,45	1,59 ± 0,08
24 días	5,65 ± 0,42	1,68 ± 0,04
28 días	2,18 ± 0,21	2,33 ± 0,11
32 días	1,35 ± 0,15	1,98 ± 0,07
36 días	4,84 ± 0,26	2,89 ± 0,16
40 días	4,28 ± 0,33	3,55 ± 0,31
45 días	5,97 ± 0,48	4,15 ± 0,49
50 días	1,13 ± 0,07	2,14 ± 0,36



Tabla 4. Concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol (pg/ml) en machos.

	Controles	Tratados
0 horas	2,13 $\pm$ 0,22	2,14 $\pm$ 0,61
2 horas	1,95 $\pm$ 0,07	3,60 $\pm$ 0,85
8 horas	2,30 $\pm$ 0,08	3,67 $\pm$ 0,71
1 día	2,01 $\pm$ 0,10	3,73 $\pm$ 0,96
2 días	2,49 $\pm$ 0,06	3,86 $\pm$ 0,58
3 días	2,55 $\pm$ 0,01	3,90 $\pm$ 0,63
4 días	2,38 $\pm$ 0,07	4,31 $\pm$ 0,77
5 días	2,47 $\pm$ 0,24	3,97 $\pm$ 0,59
6 días	2,05 $\pm$ 0,10	3,11 $\pm$ 0,30
7 días	2,14 $\pm$ 0,30	3,89 $\pm$ 0,76
8 días	2,37 $\pm$ 0,21	2,54 $\pm$ 0,11
9 días	2,66 $\pm$ 0,18	2,64 $\pm$ 0,08
10 días	3,19 $\pm$ 0,22	3,08 $\pm$ 0,27
12 días	3,44 $\pm$ 0,27	3,23 $\pm$ 0,39
14 días	2,78 $\pm$ 0,25	3,29 $\pm$ 0,16
16 días	3,06 $\pm$ 0,05	4,23 $\pm$ 0,48
18 días	3,68 $\pm$ 0,10	4,07 $\pm$ 0,30
20 días	4,18 $\pm$ 0,07	4,54 $\pm$ 0,20
24 días	5,01 $\pm$ 0,10	5,26 $\pm$ 0,33
28 días	2,23 $\pm$ 0,09	2,95 $\pm$ 0,18
32 días	2,51 $\pm$ 0,09	3,75 $\pm$ 0,37
36 días	3,01 $\pm$ 0,09	3,48 $\pm$ 0,15
40 días	3,44 $\pm$ 0,40	3,92 $\pm$ 0,13
45 días	3,18 $\pm$ 0,15	3,37 $\pm$ 0,22
50 días	2,75 $\pm$ 0,28	3,88 $\pm$ 0,12

Tabla 5. Concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol (pg/ml) en hembras.

	Controles	Tratados
0 horas	2,88 $\pm$ 0,43	3,27 $\pm$ 0,62
2 horas	2,64 $\pm$ 0,20	4,55 $\pm$ 0,89
8 horas	2,03 $\pm$ 0,29	4,49 $\pm$ 0,78
1 día	2,85 $\pm$ 0,25	4,65 $\pm$ 0,67
2 días	2,29 $\pm$ 0,33	4,74 $\pm$ 0,85
3 días	2,97 $\pm$ 0,17	4,83 $\pm$ 0,82
4 días	2,95 $\pm$ 0,15	4,81 $\pm$ 0,79
5 días	3,05 $\pm$ 0,10	4,79 $\pm$ 0,67
6 días	3,30 $\pm$ 0,01	4,45 $\pm$ 0,79
7 días	2,80 $\pm$ 0,15	4,76 $\pm$ 0,72
8 días	4,65 $\pm$ 0,44	4,86 $\pm$ 0,24
9 días	6,98 $\pm$ 0,36	5,24 $\pm$ 0,31
10 días	3,88 $\pm$ 0,14	4,89 $\pm$ 0,43
12 días	3,25 $\pm$ 0,12	3,80 $\pm$ 0,20
14 días	1,76 $\pm$ 0,18	3,20 $\pm$ 0,45
16 días	1,52 $\pm$ 0,04	2,85 $\pm$ 0,21
18 días	1,55 $\pm$ 0,10	2,60 $\pm$ 0,22
20 días	1,59 $\pm$ 0,08	2,85 $\pm$ 0,10
24 días	1,64 $\pm$ 0,09	3,36 $\pm$ 0,26
28 días	1,85 $\pm$ 0,23	3,29 $\pm$ 0,22
32 días	2,24 $\pm$ 0,03	3,24 $\pm$ 0,31
36 días	2,25 $\pm$ 0,11	4,40 $\pm$ 0,44
40 días	3,95 $\pm$ 0,34	6,97 $\pm$ 0,33
45 días	2,45 $\pm$ 0,37	7,94 $\pm$ 0,31
50 días	3,89 $\pm$ 0,21	8,52 $\pm$ 0,38

Tabla 6. Concentraciones de testosterona (ng/ml) en machos.

	Controles	Tratados
0 horas	3,68 ± 0,66	3,63 ± 0,58
2 horas	2,81 ± 0,06	4,59 ± 0,05
8 horas	4,44 ± 0,95	6,50 ± 1,06
1 día	4,29 ± 0,88	8,78 ± 0,54
2 días	6,76 ± 1,08	10,65 ± 2,13
3 días	6,03 ± 0,72	12,52 ± 1,45
4 días	4,94 ± 0,62	11,80 ± 0,56
5 días	7,80 ± 0,62	11,55 ± 1,12
6 días	5,77 ± 0,57	11,15 ± 0,56
7 días	5,46 ± 0,68	10,43 ± 2,19
8 días	6,76 ± 0,68	9,89 ± 0,75
9 días	4,87 ± 0,43	10,44 ± 1,04
10 días	4,88 ± 0,90	5,25 ± 0,90
12 días	5,00 ± 0,06	6,06 ± 0,75
14 días	7,42 ± 1,61	7,51 ± 0,71
16 días	8,99 ± 0,65	8,68 ± 1,26
18 días	8,08 ± 0,54	6,68 ± 1,14
20 días	4,09 ± 0,44	6,72 ± 0,81
24 días	4,45 ± 0,05	4,64 ± 0,53
28 días	5,24 ± 0,40	5,68 ± 0,57
32 días	6,03 ± 0,23	5,05 ± 0,49
36 días	6,29 ± 0,46	5,98 ± 0,29
40 días	6,89 ± 0,03	7,97 ± 1,09
45 días	7,63 ± 1,18	8,00 ± 0,41
50 días	5,64 ± 0,90	6,82 ± 1,13

Tabla 7. Concentraciones de testosterona (ng/ml) en hembras.

	Controles	Tratados
0 horas	2,92 ± 0,38	3,12 ± 0,38
2 horas	3,48 ± 0,51	3,63 ± 0,45
8 horas	2,02 ± 0,40	4,17 ± 0,70
1 día	2,26 ± 0,37	2,73 ± 0,32
2 días	3,02 ± 0,69	3,78 ± 0,45
3 días	3,25 ± 0,21	3,42 ± 0,53
4 días	3,12 ± 0,26	3,30 ± 0,48
5 días	2,38 ± 0,41	3,09 ± 0,49
6 días	2,58 ± 0,19	3,12 ± 0,48
7 días	3,05 ± 0,40	3,48 ± 0,54
8 días	2,92 ± 0,08	4,04 ± 0,40
9 días	3,07 ± 0,23	3,84 ± 0,37
10 días	4,13 ± 0,17	3,64 ± 0,38
12 días	3,17 ± 0,32	3,48 ± 0,39
14 días	4,21 ± 0,58	4,39 ± 0,42
16 días	5,06 ± 0,76	7,91 ± 0,96
18 días	5,26 ± 0,63	7,03 ± 0,71
20 días	4,71 ± 0,39	6,52 ± 0,77
24 días	4,10 ± 0,15	5,82 ± 0,78
28 días	3,63 ± 0,17	3,91 ± 0,40
32 días	2,76 ± 0,16	3,81 ± 0,21
36 días	3,34 ± 0,23	4,40 ± 0,41
40 días	3,62 ± 0,39	3,66 ± 0,29
45 días	3,15 ± 0,08	4,46 ± 0,44
50 días	2,78 ± 0,16	3,52 ± 0,33

Tabla 8. Concentraciones de cortisol (ng/ml) en machos.

	Controles	Tratados
0 horas	3,73 ± 0,42	3,59 ± 0,36
2 horas	3,34 ± 0,76	3,12 ± 0,54
8 horas	3,28 ± 0,46	3,60 ± 0,52
1 día	3,47 ± 0,03	8,37 ± 2,19
2 días	3,13 ± 0,46	12,43 ± 4,52
3 días	3,44 ± 0,53	9,73 ± 3,21
4 días	4,03 ± 1,10	8,52 ± 1,24
5 días	1,74 ± 0,37	8,38 ± 2,36
6 días	1,18 ± 0,12	7,67 ± 2,47
7 días	2,30 ± 0,62	9,88 ± 3,12
8 días	4,07 ± 0,24	5,25 ± 0,78
9 días	4,23 ± 0,57	5,91 ± 0,13
10 días	3,20 ± 0,21	3,15 ± 0,43
12 días	1,74 ± 0,04	1,48 ± 0,19
14 días	2,41 ± 0,24	2,52 ± 0,27
16 días	1,27 ± 0,11	1,72 ± 0,08
18 días	1,51 ± 0,23	1,03 ± 0,24
20 días	1,56 ± 0,12	1,23 ± 0,02
24 días	1,18 ± 0,17	1,58 ± 0,07
28 días	1,53 ± 0,18	2,55 ± 0,14
32 días	2,23 ± 0,18	3,45 ± 0,52
36 días	2,87 ± 0,54	2,27 ± 0,14
40 días	4,85 ± 0,02	4,19 ± 0,20
45 días	5,24 ± 0,78	3,99 ± 0,56
50 días	4,02 ± 0,71	4,87 ± 0,28

Tabla 9. Concentraciones de cortisol (ng/ml) en hembras.

	Controles	Tratados
0 horas	5,03 ± 0,34	6,68 ± 2,74
2 horas	7,14 ± 0,22	10,12 ± 5,40
8 horas	3,49 ± 0,35	12,01 ± 2,10
1 día	4,77 ± 0,45	10,12 ± 1,87
2 días	4,59 ± 0,87	11,31 ± 5,10
3 días	3,29 ± 0,38	12,52 ± 6,54
4 días	2,96 ± 0,44	10,34 ± 3,63
5 días	1,97 ± 0,16	9,77 ± 1,28
6 días	2,60 ± 0,43	8,68 ± 1,76
7 días	2,87 ± 0,48	9,93 ± 1,61
8 días	6,71 ± 0,08	12,00 ± 2,58
9 días	5,94 ± 0,55	8,41 ± 1,72
10 días	5,57 ± 0,49	3,84 ± 0,43
12 días	1,43 ± 0,38	2,14 ± 0,30
14 días	0,97 ± 0,17	2,45 ± 0,72
16 días	4,06 ± 0,08	4,38 ± 0,50
18 días	4,18 ± 0,74	3,54 ± 0,18
20 días	3,10 ± 0,80	3,26 ± 0,27
24 días	1,77 ± 0,11	1,51 ± 0,09
28 días	3,31 ± 1,70	1,21 ± 0,15
32 días	1,69 ± 0,29	2,20 ± 0,40
36 días	2,12 ± 0,18	2,27 ± 0,45
40 días	7,42 ± 0,41	9,92 ± 1,59
45 días	7,34 ± 0,86	10,89 ± 1,76
50 días	5,11 ± 0,87	8,53 ± 0,83

Tabla 10. Concentraciones de tri-iodotironina (T3) (ng/ml) en machos.

	Controles	Tratados
0 horas	2,01 ± 0,15	2,14 ± 0,61
2 horas	2,21 ± 0,13	3,70 ± 0,85
8 horas	2,27 ± 0,08	3,67 ± 0,71
1 día	2,21 ± 0,17	3,73 ± 0,96
2 días	2,24 ± 0,13	3,96 ± 0,58
3 días	2,42 ± 0,11	4,00 ± 0,63
4 días	2,41 ± 0,11	4,31 ± 0,77
5 días	2,56 ± 0,06	3,97 ± 0,59
6 días	2,56 ± 0,13	3,89 ± 0,30
7 días	2,72 ± 0,12	3,11 ± 0,76
8 días	1,79 ± 0,14	2,64 ± 0,11
9 días	2,08 ± 0,13	2,54 ± 0,08
10 días	3,13 ± 0,22	3,08 ± 0,27
12 días	2,35 ± 0,09	3,23 ± 0,39
14 días	2,62 ± 0,13	3,29 ± 0,16
16 días	3,28 ± 0,14	4,07 ± 0,48
18 días	3,10 ± 0,05	4,23 ± 0,30
20 días	2,96 ± 0,16	4,54 ± 0,20
24 días	3,38 ± 0,09	5,26 ± 0,33
28 días	2,72 ± 0,20	3,95 ± 0,18
32 días	1,79 ± 0,11	3,75 ± 0,37
36 días	1,95 ± 0,21	3,48 ± 0,15
40 días	1,82 ± 0,08	3,22 ± 0,13
45 días	2,22 ± 0,16	3,37 ± 0,22
50 días	2,23 ± 0,14	3,88 ± 0,12

**Tabla 11. Concentraciones de tri-iodotironina (T3) (ng/ml) en hembras.**

	<b>Controles</b>	<b>Tratados</b>
0 horas	2,01 ± 0,09	2,12 ± 0,16
2 horas	2,07 ± 0,10	2,37 ± 0,18
8 horas	2,06 ± 0,11	2,34 ± 0,10
1 día	1,88 ± 0,11	2,17 ± 0,25
2 días	1,65 ± 0,05	2,10 ± 0,19
3 días	1,79 ± 0,08	2,33 ± 0,16
4 días	2,22 ± 0,11	2,33 ± 0,22
5 días	2,14 ± 0,11	2,38 ± 0,23
6 días	2,12 ± 0,02	2,21 ± 0,17
7 días	1,98 ± 0,26	2,35 ± 0,15
8 días	1,66 ± 0,07	1,86 ± 0,08
9 días	1,78 ± 0,14	1,89 ± 0,08
10 días	2,07 ± 0,06	1,85 ± 0,09
12 días	1,97 ± 0,04	2,36 ± 0,13
14 días	1,94 ± 0,11	1,79 ± 0,07
16 días	2,43 ± 0,10	2,30 ± 0,14
18 días	2,52 ± 0,13	2,62 ± 0,18
20 días	2,55 ± 0,10	2,97 ± 0,11
24 días	3,23 ± 0,21	3,17 ± 0,18
28 días	1,85 ± 0,07	1,73 ± 0,12
32 días	1,58 ± 0,16	1,86 ± 0,15
36 días	2,01 ± 0,01	2,18 ± 0,11
40 días	1,86 ± 0,16	1,93 ± 0,08
45 días	2,04 ± 0,06	1,78 ± 0,09
50 días	1,76 ± 0,18	1,80 ± 0,09



**Tabla 12. Concentraciones de tiroxina (T4)  
( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) en machos.**

	Controles	Tratados
0 horas	16,97 $\pm$ 0,70	16,99 $\pm$ 1,35
2 horas	17,27 $\pm$ 0,84	14,07 $\pm$ 1,80
8 horas	20,33 $\pm$ 0,57	14,69 $\pm$ 1,44
1 día	19,81 $\pm$ 0,75	13,53 $\pm$ 1,41
2 días	18,97 $\pm$ 1,60	13,67 $\pm$ 1,05
3 días	18,00 $\pm$ 1,59	14,65 $\pm$ 1,64
4 días	17,84 $\pm$ 1,90	14,02 $\pm$ 1,38
5 días	14,34 $\pm$ 1,69	11,25 $\pm$ 0,34
6 días	14,75 $\pm$ 0,90	10,62 $\pm$ 0,70
7 días	12,08 $\pm$ 0,90	10,49 $\pm$ 0,74
8 días	15,86 $\pm$ 1,79	13,21 $\pm$ 0,42
9 días	16,62 $\pm$ 1,23	16,66 $\pm$ 0,50
10 días	12,82 $\pm$ 0,01	15,85 $\pm$ 1,03
12 días	13,41 $\pm$ 1,14	12,14 $\pm$ 0,37
14 días	15,16 $\pm$ 0,84	13,19 $\pm$ 0,48
16 días	13,15 $\pm$ 1,29	12,97 $\pm$ 0,67
18 días	13,84 $\pm$ 1,41	12,67 $\pm$ 0,28
20 días	14,51 $\pm$ 1,37	14,38 $\pm$ 0,41
24 días	15,16 $\pm$ 1,29	15,00 $\pm$ 0,28
28 días	14,85 $\pm$ 0,74	13,50 $\pm$ 1,08
32 días	12,79 $\pm$ 1,17	14,14 $\pm$ 0,75
36 días	14,19 $\pm$ 1,09	15,48 $\pm$ 1,28
40 días	12,54 $\pm$ 1,93	11,06 $\pm$ 0,31
45 días	14,12 $\pm$ 0,47	11,48 $\pm$ 0,58
50 días	12,47 $\pm$ 1,01	11,00 $\pm$ 0,35

**Tabla 13. Concentraciones de tiroxina (T4)  
( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) en hembras.**

	<b>Controles</b>	<b>Tratados</b>
0 horas	9,27 $\pm$ 0,44	9,09 $\pm$ 0,61
2 horas	8,48 $\pm$ 0,73	8,38 $\pm$ 0,67
8 horas	7,45 $\pm$ 0,93	8,08 $\pm$ 0,31
1 día	9,54 $\pm$ 0,88	8,59 $\pm$ 0,53
2 días	5,94 $\pm$ 0,20	5,99 $\pm$ 0,78
3 días	9,42 $\pm$ 0,78	7,60 $\pm$ 0,46
4 días	8,18 $\pm$ 0,81	7,65 $\pm$ 0,55
5 días	11,51 $\pm$ 0,46	9,59 $\pm$ 0,68
6 días	9,44 $\pm$ 0,86	7,43 $\pm$ 0,33
7 días	8,64 $\pm$ 0,41	8,95 $\pm$ 0,42
8 días	8,11 $\pm$ 0,48	8,42 $\pm$ 0,28
9 días	7,30 $\pm$ 0,69	7,11 $\pm$ 0,38
10 días	5,75 $\pm$ 0,05	5,19 $\pm$ 0,57
12 días	6,87 $\pm$ 0,70	7,22 $\pm$ 0,23
14 días	14,06 $\pm$ 0,54	13,94 $\pm$ 0,86
16 días	14,43 $\pm$ 0,77	12,08 $\pm$ 0,75
18 días	9,57 $\pm$ 0,68	10,03 $\pm$ 0,77
20 días	10,66 $\pm$ 0,61	11,53 $\pm$ 0,78
24 días	12,63 $\pm$ 0,56	11,41 $\pm$ 0,23
28 días	12,87 $\pm$ 0,23	12,90 $\pm$ 0,80
32 días	11,44 $\pm$ 0,67	12,57 $\pm$ 0,31
36 días	10,87 $\pm$ 0,38	11,77 $\pm$ 0,16
40 días	8,61 $\pm$ 1,31	7,68 $\pm$ 0,16
45 días	7,55 $\pm$ 0,57	8,06 $\pm$ 0,37
50 días	6,82 $\pm$ 0,81	8,35 $\pm$ 0,43

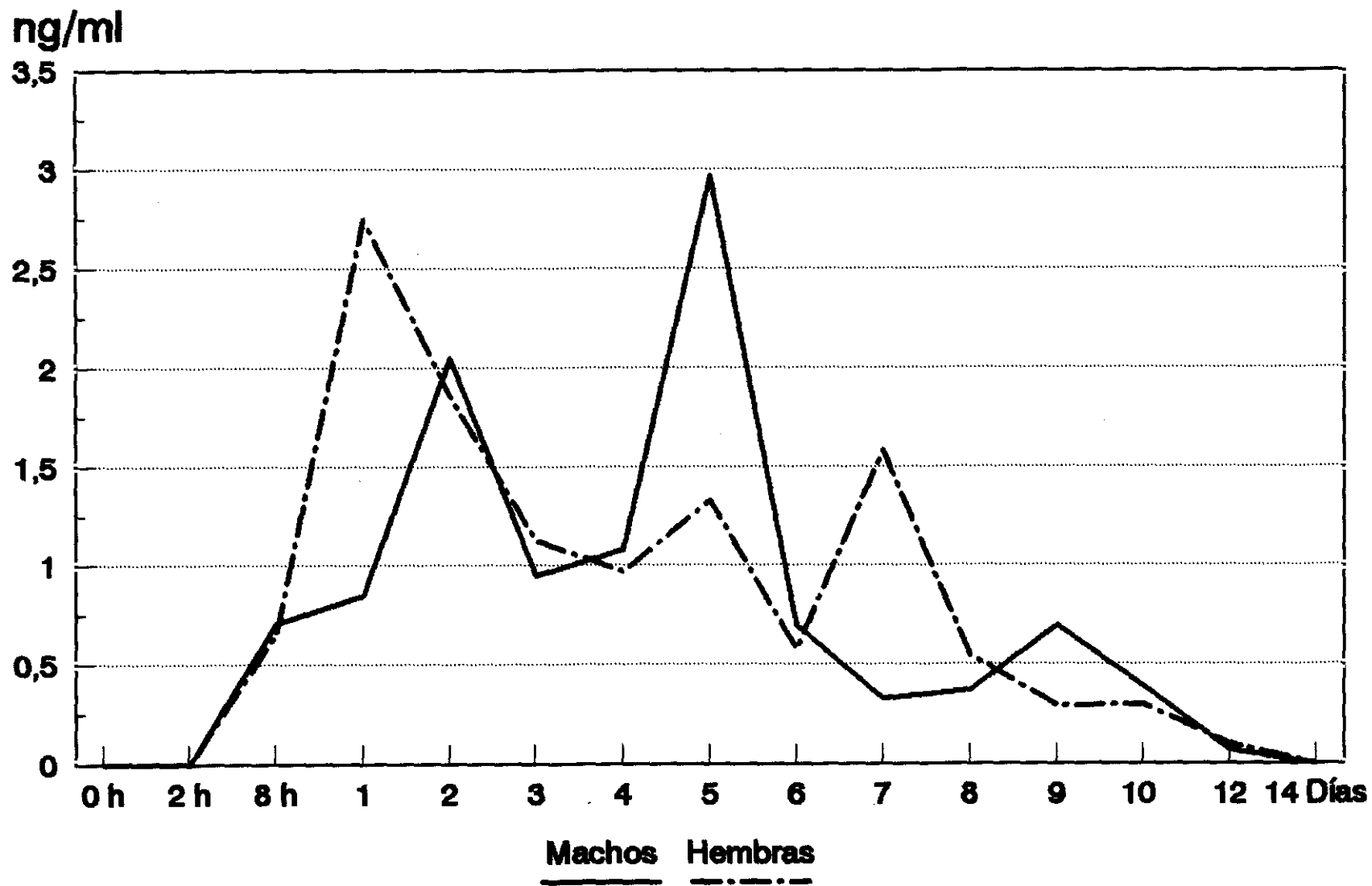
Tabla 14. Concentraciones de hormona estimulante de la tiroides (TSH) ( $\mu\text{U/ml}$ ) en machos.

	Controles	Tratados
0 horas	1,41 $\pm$ 0,01	1,54 $\pm$ 0,19
2 horas	1,49 $\pm$ 0,05	1,61 $\pm$ 0,21
8 horas	1,35 $\pm$ 0,01	1,78 $\pm$ 0,23
1 día	1,36 $\pm$ 0,02	1,81 $\pm$ 0,12
2 días	1,36 $\pm$ 0,01	1,98 $\pm$ 0,23
3 días	1,28 $\pm$ 0,03	1,86 $\pm$ 0,25
4 días	1,33 $\pm$ 0,01	1,78 $\pm$ 0,23
5 días	1,03 $\pm$ 0,01	2,16 $\pm$ 0,50
6 días	1,14 $\pm$ 0,35	2,05 $\pm$ 0,54
7 días	0,88 $\pm$ 0,21	1,62 $\pm$ 0,39
8 días	1,33 $\pm$ 0,01	1,71 $\pm$ 0,11
9 días	1,54 $\pm$ 0,14	1,72 $\pm$ 0,06
10 días	1,37 $\pm$ 0,01	1,77 $\pm$ 0,16
12 días	1,05 $\pm$ 0,01	1,80 $\pm$ 0,46
14 días	0,81 $\pm$ 0,40	1,72 $\pm$ 0,22
16 días	0,06 $\pm$ 0,01	1,42 $\pm$ 0,34
18 días	0,07 $\pm$ 0,01	1,61 $\pm$ 0,44
20 días	0,05 $\pm$ 0,01	1,82 $\pm$ 0,46
24 días	0,04 $\pm$ 0,01	1,89 $\pm$ 0,83
28 días	0,22 $\pm$ 0,02	1,38 $\pm$ 0,47
32 días	0,23 $\pm$ 0,01	1,57 $\pm$ 0,54
36 días	0,25 $\pm$ 0,02	1,48 $\pm$ 0,43
40 días	1,34 $\pm$ 0,01	1,89 $\pm$ 0,19
45 días	1,37 $\pm$ 0,02	1,91 $\pm$ 0,18
50 días	1,45 $\pm$ 0,04	1,62 $\pm$ 0,05

Tabla 15. Concentraciones de hormona estimulante de la tiroides (TSH) ( $\mu\text{U/ml}$ ) en hembras.

	Controles	Tratados
0 horas	1,44 $\pm$ 0,02	1,42 $\pm$ 0,06
2 horas	1,41 $\pm$ 0,04	1,27 $\pm$ 0,03
8 horas	1,43 $\pm$ 0,07	1,12 $\pm$ 0,07
1 día	1,38 $\pm$ 0,05	1,02 $\pm$ 0,07
2 días	1,38 $\pm$ 0,03	1,05 $\pm$ 0,05
3 días	1,36 $\pm$ 0,04	1,00 $\pm$ 0,06
4 días	1,37 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,06
5 días	1,41 $\pm$ 0,10	0,80 $\pm$ 0,14
6 días	1,39 $\pm$ 0,03	0,92 $\pm$ 0,06
7 días	1,38 $\pm$ 0,03	0,99 $\pm$ 0,08
8 días	1,49 $\pm$ 0,06	1,06 $\pm$ 0,01
9 días	1,42 $\pm$ 0,01	1,05 $\pm$ 0,01
10 días	1,55 $\pm$ 0,03	1,12 $\pm$ 0,10
12 días	1,56 $\pm$ 0,05	1,21 $\pm$ 0,01
14 días	0,51 $\pm$ 0,07	0,23 $\pm$ 0,02
16 días	0,58 $\pm$ 0,17	0,08 $\pm$ 0,02
18 días	0,34 $\pm$ 0,08	0,10 $\pm$ 0,12
20 días	0,41 $\pm$ 0,11	0,12 $\pm$ 0,01
24 días	0,35 $\pm$ 0,09	0,14 $\pm$ 0,05
28 días	0,57 $\pm$ 0,10	0,15 $\pm$ 0,01
32 días	0,69 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,04
36 días	0,62 $\pm$ 0,12	0,43 $\pm$ 0,04
40 días	1,56 $\pm$ 0,03	1,02 $\pm$ 0,11
45 días	1,52 $\pm$ 0,03	1,10 $\pm$ 0,02
50 días	1,63 $\pm$ 0,06	1,21 $\pm$ 0,03

**Gráfico 2. Concentraciones de trenbolona (ng/ml)**



**Gráfico 3. Concentraciones de progesterona  
(ng/ml) en hembras.**

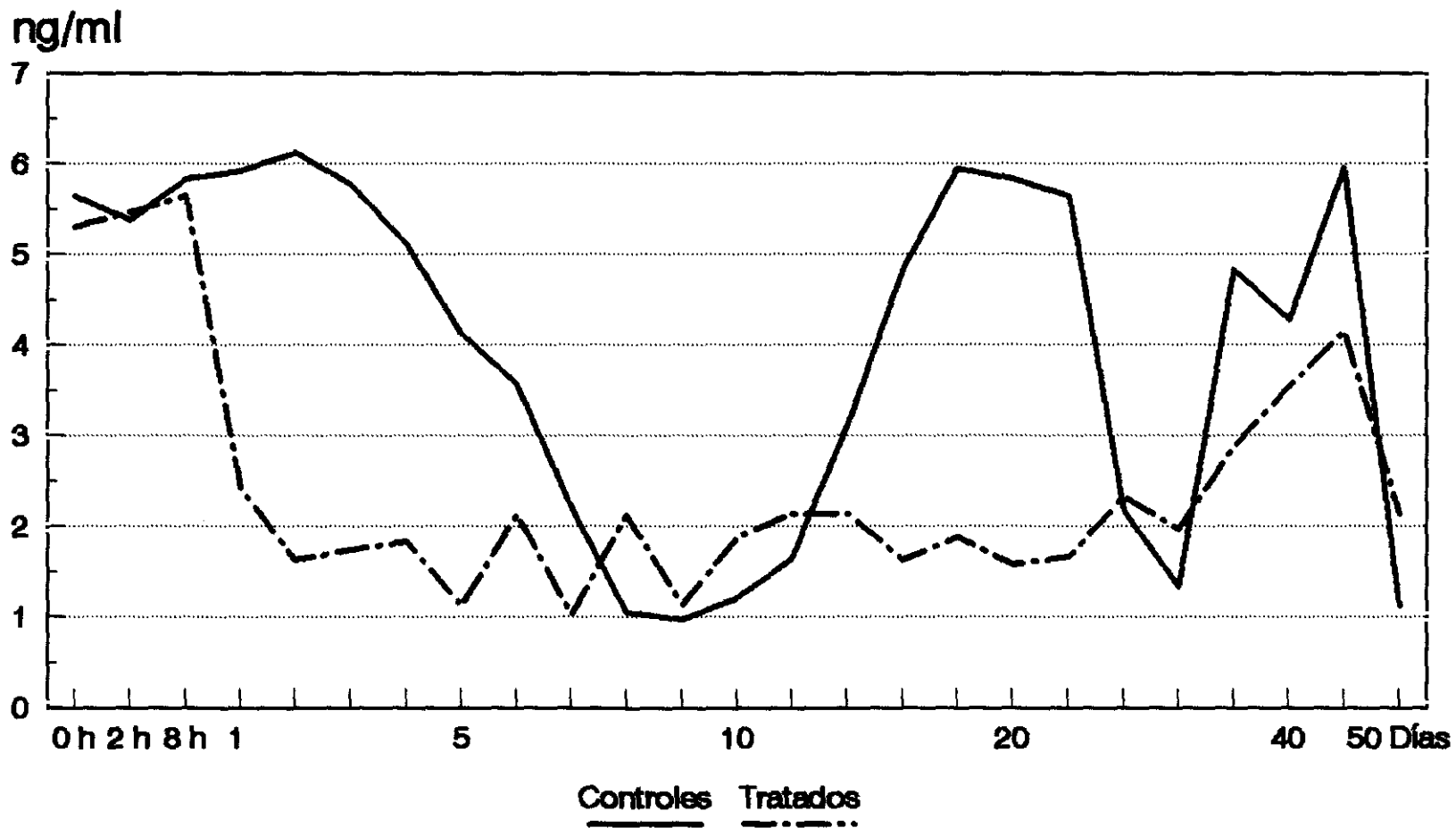


Gráfico 4. Concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol (pg/ml) en machos.

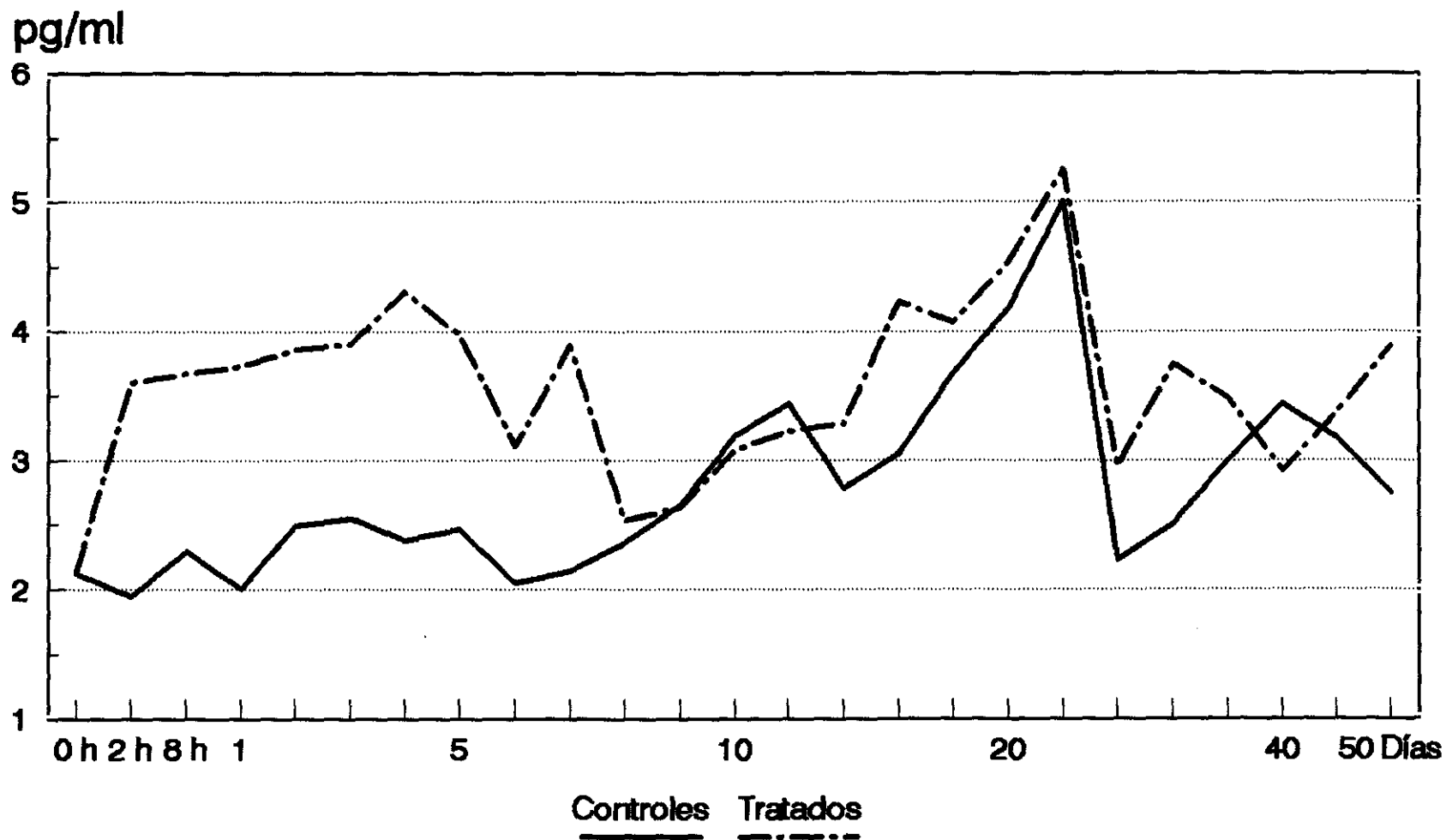


Gráfico 5. Concentraciones de  $17\beta$ -estradiol (pg/ml) en hembras.

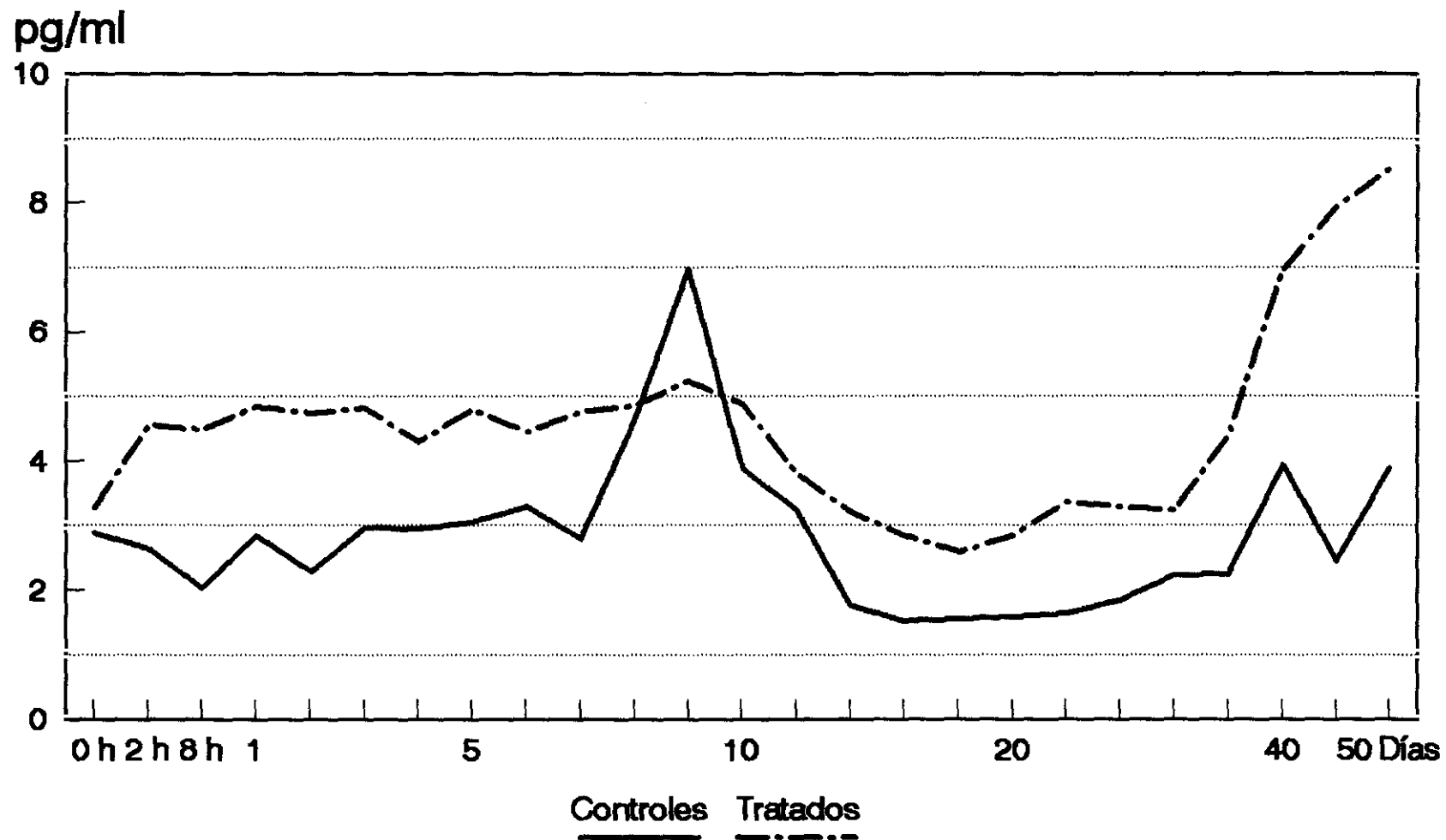




Gráfico 6. Concentraciones de testosterona (ng/ml) en machos.

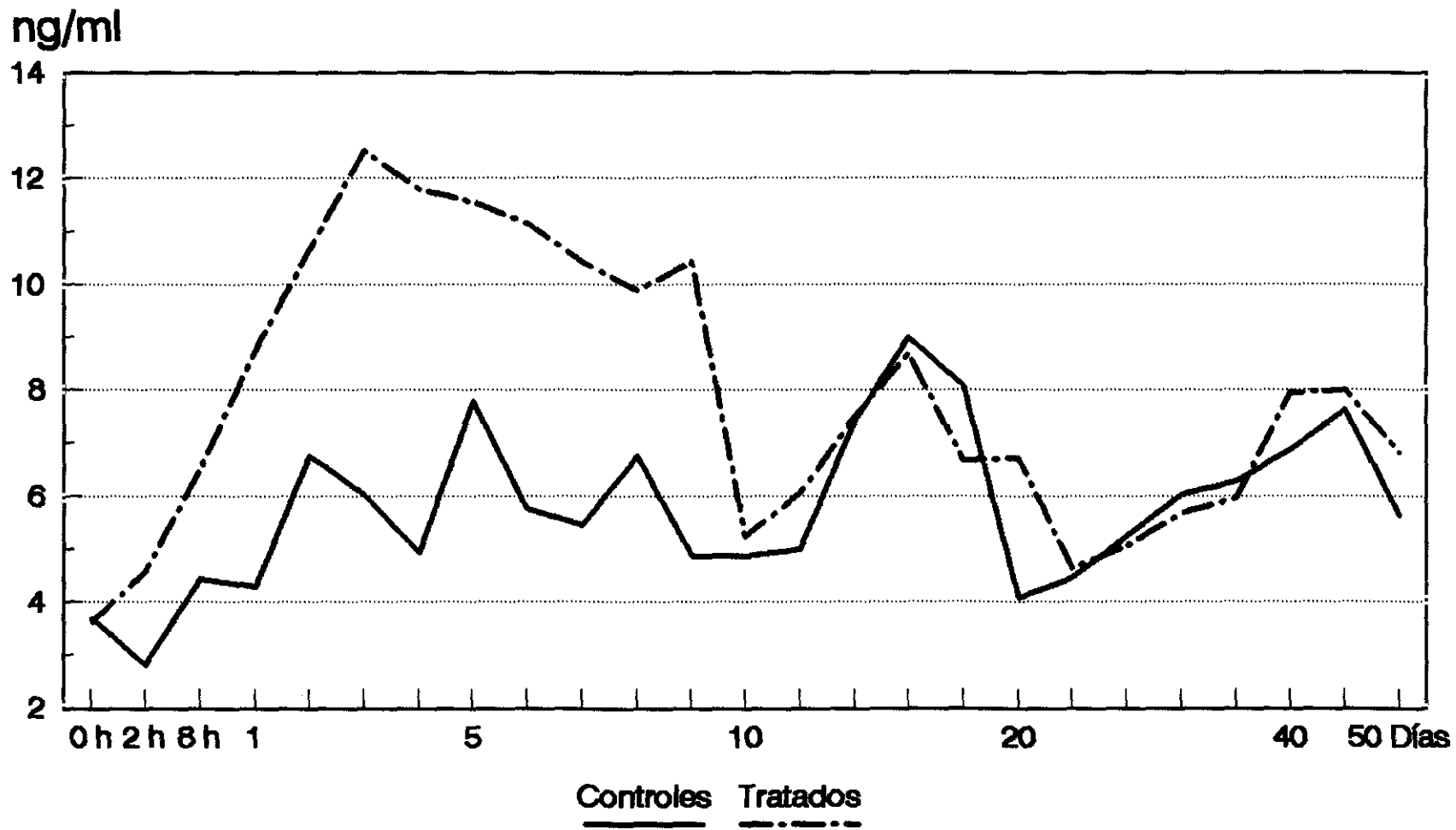


Gráfico 7. Concentraciones de testosterona (ng/ml) en hembras.

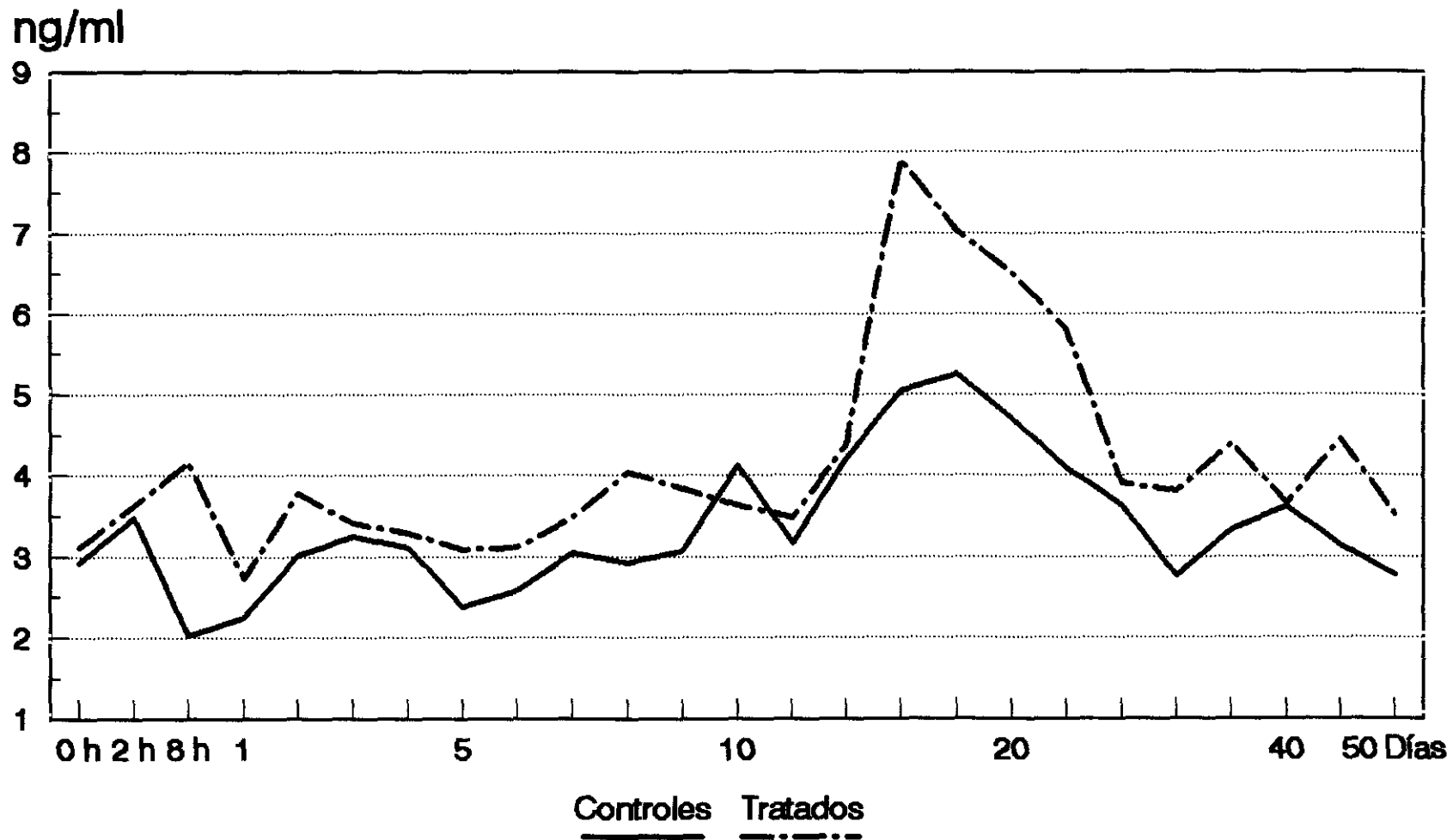


Gráfico 8. Concentraciones de cortisol (ng/ml) en machos.

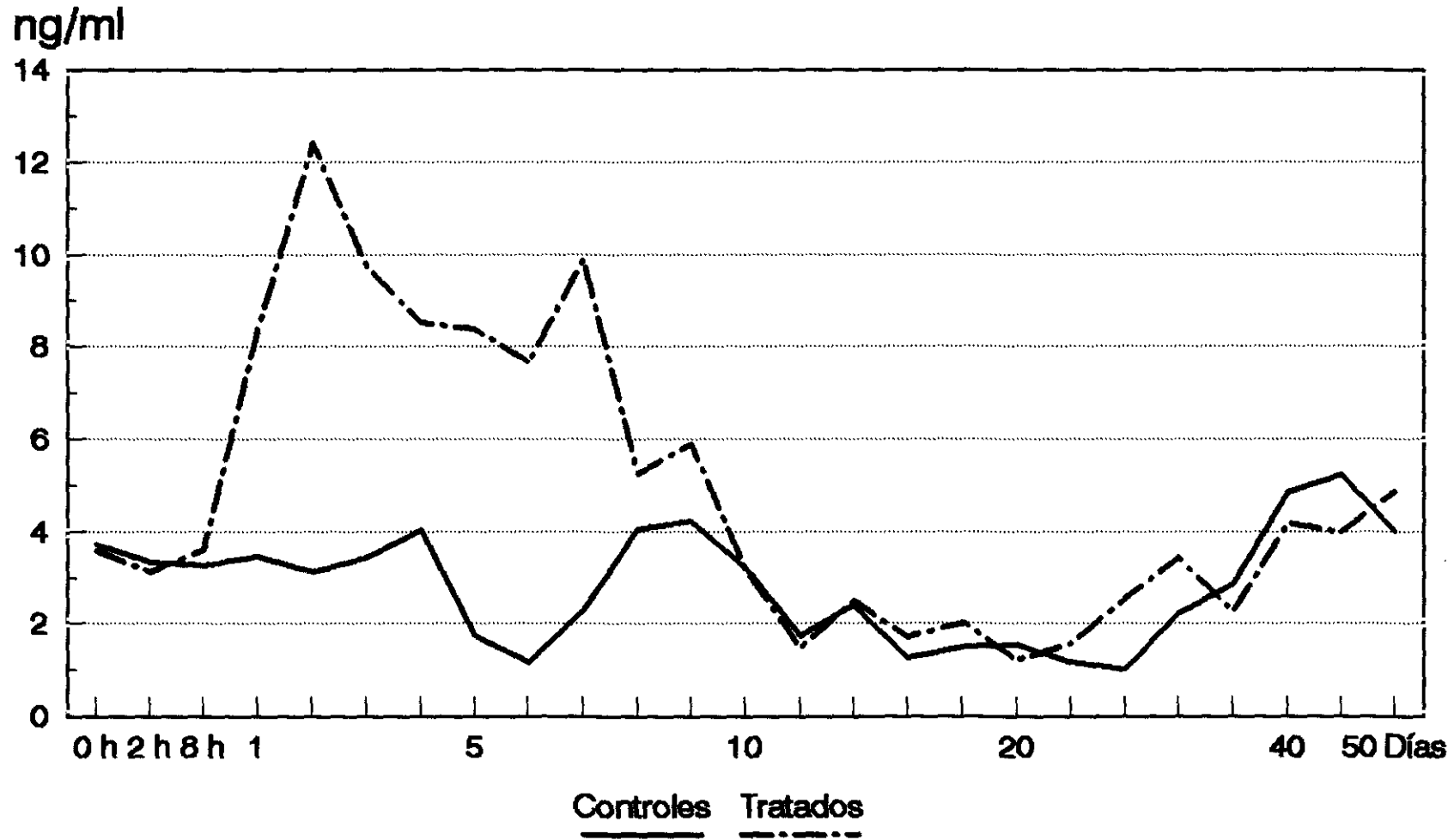


Gráfico 9. Concentraciones de cortisol (ng/ml) en hembras.

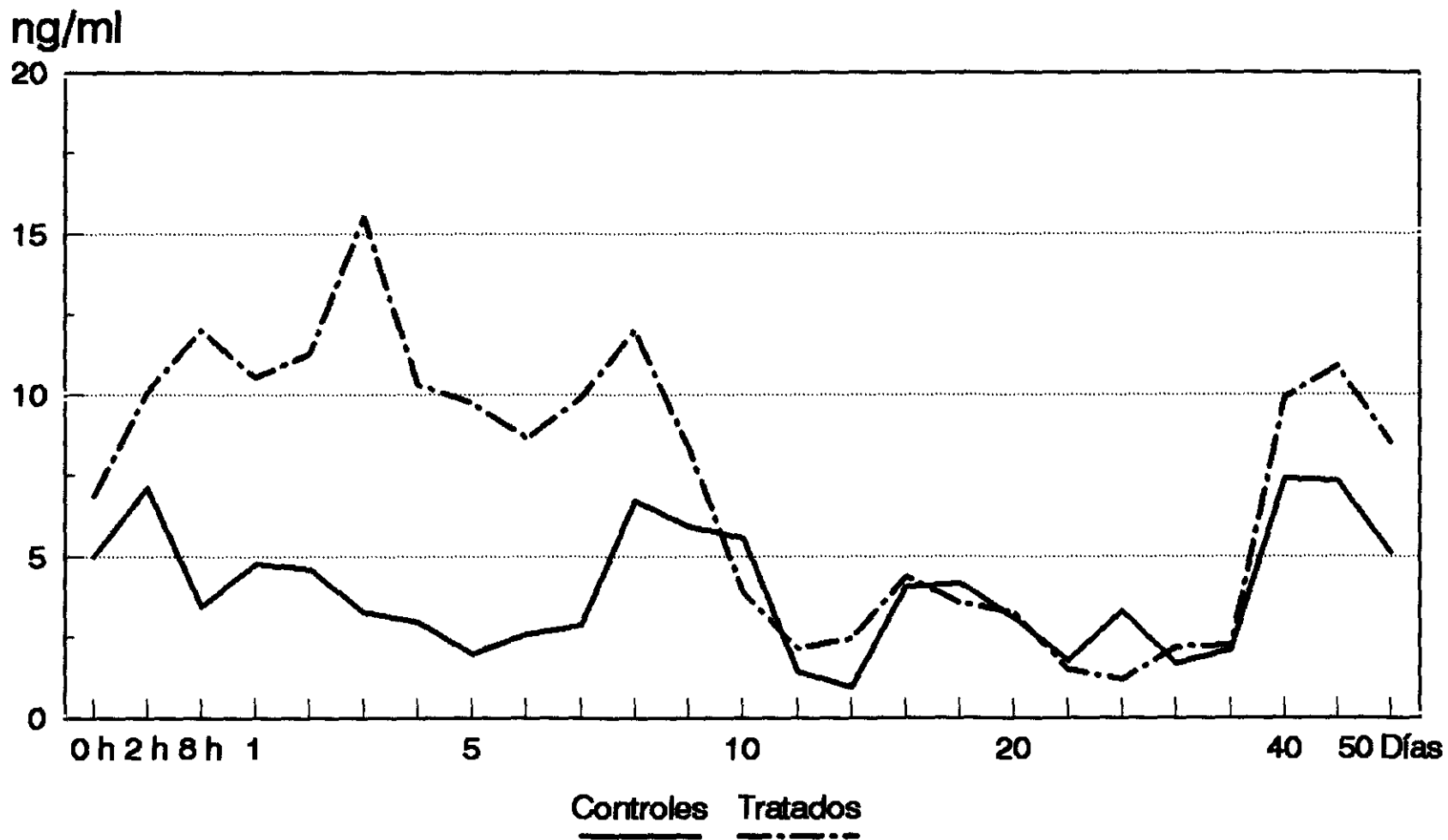


Gráfico 10. Concentraciones tri-iodotironina (T3) (ng/ml) en machos.

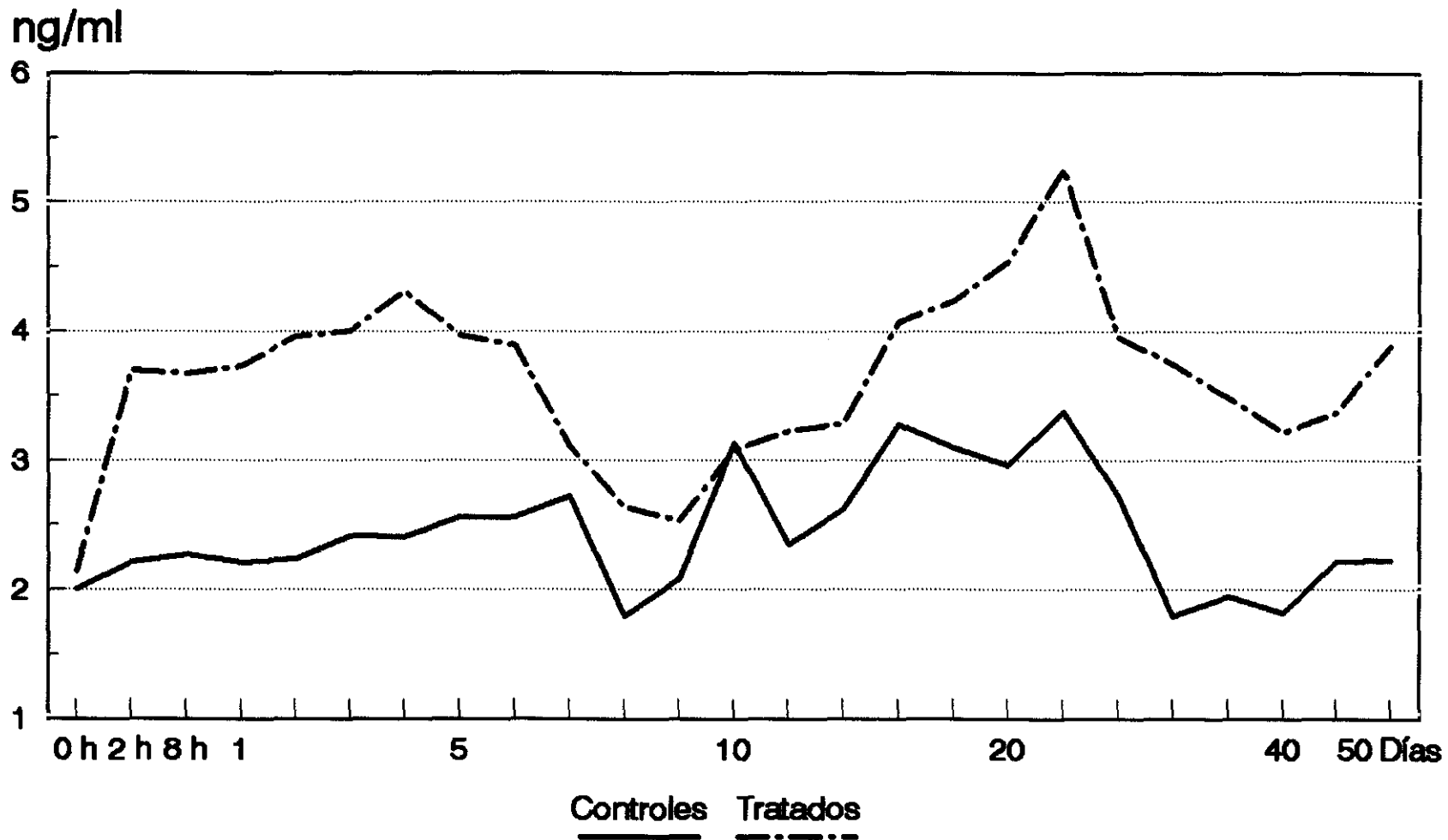


Gráfico 11. Concentraciones de tri-iodotironina (T3) (ng/ml) en hembras.

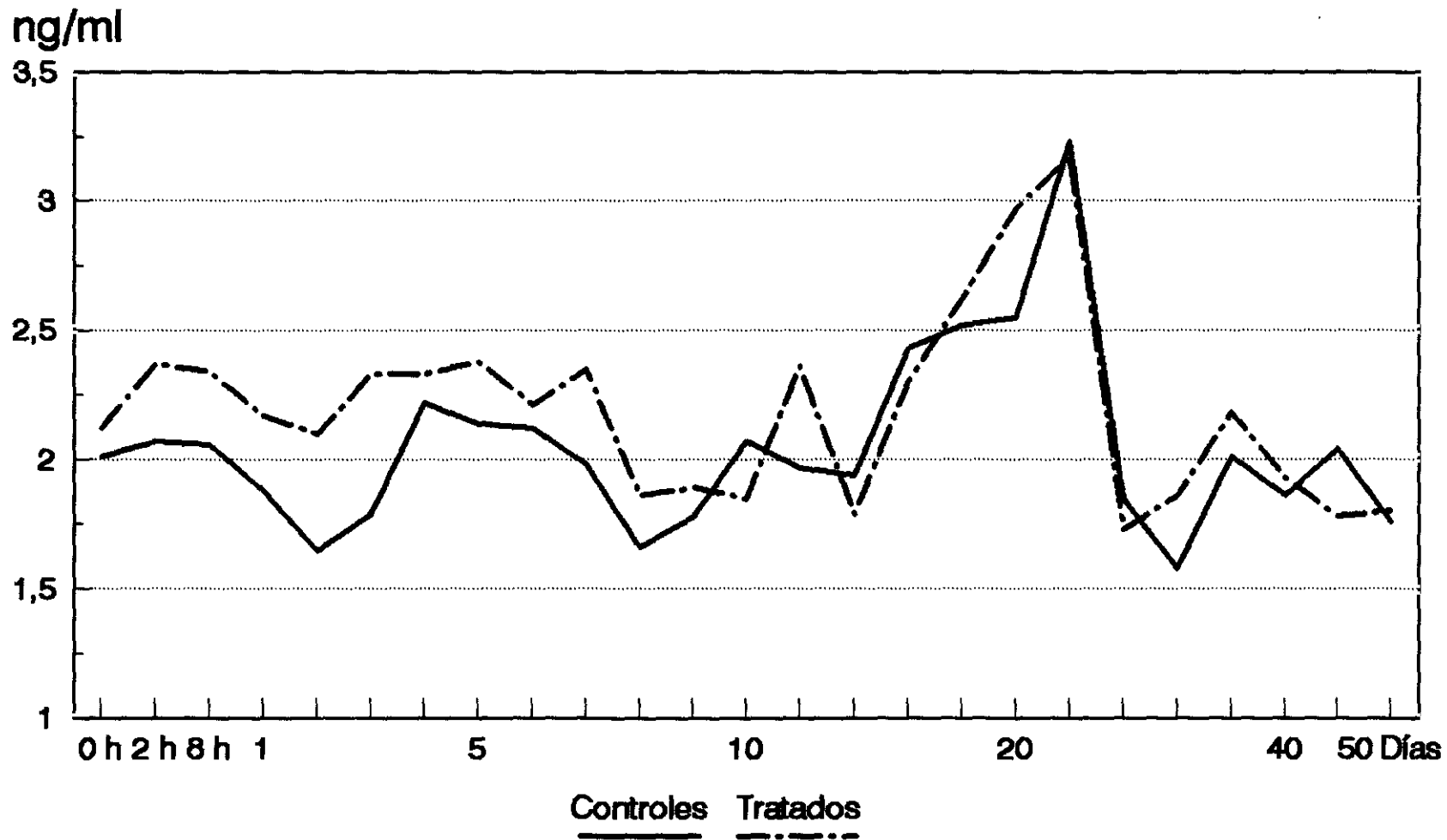


Gráfico 12. Concentraciones tiroxina (T4)  
( $\mu\text{g/dl}$ ) en machos.

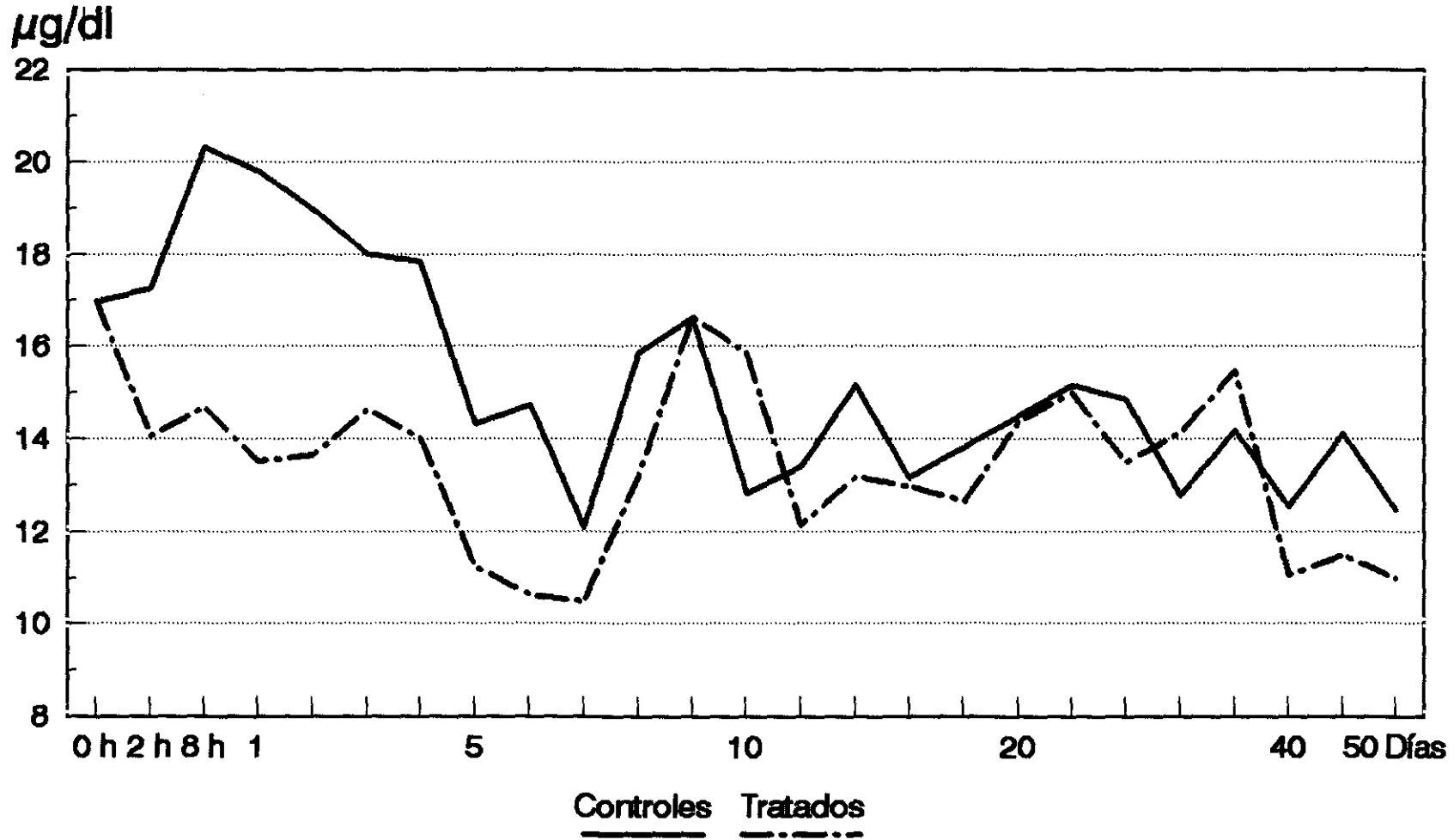


Gráfico 13. Concentraciones de tiroxina (T4)  
( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) en hembras.

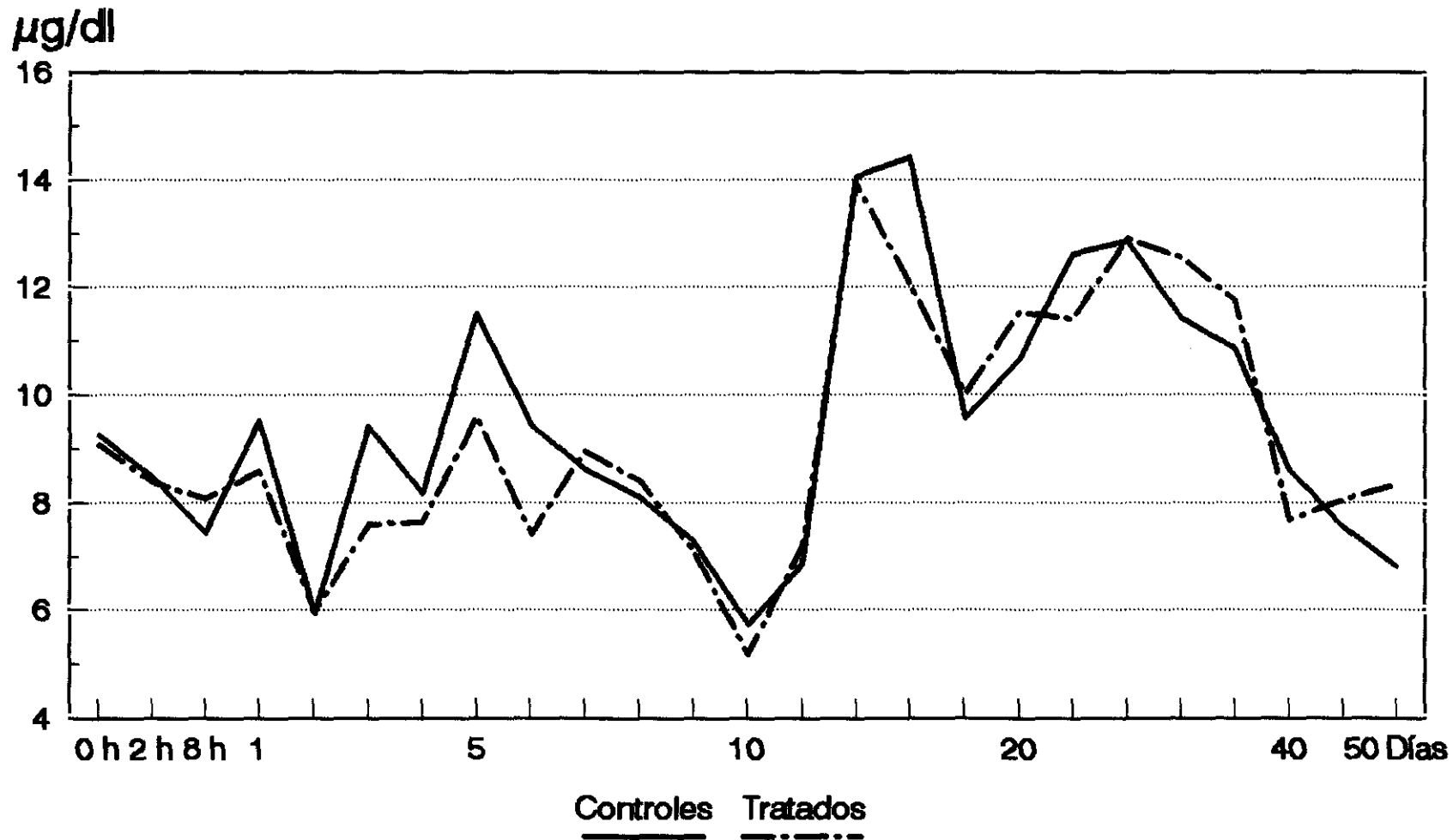




Gráfico 14. Concentraciones de la hormona  
estimulante de la tiroides (TSH) ( $\mu\text{U}/\text{ml}$ )  
en machos.

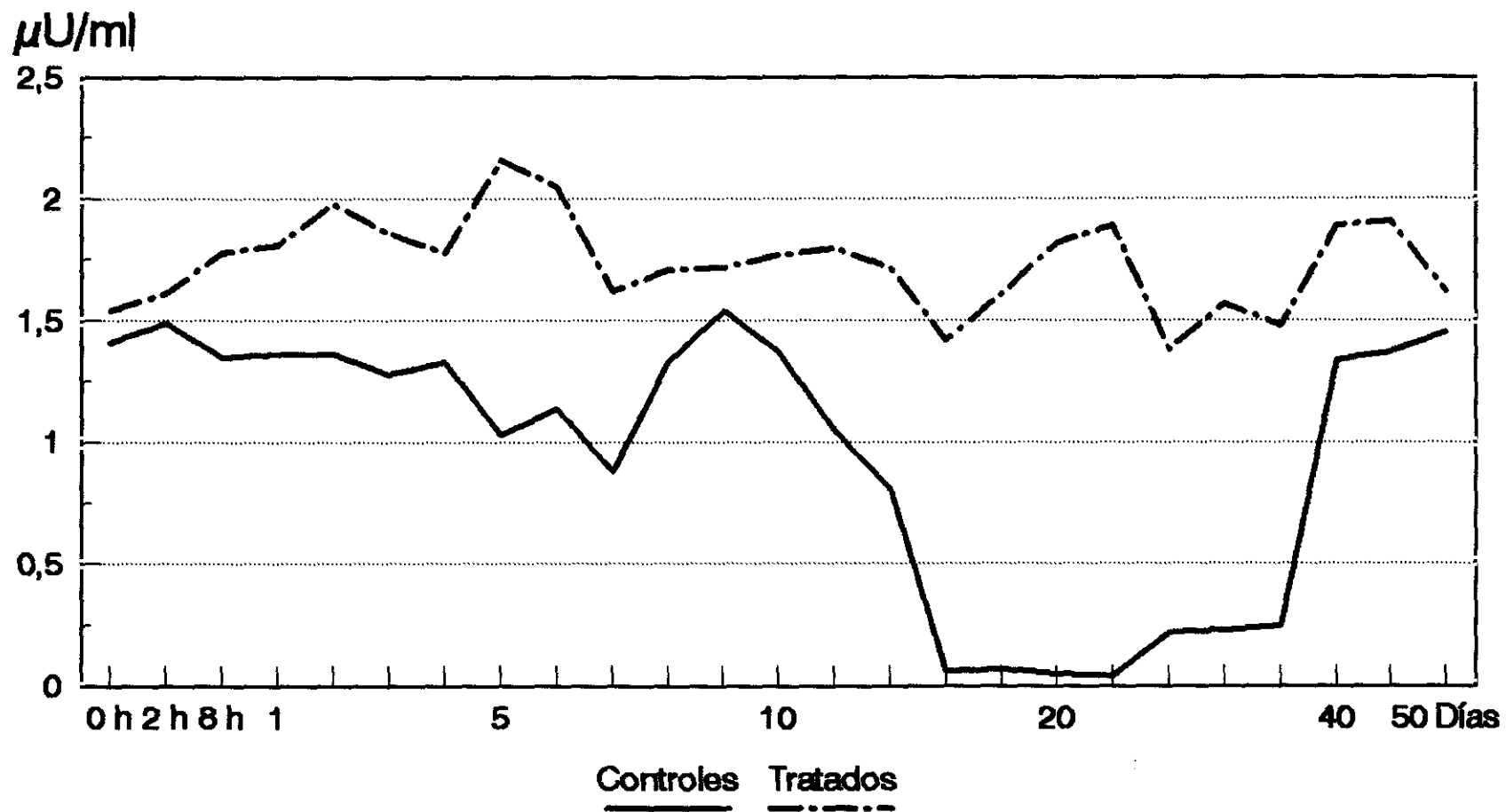


Tabla 16. Significación estadística entre grupos control y tratados de las diferentes variables

HORMONA	S	0 h	2 h	8 h	1 D	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TSH	M	-	-	*	*	**	*	*	***	***	***	**	*	**
	H	-	-	*	**	**	**	***	***	***	**	**	**	**
T4	M	-	*	***	***	**	**	*	*	*	-	-	-	**
	H	-	-	-	-	-	*	-	*	*	-	-	-	-
T3	M	-	**	***	**	***	***	***	***	**	**	*	-	-
	H	-	*	*	*	*	**	-	-	-	-	*	-	*
C	M	-	-	-	**	***	**	**	**	***	**	*	-	-
	H	-	**	***	***	***	***	***	***	***	**	-	*	*
T	M	-	-	*	***	**	***	***	***	***	***	***	*	-
	H	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-
17β-E2	M	-	**	**	**	**	**	***	**	***	*	-	-	-
	H	-	*	**	*	*	*	*	*	*	*	-	***	*
P4	H	-	-	-	-	***	***	***	***	**	*	*	-	-

TSH= Hormona estimulante de la tiroides T4= tiroxina T3=Tri-iodotironina  
 C= Cortisol T= Testosterona 17β-E2= 17β-estradiol P4= Progesterona

- p> 0,05

\*\* p< 0,01

\* p< 0,05

\*\*\* p< 0,001

Tabla 16 (cont.). Significación estadística entre grupos control y tratados de las diferentes variables

HORMONA	S	12	14	16	18	20	24	28	32	36	40	45	50
TSH	M	**	***	***	***	***	***	***	***	***	**	**	-
	H	*	**	***	*	*	*	*	*	*	-	-	*
T4	M	*	***	-	*	-	-	-	-	-	-	**	*
	H	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3	M	*	-	-	*	***	**	**	**	**	***	***	***
	H	**	-	-	-	**	-	-	-	-	-	*	-
C	M	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-
	H	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*
T	M	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-
	H	-	-	**	**	*	*	-	*	*	-	-	-
17β-E2	M	-	-	***	-	-	-	***	***	*	-	-	*
	H	-	*	***	*	*	*	*	**	*	*	**	***
P4	H	-	*	***	***	***	***	-	-	*	*	*	-

TSH= Hormona estimulante de la tiroidea T4= tiroxina T3=Tri-iodotironina

C= Cortisol T= Testosterona 17β-E2= 17β-estradiol P4= Progesterona

- p > 0,05

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01

\*\*\* p < 0,001

# **DISCUSSION**

El diseño de la experimentación se llevó a cabo de acuerdo con el análisis estadístico que se iba a realizar (BMDP) siguiendo las directrices del Sistema Informático de Somosaguas de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), con el fin de poder obtener unos resultados estadísticamente manejables, para lo cual se planificó cuidadosamente la elección de cada variable biológica. Ya se ha señalado, en el capítulo de material y métodos, la forma en la que se han elegido estas variables biológicas; sin embargo, nos parece importante recordar de nuevo este proceso, ya que a lo largo de este capítulo, discutiremos los criterios en los que nos hemos basado para la planificación y el desarrollo de nuestra experimentación.

Las variables biológicas utilizadas, fueron:

- 1° Número de animal
- 2° Hora o día de la toma de muestra.
- 3° Perfiles hormonales de: cortisol (C), 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>), progesterona (P<sub>4</sub>), testosterona (T), trenbolona, tri-iodotironina (T<sub>3</sub>), tiroxina (T<sub>4</sub>), hormona estimulante de la tiroides (TSH).
- 4° Grupo animal: tratados o testigos.
- 5° Sexo.
- 6° Peso inicial
- 7° Peso final

## Criterios de selección de la población estudiada.

La población fue seleccionada al azar, pero siguiendo unos criterios determinados.

En primer lugar, se tuvo en cuenta la estirpe eligiendo Limousine x Charoles. Los diferentes autores consultados utilizan otras razas de aptitud cárnica (Heitzman y Harwood, 1977; Heitzman *et al.* 1979; Peters *et al.* 1984; Lee *et al.*, 1990; Hunt *et al.* 1991; Ainslie *et al.* 1992) pero nosotros creímos oportuno utilizar ésta, dado la gran difusión que este cruce tiene en nuestro país; debido a su gran capacidad de adaptación, así como, su gran especialización cárnica, su gran desarrollo muscular, ligereza de piel y escaso peso óseo, proporcionando elevados rendimientos y esto, junto con su velocidad de crecimiento, permite obtener terneros precoces. Los machos son excelentes sementales, utilizados para el cruce industrial y para la potenciación de la producción de carne. Por las características anteriormente expuestas y teniendo en cuenta la expansión reciente que está experimentando este cruce en España (Lamo. 1990), podemos concluir diciendo que este cruce presenta un excelente futuro.

La edad o, más concretamente, el peso, como un factor de influencia decisiva, se tuvo en cuenta en nuestro estudio; y el que estos animales hubieran alcanzado la pubertad ya que está demostrado que el uso de los anabolizantes retrasa la edad de la pubertad lo que nos podría influir a la hora de la determinación de los perfiles hormonales entre el grupo control y tratado. Moran *et al.* (1990) estudiaron los efectos de los implantes de acetato de trenbolona, sobre la fertilidad y reproducción de terneras Hereford x Frisian, concluyendo que los agentes anabolizantes demoran la pubertad, aunque los animales alcanzaban ésta con más peso, pero también con mayor edad. Así mismo se incrementan la incidencia de estros no ovulatorios, provocando un retroceso en el desarrollo del tracto reproductivo de la hembra, cuando se administra a terneras hacia los 84 días de edad. Todo ello nos llevó a utilizar animales púberes y en las hembras se realizó una sincronización del celo previa, para que todas ellas se encontraran en el mismo estadio del ciclo estral.

En segundo lugar, se dispuso de una población control, con las mismas características, alojadas bajo las mismas condiciones y recibiendo, por tanto, idéntico manejo y alimentación para favorecer la homogeneidad de los resultados y que éstos pudieran ser representativos de las concentraciones hormonales de éstas, con la única diferencia de que a estos animales seleccionados no se les aplicó ningún tipo de tratamiento hormonal, factor determinante para los resultados de nuestro experimento.

Se comprobó, además, el estado sanitario de los animales analizados, para asegurar que éste era el adecuado.

### Elección de la técnica analítica

La elección de la técnica analítica que se vaya a utilizar debe realizarse con sumo cuidado, puesto que de ella va a depender que los resultados de nuestro estudio sean realmente válidos y alcancen los objetivos propuestos.

Existe una gran variedad de técnicas de análisis de hormonas; sin embargo, el desarrollo de las técnicas inmunológicas, desde hace aproximadamente unas tres décadas, causó una verdadera revolución dentro del mundo de la endocrinología (Blake y Gould, 1984), por lo que su utilización para la determinación de hormonas es cada vez mayor, en todo el mundo, quizás debido a sus características que les confieren grandes ventajas sobre otras técnicas analíticas tradicionales.

Dentro de las técnicas inmunológicas el radioinmunoanálisis (RIA) ha sido la estrella, desde que en 1969 Abraham desarrollase su ensayo para el  $17\beta$ -estradiol. Sin embargo, esta técnica posee una serie de graves inconvenientes: la corta vida media de sus reactivos, el pequeño número de isótopos que se pueden usar en la práctica, la realización de esta técnica entraña riesgos reales sobre la salud; además, la radiación puede causar daños e incluso la destrucción de las moléculas de las hormonas marcadas; la automatización de la técnica es difícil debido a sus

características; la infraestructura y el equipamiento, necesarios para desarrollar este método no están al alcance de todos los laboratorios y se necesita un personal altamente cualificado, y por último, el uso, destrucción y eliminación del material radiactivo, está sujeto, generalmente, a unas medidas de seguridad muy estrictas y a una infraestructura de la que no todos los laboratorios pueden disponer (Schuurs y Van Weemen, 1980; Riad-Fahmy *et al.*, 1981; Blake y Gould, 1984; Tijssen, 1985; Munro y Lasley, 1988).

Todos estos inconvenientes han dado lugar, en las dos últimas décadas, al desarrollo de una serie de técnicas inmunológicas, no isotópicas, para determinaciones hormonales, sustituyendo los isótopos radiactivos por otras sustancias marcadoras; de tal manera, que las técnicas resultantes reúnen todas las ventajas del RIA, evitando sus grandes inconvenientes, sobre la utilización de la radiactividad. De entre todas ellas, los enzimoimmunoanálisis (EIA) hicieron su aparición a principios de la década de los setenta (Van Weemen y Schuurs, 1972) y han constituido la más clara alternativa al RIA, al poseer una serie de ventajas: sensibilidad, detectabilidad, rapidez y especificidad muy elevadas, no siendo necesario realizar un tratamiento previo de la muestra o, en el caso de que se realice, no es complicado. La reproductibilidad es grande y la evaluación objetiva. Es realizable bajo condiciones de campo. No existe el peligro de radiaciones. La versatilidad de los análisis puede ser significativamente incrementada, debido a la gran variedad de enzimas y a sus propiedades específicas. El coste de los reactivos es razonablemente económico y con una vida media larga, así como el equipamiento requerido es relativamente barato y no necesita un personal altamente cualificado para la realización de estas técnicas (Tijssen, 1985; Munro y Lasley, 1988).

A todo lo anterior hay que añadir que, desde su aparición, estos métodos no sólo se han utilizado en investigación, sino que han sido enfocados hacia el diagnóstico práctico, lo que hace que la aplicación de estas técnicas en endocrinología veterinaria sea muy interesante (Schuurs y Van Weemen, 1980).



Una vez evaluadas y comparadas las características de los métodos inmunológicos de análisis hormonal, isotópicos y no isotópicos, nos decidimos por estos últimos, puesto que eran idóneos para nuestra infraestructura, además de la posibilidad de adaptarlos para pruebas de campo que nos pareció de suma importancia. De entre todos ellos elegimos el ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) de competición, en microplaca, por ser la más utilizada para la determinación de hormonas, que posean un peso molecular muy bajo y no puedan unirse a dos anticuerpos a la vez, como ocurre con las técnicas de tipo Sandwich (Munro y Stabenfeldt, 1984). Esta técnica ha sido empleada para la determinación de todo tipo de hormonas en diversos fluidos biológicos como plasma, suero, saliva, y orina (Dray *et al.*, 1975; Sauer *et al.*, 1981) y líquido folicular (Silván, 1991).

La elección del método ELISA está determinada principalmente por el método de separación de las fracciones unida al anticuerpo/libre y por el uso de la homología o heterología. La separación de ambas fracciones es necesaria después de la reacción inmunológica, con el fin de detectar y cuantificar la hormona sin marcar.

Schuurs y Van Weemen (1980) recomiendan determinar la hormona en la fracción unida por varias razones: las sustancias de la muestra que interfieren en el ensayo se eliminan fácilmente, la reacción enzimática se puede llevar a cabo en las condiciones óptimas y, por último, no requiere una purificación tan estricta del conjugado, así que, si existe enzima sin conjugar, al ser eliminada, ésta no modifica los resultados.

En la primera etapa del ensayo, una cantidad fija y limitada de anticuerpo se fija a la parte sólida. En anticuerpo que no haya reaccionado se elimina en el posterior lavado. Después, se añade una mezcla de muestra problema, o estándar, y el conjugado hormona-enzima. Con sucesivos lavados, se elimina la fracción libre y la enzima residual, sin conjugar. Finalmente, la fracción unida marcada se determina mediante la adición del sustrato y la lectura de la absorbancia del color desarrollado.

En cuanto al tipo de análisis, se ha utilizado el método homólogo, frente al heterólogo. En la elección de uno u otro método existe una gran controversia entre los autores. Los partidarios del método heterólogo (Van Weemen y Schuurs, 1975, 1976; Abuknesha y Exley, 1978; Van de Wiel y Koops, 1982; 1986; Sauer *et al.*, 1986) argumentan que aumenta la sensibilidad de las técnicas de análisis. Esto es debido a que el enlace que une la hormona y la enzima no es reconocido antigénicamente por el anticuerpo, luego la afinidad de éste por la hormona libre y conjugada es similar, favoreciendo la reacción de competición entre ambas. Por el contrario, otros autores (Dray *et al.*, 1975; Tateishi *et al.*, 1977; Maurel *et al.*, 1986; Marcus y Durnford, 1986) señalan que la sensibilidad obtenida en los ensayos homólogos y heterólogos es la misma y que, para disminuir la afinidad del anticuerpo por el derivado hormonal, unido a la enzima, se debe aumentar la dilución del anticuerpo en el ensayo, así que, con el mismo volumen de anticuerpo se pueden realizar más ensayos.

Como se puede deducir, el problema sigue aún sin resolverse del todo, por lo que en nuestro caso, se utilizó el método homólogo por la disponibilidad de obtener comercialmente derivados esteroideos (para utilizarlos como inmunógenos o en el conjugado enzimático), al carecer de la infraestructura necesaria para realizar, en nuestro laboratorio, la síntesis de nuevos derivados esteroideos.

En cuanto a la fase sólida, se eligió la microplaca, debido a que como el anticuerpo está unido a ella, la separación entre las fracciones libre y unida se consigue fácilmente mediante un volcado y varios lavados consecutivos. Además, varios autores señalan que se consigue aumentar la repetibilidad de la técnica, en comparación con otras fases sólidas (Burrels y Dawson, 1982; Wimpy *et al.*, 1986).

Los anticuerpos se adhieren a la fase sólida según el método propuesto por Coll (1988) que diluye los anticuerpos en agua purificada (pH = 7), a 37°C durante 16 horas. Esta observación también se puede realizar con una solución tampón carbonato-bicarbonato de pH= 9,6 durante 16 horas a 4°C (Van de Wiel y Koops, 1982; 1986; Munro y Stabenfeldt, 1984; Munro y Lasley, 1988) o con tampón acetato de pH= 4-5 (Sauer *et al.*, 1982; Marcus y Durnford, 1986). Con el método de Coll

(1988) se reduce significativamente el color inespecífico de fondo y se ha obtenido un incremento en la repetibilidad de la técnica.

La dilución del anticuerpo que se utilizó fue de 0,5-1  $\mu\text{g}$  por pocillo (Van de Wiel y Koops, 1986), en un volumen de 100  $\mu\text{l}$  por pocillo. Esta cantidad es suficiente para tapizar toda la superficie del pocillo.

La adsorción inespecífica del conjugado enzimático se impide añadiendo una solución tampón fosfato 0,01 M, con 0,1% de BSA (Albúmina Sérica Bovina), en la reacción de competición.

El tiempo que se emplea en el tapizado de la placa, con la dilución de las muestras en el conjugado, no superó los ocho minutos. Esto favorece la repetibilidad y la igualdad de los valores de absorbancia entre la filas  $E_0S$  y  $E_0E$ , (Munro y Stabenfeldt, 1984).

La reacción de competición se llevó a cabo a  $20 \pm 3^\circ\text{C}$ , en la oscuridad, durante 2 horas y evitando temperaturas superiores a  $24^\circ\text{C}$ , ya que en caso contrario, estas temperaturas provocarían una disminución de los valores de absorbancia, incrementándose artificialmente los valores de concentración (Zarco, 1988).

Para la reacción enzimática se empleó peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) como sustrato y ortofenilén-diamina dihidroclorhidrato (OPD) como cromógeno, que al reaccionar con la enzima del conjugado (peroxidasa de rábano picante) produce una coloración visible y estable durante horas. Esta reacción se realizó a temperatura ambiente (siempre dentro de los márgenes antes señalados) y en la oscuridad, durante una hora. A continuación, se procedió a la lectura de la absorbancia según el color, en el lector automático ELISA que lo realiza en diez segundos. Gracias a esta rapidez, las variaciones entre el primer y último pocillo no son significativas lo que hace innecesario el frenado de la reacción.

Dada la gran experiencia, que en nuestro departamento tenemos en el ELISA de competición (Silvan 1991; Blass 1992; Esteban 1992). Adoptamos esta técnica con las modificaciones oportunas, para la determinación de trenbolona a nivel sanguíneo, aunque utilizamos, además, otra técnica la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Con ello se consiguió un objetivo muy importante: la validación de nuestra técnica de análisis hormonal de TBA en el plasma de la especie bovina, puesto que los valores obtenidos coincidían con los de otros autores (Schopper *et al.*, 1983) y aunque, en un principio, empezamos a utilizar el Kit comercial (Laboratorios Randox), intentamos variar esta técnica para obtener mejores resultados. En primer lugar, modificamos la dilución del anticuerpo, consiguiendo alcanzar una dilución de trabajo de 1/1000, con lo que se aprovecha muchísimo más el anticuerpo comercial, así como la incubación del mismo; la cual se realizó a 37°C durante 18 horas en la oscuridad, obteniendo una mejor adsorción del anticuerpo a la fase sólida (pocillo de la microplaca). En segundo lugar, modificamos la mezcla utilizada para la reacción de competición, en la cual añadimos 50 µl de la solución buffer ELISA y 50 µl de la mezcla que estaba compuesta por la muestra a analizar, diluida en la solución de conjugado, con esta modificación se obtiene un mayor aprovechamiento del conjugado, una mayor reacción de competición entre la hormona marcada y sin marcar y el poder disponer de más muestra para otras determinaciones, ya que se reduce a la mitad la cantidad que se necesita de la misma.

Todo lo citado anteriormente, nos llevó a la conclusión que las modificaciones realizadas en el ELISA para trenbolona mejoran notablemente su sensibilidad, así como, un factor muy importante como es el económico ya que de un Kit comercial podemos realizar, en vez de una sola placa, hasta cuatro, con el ahorro económico que esto lleva consigo.

La cromatografía líquida de alta resolución está considerada, en la actualidad, como un potente instrumento utilizable en el análisis de una amplia variedad de muestras. No obstante, uno de los inconvenientes que frecuentemente se observa es

una inadecuada selectividad y una sensibilidad limitada en el proceso de detección, particularmente cuando se pretende determinar compuestos-traza, en matrices complejas, tales como fluidos biológicos o en el control de contaminación ambiental.

La sensibilidad que obtuvimos cromatográficamente fue baja (12 ng/ml), en comparación con la obtenida a través del ELISA de competición, validado en nuestro Departamento (0,25 ng/ml). La baja sensibilidad obtenida por HPLC para TBA, coincide con lo descrito por Jouquey *et al.* (1983) sobre el HPLC y su escasa sensibilidad para detectar dicho anabolizante en el suero, así como, la dificultad que entraña la utilización de dicha técnica analítica en la cuantificación, ya que pueden existir otras sustancias que absorban a la misma longitud de onda que la trenbolona.

En el capítulo de resultados se expresa el límite de detección para la trenbolona por HPLC, que fue de 12 ng/ml de una solución estándar que contenía distintas diluciones de trenbolona. Como se puede apreciar en la tabla 2, tanto en machos como en hembras en ninguno de los casos la concentración máxima o más alta analizada fue de 3,5 ng/ml obteniendo un máximo valor para las hembras a los 3 días de la experimentación de  $2,75 \pm 0,58$  ng/ml, por lo que no pudimos analizar muestras de plasma sanguíneo, de nuestra experimentación por HPLC, ya que esta técnica, por ahora, no es lo suficientemente sensible para ello.

A todo lo anterior viene a sumarse un factor económico, ya que no está al alcance de todos los laboratorios efectuar una inversión tan elevada para poder adquirir todos los aparatos y reactivos necesarios para el HPLC.

Otra dificultad, con la que contábamos, era la de la preparación y purificación de la muestra de sangre, dado que se requiere un complejo procesamiento antes de ser introducida en el cromatógrafo. Esta purificación, a la vista de la alta sensibilidad dada por el ELISA, se mostró innecesaria. Por todo ello, podemos concluir que el ELISA, modificado en nuestro laboratorio, resulta un método más acertado para la detección de TBA en sangre, que el HPLC. Además, de cara a la práctica veterinaria en mataderos, el ELISA presenta dos claras ventajas:

- La obtención de la muestra para la detección de TBA en sangre es más asequible que la obtención de orina (donde se suele realizar la técnica HPLC), dado que no se requiere sondar a la res.
- El ELISA es un método más rápido (4 horas ) que el HPLC (24 horas).

Estas dos ventajas, junto a su sencillez y economía, hacen del ELISA de competición un método idóneo para su aplicación en la práctica veterinaria.

Los resultados de estos análisis se encuentran reflejados en las gráficas, estos nos indicaron que nuestra técnica era perfectamente válida, para la determinación de las hormonas esteroides así como de las tiroideas. La validación de esta técnica de análisis hormonal en plasma de esta especie fue realizada por Silván (1992) coincidiendo los valores con los de otros autores, usando RIA y EIA como técnicas de análisis (Garverick *et al.*, 1971; Schams *et al.*, 1977; Dobson, 1978; Wise *et al.*, 1982; Hansel y Convey, 1983; Dobson *et al.*, 1986; Marcus y Durnford, 1988; Meyer *et al.*, 1990).

### Resultados obtenidos

Una vez estandarizadas las técnicas de análisis hormonal se procedió al estudio estadístico de la población de hembras (control y tratados) y machos (control y tratados).

En el Gráfico 1 se encuentran reflejadas las medias de variaciones de peso, en machos y hembras, encontradas entre el principio y el final de la experimentación, tanto en animales tratados como en controles. En la Tabla 1 se encuentran representados los valores medios (media  $\pm$  E.S.M.) de los pesos de los animales (kg) controles y tratados, al principio y al final -pasados los cincuenta días de la experimentación-, pudiéndose observar que el peso inicial de los machos control ( $384,20 \pm 5,06$ ) y tratados ( $367,80 \pm 8,36$ ), así mismo de las hembras control ( $340,40 \pm 5,15$ ) y tratadas ( $342,70 \pm 5,25$ ) al principio de la experiencia son similares. Se

intentó que los lotes de los animales fueran lo más homogéneos posibles, lo que se demuestra en la pequeña diferencia que existe entre los mismos, dependiendo de si son machos o hembras, teniendo en cuenta que los machos tienen un mayor peso que las hembras para una misma edad, ya que el desarrollo muscular es más acusado en los primeros, coincidiendo con el que deberían tener para esa edad.

Observamos una diferencia notable en las variaciones de pesos (kg), tanto en machos como en hembras pasados esos cincuenta días. Los machos tratados, presentan una ganancia de peso de 105,99 kilogramos y los control de 78,16 kg, al final de la experimentación, existiendo 27,83 kg de diferencia, valores que representan un 28,81% y 20,34% respectivamente de incremento de peso, lo que porcentualmente representa un aumento en los machos tratados al final de la experimentación de un 23,31% respecto al peso inicial de los machos utilizados como controles.

La diferencia de peso aún es mayor en las hembras, ya que llegaron a diferir en 34,61 kg entre tratados (104,79 kg) y controles (70,18 kg) desde el principio y el final del experimento. Porcentualmente el incremento que experimentan las hembras es de un 31,46%, respecto al peso inicial de las hembras control.

El análisis estadístico de estos resultados revela una diferencia significativa entre controles y tratados de  $p < 0,05$  en los machos y  $p < 0,01$  para las hembras.

Estos hallazgos confirman los ya descritos en la literatura. Es conocida la influencia que ejerce el sexo o más concretamente el estatus hormonal del animal, sobre la velocidad de crecimiento e índices de conversión. Así los machos adultos experimentan un crecimiento más "rápido" que los machos jóvenes y estos últimos más que las hembras jóvenes. Estos perfiles hormonales, pueden alterarse exógenamente, por la administración de diferentes esteroides con el fin de obtener un mayor rendimiento del animal. Burris *et al.* (1953) estudiaron el incremento en la ganancia de peso en ganado vacuno tras utilizar la hormona masculina (testosterona), llegando a la conclusión que se producía un 11% de incremento en el peso de los novillos y un 21% en el de las terneras. Heitzman y Chan (1974) analizaron el

incremento de peso en las terneras (Frisian x Ayrshire) con un único implante de 300 mg de acetato de trenbolona, experimentando un incremento del 23% frente a un 16% en los animales control. Van Der Wal (1975) realizó una revisión sobre la utilización de andrógenos y/o estrógenos para incrementar la producción cárnica. Galbraith (1980) analizó el efecto que un único implante de 300 mg de TBA ejercía sobre el crecimiento de las terneras (Hereford x Frisian), siendo éste de un 23% en comparación con un grupo control al que no fue aplicado ningún tipo de tratamiento. Henricks *et al.* (1982) en terneras con la aplicación de un implante de 300 mg TBA, en un período de tiempo similar al nuestro (62 días), obtiene unos incrementos de peso del 18% y del 15% en animales tratados y control, respectivamente.

Por lo que se refiere a los machos; Heitzman *et al.* (1977) estudian el incremento de peso en novillos con dos diferentes tratamientos, siendo este incremento de un 20% en los animales tratados con un implante de 300 mg de TBA y en los controles de un 16%, indicando estos autores que la combinación de TBA con estrógenos mejora el rendimiento del animal. Peters *et al.* (1984) vió el efecto que, 300 mg de TBA con 30 mg de hexoestrol, ejercía sobre novillos, obteniendo unos incrementos de un 23% respecto a un 17% en los animales controles. Lee *et al.* (1990) con la combinación de 200 mg de TBA y 24 mg de estradiol en novillos (Angus x Brahaman), obtenía unos incrementos del 25% frente a un 19% en aquellos animales que no se les practicó ningún tratamiento. Ainslie *et al.* (1992) estudia la influencia que ejerce, el TBA con estradiol, sobre el crecimiento de novillos Holstein obteniendo unos incrementos del 29% y 18%, respectivamente.

A tenor de los resultados de nuestro estudio y los obtenidos por los distintos autores, se puede apreciar que existe una gran variabilidad en los rendimientos obtenidos en los distintos animales con los diferentes tratamientos. Posiblemente, esas diferencias se deban a la raza, alimentación, edad y el método de administración del anabolizante, así como al manejo de los animales. De cualquier forma, nuestros rendimientos están en la línea de otros autores que trabajan en similares circunstancias.



El Gráfico 2 presenta las variaciones de concentración de trenbolona en las muestras de plasma obtenidas en machos y hembras, a lo largo de los 14 días siguientes a la colocación del implante. Como puede apreciarse en la gráfica, las concentraciones son muy variables, tanto en machos como en hembras. En éstas se observa un pico ( $2,75 \pm 0,58$  ng/ml,  $C_{max1}$ ) entre las 8 y las 24 horas siguientes al implante, siendo éste más alto que el de los machos, que lo presentan aproximadamente a las 48 horas ( $2,05 \pm 0,46$  ng/ml,  $C_{max1}$ ). Luego, en ambos casos, se observa un segundo pico, muy alto en los machos, que alcanza una concentración de casi 3 ng/ml ( $C_{max2}$ ), el quinto día de tratamiento. En las hembras aparecen dos mesetas, con un máximo de algo más de 1,5 ng/ml ( $C_{max2}$ ) el séptimo día de tratamiento. En ambos sexos, las concentraciones desaparecen prácticamente el día 14 de la experimentación, que coincide con la toma número 15. La tabla 2 ilustra las concentraciones (media  $\pm$  E.S.M.), con las que se ha construido la gráfica citada.

A la vista de la Gráfica 2 podemos hacer una serie de comentarios que nos van a llevar a unas conclusiones precisas. En primer lugar, parece como si los implantes fueran provistos de una cantidad de trenbolona de fácil disponibilidad, justificada por las altas concentraciones del principio del experimento. Después, la otra fracción de trenbolona parece liberarse más tardíamente, como consecuencia, sin duda, de llevar el implante unos excipientes que producen una liberación retardada del principio activo. Por otro lado, el que la trenbolona desaparezca, prácticamente, de la sangre al cabo de los 14 días de administrado el implante nos lleva a la conclusión que la trenbolona es fácilmente metabolizable, como ya han demostrado otros autores (Pottier *et al.*, 1975; Ross, 1980; Rico *et al.*, 1981), y que si se deja un tiempo de espera, entre la aplicación del implante y el sacrificio del animal, no parece que exista peligro potencial para los consumidores que ingieran carne de reses así tratadas. Ese tiempo de espera se ha estimado en unos 30 días. Aquí queda demostrado que después de los 14 días no hay concentración medible y eso a pesar que hemos dispuesto de una técnica altamente sensible, como ya se ha demostrado en páginas precedentes. Si la demora que se ha recomendado es de más de 30 días se debe a que lo más normal es que los ganaderos utilicen dos implantes, siendo recomendada la administración del segundo de ellos a las dos semanas del primero, para obtener unos

mejores rendimientos (Henricks *et al.*, 1982), justamente como se ve en la gráfica cuando han desaparecido los niveles sanguíneos del primero de los implantes. Nosotros, como queda dicho, sólo hemos utilizado un implante para determinar la cinética de la sustancia. Son metas diferentes.

A pesar de la escasa bibliografía existente, nuestro perfil sanguíneo de los niveles de TBA en hembras, es similar al descrito por Henricks *et al.* (1982), sólo que este autor obtiene unos valores inferiores a las 24 horas (1 ng/ml frente a los 2,7 ng/ml), siendo, además, la duración de los niveles en sangre cercana a los treinta días frente a los 14 días nuestros. Schopper (1983), con una dosis igual a la empleada en este estudio, obtiene un pico inicial a las 24 horas (en plasma) de 2,5 ng/ml. También la concentración de la TBA es mayor en el tiempo, pudiéndose detectar hasta el día 40. El porqué de la diferente permanencia en sangre del TBA, puede estar en relación con los diferentes tipos de implantes utilizados en los trabajos ya citados, pues la liberación del principio activo puede ser más o menos retardada, o bien, con el método de análisis empleado y a las condiciones de manejo, así como en la raza de los propios animales.

Como se recordará, decíamos, en capítulos anteriores, que una de las motivaciones que nos llevó a hacer esta experimentación, fue la escasa bibliografía existente de como un sólo implante de acetato de trenbolona podía afectar a los perfiles hormonales endógenos de los animales tratados, en comparación con los controles, como podremos comprobar tras el análisis de nuestros resultados.

En cuanto a la influencia de la trenbolona sobre el perfil hormonal de la **progesterona**, como muestra el Gráfico 3 (téngase en cuenta la falta de proporcionalidad en el eje de abcisas), que representa las concentraciones plasmáticas de progesterona encontradas en las hembras controles y tratadas, se puede apreciar como las hembras controles son hembras cíclicas y durante los 50 días de la experimentación presentan casi tres ciclos estrales completos. Esto se demuestra por los valores obtenidos en el día 10, en cual los animales tenían una concentración de progesterona plasmática de  $1,22 \pm 0,10$  ng/ml correspondiendo estos valores con la

fase de luteolisis y el comienzo de la fase folicular del ciclo estral en estas hembras. Así mismo, entre los días 28 al 32 de la experimentación aparece otra disminución de los niveles de progesterona ( $2,18 \pm 0,21$ ;  $1,35 \pm 0,15$  ng/ml) correspondiéndose estos valores con la mencionada fase del ciclo estral. Por último, el día 50 se vuelve a repetir este descenso de los valores plasmáticos de progesterona ( $1,13 \pm 0,07$  ng/ml) indicándonos que comienza otro nuevo ciclo en estas hembras.

Todos los valores obtenidos están dentro del margen aceptado como fisiológico, en ganado vacuno, si bien, este incluye un rango muy amplio de concentraciones, abarcando desde 0,6 ng/ml a 6,6 ng/ml (Dobson y Kamonpatana, 1986; Peters, 1987) dependiendo de la fase del ciclo en que se encuentre el animal. Este margen también está dentro de lo descrito por Silván (1991) y por Blass (1992), aunque en el primer caso se utiliza la vaca de raza frisona y, en el segundo, raza limousine pura, encontrándose diferencias significativas entre ambas razas de ganado vacuno. En nuestro estudio, los animales utilizados fueron de cruce limousine con charolés, con lo que, como se puede apreciar en la tabla 3, estos valores coinciden más con los de Blass (1992) (margenes:  $0,49 \pm 0,06$  ng/ml y  $5,85 \pm 0,24$  ng/ml), ya que en nuestro caso también eran animales de producción cárnica. Esto viene a demostrar que no se debe utilizar siempre como modelo de la ciclicidad y de los perfiles hormonales esteroides a la raza frisona, ya que existen diferencias que pueden llevarnos a conclusiones erróneas.

En las hembras tratadas (Gráfico 3) no podemos apreciar esta ciclicidad ya que, al haber sido implantadas con trenbolona, se produce una disminución de la actividad folicular, con lo que las hembras pasan a estar en un estado de anestro, casi hasta el día 40 de la experimentación, momento en el cual sus niveles parecen que coinciden con los de las hembras controles produciéndose una elevación de los niveles de progesterona plasmática ya que como se puede apreciar en la tabla 3, en ningún momento de la experimentación anterior al día 40, los animales presentaron un nivel superior a 2,5 ng/ml de progesterona plasmática, hecho indicativo de la abolición del crecimiento folicular. A partir del día 40 estos valores ya alcanzan un nivel de  $3,55 \pm 0,31$  ng/ml, por lo que se deduce que en estos animales el ovario comienza a tener

desarrollo o crecimiento folicular, lo cual trae consigo la nueva ciclicidad de estos animales. El efecto que produce este esteroide andrónico, acetato de trenbolona, en los animales de nuestra experimentación es debido a que parecen perder su ciclicidad como consecuencia del tratamiento, lo que, coincidiendo con los resultados descritos por Heitzman y Chan. (1974), Heitzman *et al.* (1977) en la vaca de raza frisona aunque, como se ha señalado anteriormente, estos perfiles hormonales son algo diferentes en esta raza. Esta disminución prolongada de los niveles de progesterona (es decir, la abolición de la ciclicidad de las hembras) puede ser debida a que cuando se utilizan agentes anabólicos, en producción animal, estos pueden actuar inhibiendo la secreción hipofisaria de la hormona luteinizante (LH), como han descrito Wiggins *et al.* (1976); Gettys *et al.* (1984); Cooper (1985). Quizás dentro de los agentes anabólicos utilizados, el acetato de trenbolona puede tener una acción supresora de LH mayor que cuando se utiliza otra serie de anabolizantes. Así, por ejemplo, en los trabajos de Moran. (1990) que estudian el efecto del Zeranol, como agente anabolizante, no es tan grande la inhibición de la secreción de la LH hipofisaria ya que en los animales tratados se produce una disminución de las concentraciones plasmáticas de progesterona, sin que los animales pierdan la ciclicidad.

En definitiva, el acetato de trenbolona produce una alteración del patrón normal de los ciclos estrales, principalmente por una inhibición del crecimiento folicular y, como consecuencia de ello, una alteración de los perfiles de otras hormonas esteroides que tendremos oportunidad de discutir más adelante.

El Gráfico 4 presenta las concentraciones del 17 $\beta$ -estradiol endógeno encontradas en los machos. Las concentraciones halladas en los animales tratados son mucho más altas en los primeros días que las de los animales controles, observándose como de una misma concentración, en la hora 0 ( $2,14 \pm 0,61$  pg/ml), se eleva a más del doble el día 4 del experimento ( $4,31 \pm 0,77$  pg/ml), en el grupo de los tratados. Esta elevación de los niveles de 17 $\beta$ -estradiol en ese grupo persiste hasta el día 8 de nuestra experimentación, siendo en todos los casos significativamente diferente como se puede apreciar en la tabla 16 ( $p < 0,05$ ), incluso en el día 4 de la experimentación

estos niveles se elevan hasta  $4,31 \pm 0,77$  pg/ml, siendo, en este momento, mayor la significación estadística ( $p < 0,001$ ). Luego, a partir del día 10, cuando, como decíamos anteriormente, los principios activos del implante desaparecen en sangre, los perfiles de 17 $\beta$ -estradiol son prácticamente iguales en los tratados que en los controles, aunque en los primeros estos niveles son un poco más altos, incluso en algunos días de la experimentación como son los días 16, 28, 32, 36 y 50, aparecen diferencias significativas estadísticamente entre los dos grupos de animales. Esto parece ser debido a que la esteroidogénesis, en los animales tratados puede haberse alterado al permanecer los niveles de 17 $\beta$ -estradiol tan elevados durante los ocho primeros días que siguieron al implante.

Donde está más marcado el efecto del acetato de trenbolona, es en las hembras tratadas, en las cuales, como vimos anteriormente cuando hablábamos de la progesterona, la ciclicidad de ellas está alterada. La elevación de los niveles plasmáticos de 17 $\beta$ -estradiol está marcada principalmente por un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) de las concentraciones, a partir de las 2 horas de la colocación del implante (Gráfico 5), manteniéndose esta elevación durante todos los días de la experimentación, exceptuando los días 8 y 12 de la misma ( $p > 0,01$ ), si bien estos valores no son muy representativos, ya que al enfrentarlos con los obtenidos en los animales control, es en estos momentos cuando se produce el pico fisiológico de los niveles de 17 $\beta$ -estradiol, necesarios para la rotura folicular y la posterior ovulación por lo que no son estadísticamente significativas las diferencias de concentración entre ambos grupos.

Las tablas 4 y 5 indican los valores medios encontrados en cada uno de los análisis practicados, a lo largo de toda la experimentación.

En los animales control como se observa en el Gráfico 5, sólo aparece un pico marcado de los niveles de 17 $\beta$ -estradiol (día 9), que corresponde con la aparición del celo del segundo ciclo estral. El que no aparezcan los otros dos picos correspondientes a la aparición de los otros ciclos estrales, se debe a que, como se conoce, la elevación de los niveles plasmáticos de 17 $\beta$ -estradiol se produce

aproximadamente en 24 horas y como a partir del día 10 de la experimentación las tomas se realizaron a intervalos superiores a 48 horas, es por esa razón por lo que no se llegan a captar los picos de 17 $\beta$ -estradiol plasmático.

Nuestros hallazgos coinciden con los de Henricks *et al.* (1982) que sugiere que el implante con acetato de trenbolona causa una subida de las concentraciones endógenas de 17 $\beta$ -estradiol, en los dos grupos de animales que dichos autores estudian, apareciendo esta elevación dentro de las primeras 24 horas después de la colocación del implante permaneciendo durante los 60 días de su experimentación. Los valores de concentraciones hallados por estos autores, son ligeramente superiores a los nuestros, esto puede deberse a que la dosis utilizada en el implante (300 mg TBA) era superior a la nuestra (250 mg TBA), siendo también la raza de los animales utilizados de origen desconocido, factor de gran importancia, como ya hemos reseñado anteriormente.

Buttery *et al.* (1978) dan una explicación al mecanismo de acción anabolizante de los andrógenos de una manera directa sobre la fibra muscular, mientras que la acción anabolizante de los estrógenos se daba por alteraciones en la secreción endógena de hormonas tales como la hormona de crecimiento y la insulina. Heitzman *et al.*, (1977) y Galbraith, (1980) utilizando novillos y terneras, respectivamente, no encuentran diferencias estadísticamente significativas por el efecto del TBA sobre la secreción endógena de dichas hormonas, lo que sigue apoyando la teoría de la acción directa de los anabolizantes andrógenicos. Estos hallazgos pueden explicar que los anabolizantes tienen acciones directas sobre la secreción de hormonas tanto esteroides como proteicas (Henricks *et al.*, 1982).

Como conclusión, podemos decir que existe una acción directa del acetato de trenbolona sobre la secreción de 17 $\beta$ -estradiol, pareciendo que el efecto anabolizante de aquella puede ser debido a este incremento.

Estudiando, con detenimiento, los perfiles hormonales de **testosterona** como muestran las Gráficas 6 y 7, podemos observar que el comportamiento entre los machos y las hembras no es el mismo.

En relación a los valores obtenidos en los animales del grupo control, tanto machos como hembras, se observa que las concentraciones de testosterona plasmática se hallan dentro del margen fisiológico señalado por diversos autores para ganado vacuno 0,8 - 11,6 ng/ml (Mc Donald, 1983; Marcus y Durnford, 1986). Sin embargo, estos valores corresponden, principalmente, a la raza Frisona, ya que no se ha encontrado el margen fisiológico de dicha hormona en el cruce limousine x charoles, debido a la escasa bibliografía existente sobre perfiles de hormonas esteroides, en este cruce. De cualquier forma, nuestros resultados están dentro del margen indicado ( $2,38 \pm 0,41$  ;  $7,63 \pm 1,18$  ng/ml).

En los machos tratados, el TBA del implante incrementa la producción de testosterona llegando a alcanzar el día 3 de la experimentación valores de  $12,52 \pm 1,45$  ng/ml, existiendo unas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ), hasta prácticamente el décimo día del experimento, momento éste que coincide con la disminución de los niveles en plasma de trenbolona. Como se aprecia, estos valores son algo superiores a los hallados por otros autores y por nosotros mismos en los animales controles, por lo que podemos decir que la trenbolona, en machos, produce una elevación que supera el margen fisiológico y esto puede llevar consigo, si se pusiera otro implante, a una hipertrofia funcional testicular con las consecuencias que esto puede traer a los animales.

A partir de esta fecha (día 10), no existen diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados y los animales control, siendo éste un argumento más que reafirma la inexistencia de peligro para los consumidores.

Por el contrario, en las hembras (Gráfico 7) la TBA no parece que produzca un incremento significativo en la producción de testosterona durante los primeros días de la experimentación, sino un pico en los días 16 y 18 que alcanza unas

concentraciones, respectivamente, de  $7,91 \pm 0,96$  ng/ml y  $7,03 \pm 0,61$  ng/ml ( $p < 0,01$ ), coincidiendo con el momento en el que ya no se detecta TBA en la sangre. Quizás esto sea debido a un cambio en la aromatización de los esteroides en su biosíntesis, sobre todo en el caso de la producción de esteroides, por el folículo en crecimiento, ya que como describió Silván (1991) existen varios picos de testosterona plasmática durante el ciclo estral de la vaca frisona y estos son coincidentes con las oleadas de crecimiento folicular. Este cambio en la biosíntesis posiblemente, esté producido por la sensibilización previa de las células foliculares productoras de 17 $\beta$ -estradiol (células de la granulosa), ya que como hemos visto anteriormente se producen diferencias significativas (de  $p < 0,05$  a  $p < 0,001$ ) entre las hembras control y tratadas, a lo largo de casi toda la experimentación, y esto parece llevar consigo esa elevación en los niveles de testosterona en las hembras tratadas, ya que también como se ve en la tabla 17, justo antes de producirse la elevación de testosterona, se aprecia una elevación significativa ( $p < 0,001$ ) en los niveles de 17 $\beta$ -estradiol de las hembras tratadas.

Asímismo, este cambio en la biosíntesis de 17 $\beta$ -estradiol, por las células de la granulosa, está relacionado por un aumento en la actividad enzimática de las aromatasas, posiblemente influenciadas por una mayor síntesis de LH y FSH a nivel hipofisario. Este aumento en la actividad enzimática, se traduce en un incremento de la síntesis de 17 $\beta$ -estradiol y como éste, en el ovario de la vaca, es el precursor de testosterona, se producirá un aumento de la síntesis de esta hormona, en las hembras tratadas (Ireland, 1987).

Otra explicación, a la aparición de este pico de testosterona, es que puede deberse a un efecto rebote, ya que el TBA inhibe la secreción de testosterona (Hunt *et al.*, 1991) y, al desaparecer el TBA sobre el décimo día, provoca un aumento de testosterona, observándose ésto, sólo en las hembras.

Estos resultados nos sugieren que en los machos el aumento de peso producido por la administración del TBA podría deberse al efecto directo de éste y/o a un efecto indirecto al incrementarse los niveles de testosterona.



En las hembras, por el contrario, el TBA no produce un incremento en los valores de testosterona, sin embargo la ganancia de peso en las hembras es mayor que en los machos, lo que nos sugiere que la acción anabolizante del TBA se realiza fundamentalmente por vía directa (Buttery *et al.*, 1978), ya que este esteroide sintético es un potente anabolizante de tipo androgénico, pero de potencia superior -del orden de 10 a 50 veces- a la testosterona, en su actividad anabolizante (Neumann, 1976).

También esto se podría explicar por una competencia, a nivel de receptor del TBA, con la testosterona, de tal manera que un incremento en los niveles de testosterona disminuye el efecto anabolizante de la trenbolona, aunque para demostrar esta hipótesis es necesaria una mayor investigación funcional de los receptores hormonales a nivel celular.

El aumento de testosterona en los machos no coincide con los resultados de Hunt (1991), que describe la disminución de los niveles de testosterona producidos por el tratamiento con TBA. Pero, estas discrepancias pueden ser sólo aparentes, ya que Hunt (1991) también observa un aumento de testosterona en terneros, en el primer periodo de su tratamiento, periodo que coincide con el que nosotros hemos estudiado, por lo que nuestros resultados coinciden con los por él descritos.

Lee *et al.* (1990), también describen una disminución en los niveles de testosterona, producidos por el tratamiento con TBA, pero esta disminución de testosterona la miden en machos adultos, no siendo capaces de detectar niveles basales de testosterona en terneros, pues su método (RIA), para la detección de testosterona en terneros es menos sensible en el caso de estos autores que el nuestro (ELISA). Es por ello que nosotros sí somos capaces de efectuar la medición de dichos niveles de testosterona en los terneros, y sus resultados en machos adultos no son extrapolables a los animales jóvenes.

En definitiva, la administración de trenbolona produce un aumento marcado de los niveles de testosterona en machos implantados, niveles que coinciden con los

de los controles cuando desaparece el efecto del implante.

En los gráficos 8 y 9 se encuentran representados los perfiles de cortisol plasmático para machos y hembras, a lo largo de los 50 días de la experimentación. Asimismo, en las tablas 8 y 9 se indican las concentraciones plasmáticas (media  $\pm$  S.E.M.) de cortisol durante el estudio.

Se puede apreciar que nuestros valores de referencia: la toma 0 (de los animales tratados) y todos los valores de los animales control, se encuentran dentro del margen fisiológico señalado por los distintos autores, para ganado vacuno (0,5 a 10 ng/ml), (Mc Donald, 1980; Lewis y Elder, 1985; Jones *et al.*, 1988), aunque las concentraciones en las hembras son siempre mayores que en los machos (Henricks *et al.*, 1984), esto quizá se debe a una mayor sensibilización y/o producción en las hembras, por parte de la glándula adrenal, de este corticoesteroide ya que en hembras el manejo es más difícil y estas son más nerviosas que los machos.

Como se puede observar en estas gráficas, es muy parecida la acción que ejerce el acetato de trenbolona, sobre los perfiles de cortisol tanto en machos como en hembras, produciéndose un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ) de los niveles de esta hormona hasta el día 10 de la experimentación, día éste que coincide con la desaparición también de los niveles de trenbolona en plasma. Las diferencias que existen son: en las hembras esta elevación comienza a las 2 horas de ponerse el implante y, sin embargo, en los machos es a partir de las 24 horas (toma 4) cuando se produce este aumento. Esto viene a significar que las hembras son más sensibles al implante con TBA, ya que nada más comenzar la reabsorción de éste, los niveles de cortisol plasmático se elevan ( $p < 0,01$ ).

Esta elevación de las concentraciones de cortisol se deben principalmente a una disminución de la síntesis de progesterona (Gráfico 3) en la superficie lisa del retículo endoplasmático. Al estar los niveles plasmáticos de progesterona disminuidos en las hembras tratadas, hay un cambio en la vía de síntesis del cortisol, provocando un aumento en la actividad enzimática de la  $11\alpha$ -hidroxilasa con lo que se produce una

elevación de la producción de 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona, dando como resultado un incremento de la síntesis de cortisol, en las hembras, alcanzando unos valores de 12,52  $\pm$  6,54 ng/ml, en el día tercero de la experimentación (valores dentro del margen fisiológico citado).

Sin embargo, en los machos la elevación de los niveles de cortisol plasmático, (12,43  $\pm$  4,52 ng/ml) se debe principalmente a un aumento en las concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol (Gráfico 4) ya que como indican Nanda *et al.* (1990), al producirse un aumento de este esteroide, se produce un incremento significativo de las concentraciones de cortisol debido a que la elevación significativa de 17 $\beta$ -estradiol produce una sensibilización de la hipófisis ocasionando una mayor liberación de LH, lo que, posiblemente, origina un incremento de síntesis de cortisol en la glándula adrenal. Nuestros resultados coinciden con los de los citados autores, al presentar los animales tratados con TBA una elevación significativa ( $p < 0,001$ ) de los niveles de cortisol (gráfico 8), durante los 10 primeros días después del implante, así con la elevación ya comentada de los niveles de 17 $\beta$ -estradiol (Gráfico 5).

Sin embargo, estos resultados no son encontrados por otros autores (Jones *et al.*, 1988; Thomas and Rodway., 1982; Bukosky *et al.*, 1986), que observan una reducción de los niveles de cortisol plasmático, debidos al tratamiento con TBA, en favor de la hipótesis que el TBA actúa a nivel de receptor del glucocorticoide no dejando actuar a éste.

En conclusión, en los animales tratados con TBA, se produce un aumento de las concentraciones plasmáticas de cortisol, coincidentes con los niveles detectables de trenbolona en plasma, es decir hasta el día 10 de la experimentación, no observándose, a partir de dicha fecha, diferencias estadísticamente significativas, tanto en machos como en hembras.

Aunque el objetivo principal de nuestro trabajo está enfocado fundamentalmente hacia las variaciones de las hormonas esteroideas, hemos analizado

también las de concentración de las hormonas tiroideas tri-iodotironina ( $T_3$ ) y tiroxina ( $T_4$ ), ya que como se sabe desde hace un tiempo considerable se vienen utilizando sustancias antitiroideas como finalizadores de cebo de ganado vacuno y aunque los mecanismos de acción de estos finalizadores no tengan nada que ver con los de los anabolizantes, nos pareció oportuno el tener unos datos más por si arrojaban alguna conclusión no descrita en el esclarecimiento de la detección de tratamientos prohibidos en las reses.

Siguiendo la tecnología descrita en el apartado de material y métodos se han determinado los niveles de tri-iodotironina, tiroxina y hormona estimulante de la tiroides, en las muestras de plasma disponibles.

Nos pareció un tema novedoso el cual trataremos a continuación, la posible influencia, que el tratamiento con acetato de trenbolona podría tener sobre los perfiles plasmáticos de las hormonas tiroideas debido a la escasa bibliografía existente sobre dichas hormonas en el ganado vacuno.

Por lo que se refiere a la tri-iodotironina se aprecian unas claras diferencias entre el perfil de concentraciones plasmáticas entre machos y hembras y así en estas existen pequeñas diferencias (Gráfica 11) entre las concentraciones de los animales tratados y controles, incluso en algunos puntos los valores son exactamente iguales, igualdad que se acentúa en los valores siguientes al día 10 de tratamiento, cuando, como ya hemos dicho reiteradamente, han desaparecido las acciones del implante.

Sin embargo las concentraciones de  $T_3$  en los machos (Gráfica 10) son claramente diferentes a lo largo de todo el periodo de estudio, solamente hay un punto coincidente, el día 10 del tratamiento y curiosamente los valores plasmáticos que alcanzan los tratados llegan casi a doblar la de los controles.

Como se sabe, la glándula tiroides, está gobernada por la hormona estimulante de la tiroides (TSH), producida en las células hipofisarias, que pueden ver alterada su capacidad de síntesis por otras hormonas como son la ACTH y las gonadotropinas,

así si contemplamos las Gráficas 14 y 15 que nos muestran las concentraciones de TSH en machos y hembras respectivamente, vemos que no hay diferencia aparente en la secreción de esta hormona por variar el sexo en los animales control, sin embargo, cuando se trata de las curvas obtenidas en los animales tratados hay unas claras diferencias entre machos y hembras, en aquellos parece que la acción del acetato de trenbolona hace desaparecer el ritmo circantrigintano (30 días) que presenta la secreción de esta hormona en los animales controles, hecho no descrito en la literatura aunque se ha hablado de otros tipos de ritmos para hormonas hipofisarias. En las hembras, como queda dicho, no aparecen esas diferencias tan acusadas, lo que sin duda puede deberse a otras diferencias encontradas que han sido discutidas anteriormente.

Por último y en lo referente a las concentraciones de tiroxina solo hay diferencias en los machos. Las hembras (Gráfico 13) presentan unas curvas de concentraciones prácticamente paralelas con valores más bajos durante los 10 primeros días del estudio, posiblemente debido a la persistencia de niveles plasmáticos del TBA. Sin embargo, en los machos, las diferencias son notables y contrarias a lo descrito en los niveles de tri-iodotironina, esto es los valores de  $T_4$  en los controles está por encima de los tratados, lo que sin duda es porque en los machos la facilidad de conversión de la tiroxina, en la hormona activa  $T_3$  es mucho más acentuada en los animales tratados de ahí los niveles de esta última hormona.

Concluimos diciendo que los implantes de TBA afectan a la capacidad de síntesis y secreción de las hormonas tiroideas en los machos pero no en las hembras, lo que podría explicar que las hembras ganan más peso que los machos ya que tendrían un metabolismo basal inferior y por tanto un consumo calórico menor.

# **CONCLUSIONES**

Una vez analizados los resultados obtenidos en nuestro estudio podemos deducir de ellos las siguientes conclusiones:

**1ª CONCLUSION:** Se aportan datos, hasta ahora inéditos, de la cinética del acetato de trenbolona tras su aplicación por implante en el ganado vacuno.

**2ª CONCLUSION:** El ELISA de competición, con las modificaciones aportadas, es la técnica más sensible (que el HPLC, ELISA Kit), para medir las concentraciones plasmáticas de trenbolona.

**3ª CONCLUSION:** El implante con acetato de trenbolona afecta notablemente la esteroidogénesis en los machos, produciéndose un aumento de los niveles plasmáticos de 17 $\beta$ -estradiol, testosterona y cortisol, mientras hay niveles de trenbolona en plasma.

**4ª CONCLUSION:** La aplicación del acetato de trenbolona produce en las hembras un anestro, con lo que los perfiles de hormonas esteroides se encuentran distintos a los fisiológicos.

**5ª CONCLUSION:** El acetato de trenbolona produce en los machos un cambio en la ciclicidad de la secreción de TSH que presenta un ciclo circatrigintano (30 días), y como consecuencia las concentraciones de las hormonas tiroideas T3 y T4 presentan perfiles diferentes a los fisiológicos.

**CONCLUSION FINAL:** Las modificaciones, que de los perfiles de hormonas esteroides, produce el acetato de trenbolona sólo se manifiestan durante los días que persisten las concentraciones de la misma en sangre.



# **BIBLIOGRAFIA**

ABEYAWARDENE, S.A. y G.S. POPE.- The involvement of progesterone and luteinizing hormone in the termination of the post-ovulatory rise in plasma oestradiol-17 $\beta$  concentration in cattle.

*Anim. Reprod. Sci.* **15**: 27-36, 1987.

ABRAHAM, G.E.- Solid phase radioimmunoassay of estradiol-17 $\beta$ .

*J. Clin. Endocr. Metab.* **29**: 866-870, 1969.

ABRAHAM, G.E.- Radioimmunoassay of steroids in biological fluids.

*J. Steroid Biochem.* **6**: 261-270, 1975.

ABUKNESHA, R. y D. EXLEY.- Design and development of estradiol-17 $\beta$  enzyme-immunoassay. En: *Enzyme Labelled Immunoassay of Hormones and Drugs*, editado por S.B. Pal. Walter de Gruyter & Co. Berlin - New York, 1978, p: 139-152.

AINSLIE, S.J., D.G. FOX y T.C. PERRY.- Management systems for holstein steers that utilize alfalfa silage and improve carcass value.

*J. Anim. Sci.* **70**: 2643-2651, 1992.

AMENTA, J.S., M.J. SARGUS y F.M. BACCINO.- Effect of microtubular or translational inhibitions on general cell protein degradation. Evidence for a dual catabolic pathway.

*Biochem. J.* **168**: 223-227, 1977.

ANREIEU, J.M., S. MAMAS y F. DRAY.- Viroimmunoassay of steroids. En: *Steroid immunoassay*, editado por A.H.D. Cameron, S.G. Hillier y K. Griffiths. Alpha Omega Publishers. Cardiff, 1975, p: 189-198.

BAILE, C.A. y J.M. FORBES.- Control of feed intake and regulation of energy balance in ruminants.

*Physiol. Rev.* **54**: 160-214, 1974.

BALLARD, F.J.- En: Assays in Biochemistry, Vol 13, editado por P.N. Campbell, y W.N. Aldridge, Academic Press, London y New York, 1977, p: 1-39.

BAULIEU, E.E.- Some aspects of mechanism of action of steroid hormones.

*Moll. Cell. Biochem.* **7**: 157-174, 1975.

BERANGER, C. y C. MALTERRE.- Influence of a trienic steroid with anabolic activity on weight gain in dry milk cows.

*Comptes Rendus des Seances de la Socite de Biologie et de Sesfiliales* **162**: 1157-1164, 1968.

BEST, J.M.- The use of trienbolone acetate implant in heifers beef production at pasture.

*Vet. Rec.* **91**: 624-626, 1972.

BLAKE, C. y B.J. GOULD.- Use of enzymes in immunoassay techniques. A review.

*Analyst* **109**: 533-547, 1984.

BLASS, A.- Perfiles hormonales de progesterona durante el ciclo estral en ganado Limousine. Tesina. U.C.M., 1992.

BLOBEL, G. y B. DOBBERSTEIN.- Transfer of the proteins across membrane. I . Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma.

*J. Cell Biol.* **67**: 835-851, 1975.

BLOCH, K.- The biological synthesis of cholesterol.

*Science* 150: 19-23, 1965.

BOUFFAULT, J.C., y J.C. WILLEMART.- Activité anabolisante de L'acetate de trenbolone seul ou associé á des oestrogènes. Working Paper of O.I.E. Symposium on Anabolics in Animal Production. Paris, 1983, p: 77-105.

BRAY, G.A.- Endocrine factors in the modulation of food intake.

*Proc. Nutr. Soc.* 37: 301-309, 1978.

BREUER, C.B. y J.R.FLORINI.- Amino acid incorporation into protein by cell- free systems from rat skeletal muscle. IV. Effects of animal age, androgens, and anabolic agents on activity of muscle ribosomas.

*Biochemistry* 4: 1544-1550, 1965.

BREUER, C.B. y J.R.FLORINI.- Amino acid incorporation into protein by cell- free systems from rat skeletal muscle. V. Effects of anabolic agents on activity of muscle ribosomas.

*Biochemistry* 5: 3857-3865, 1966.

BROBECK, J.R.- Control de la función tiroidea. En: Bases fisiológicas de la práctica médica, editado por Williams y Wilkins. Baltimore/London: Med. Panamericana, 1982 p: 1009-1013.

BUKOSKY, H.P., R.H. MARS, S.A. ZINN y R.A. MERKEL.- Effects of testosterone on cortisol production in porcine adrenal gland slices in vitro.

*J. Anim. Sci.* 63 (Suppl. 1): 216, 1986.

- BURRELS, C. y A.McL. DAWSON.- ELISA methodology: variations in technical procedures. En: *The Elisa: Enzyme-linked immunosorbent assay in veterinary research and diagnosis*, editado por R.C. Wardley y J.R. Crowther. Martinus Nijhoff Publishers. The Hague/Boston/London, 1982.
- BURRIS, M.J., R. BOGART y A.W. OLIVER.- Alterations of daily gain, feed efficiency and carcass characteristics in beef cattle with male hormones. *J. Anim. Sci.* **12**: 652-658, 1953.
- BUTTERY, P.J., B.G. VERNON, y J.T. PEARSON.- Protein turnover and whole body nitrogen metabolism in growing. *Proc. Nutr. Soc.* **37**: 311-315, 1978.
- BUTTERY, P.J., B.G. VERNON y J.T. PEARSON.- Anabolic agents- Some thoughts on their mode of action. *Proc. Nutr. Soc.* **37**: 311-318, 1978.
- CAVALERI, R.R. y P. RIVERS.- The effects of drugs on the distribution and metabolism of thyroid hormones. *Pharmacol. Rev.* **33**: 55-80, 1981.
- CHAN, K.H, R.J. HEITZMAN y B.A. KITCHENHAM.- Digestibility and N-balance studies on growing heifers implanted with trienbolone acetate. *Brit. Vet. J.* **131**: 170-174, 1975.
- CHAN, L. y B.W. O'MALLEY.- Steroid hormone action: recent advances. *Ann. Int. Med.* **89**: 694-701, 1978.
- CLARK, B.R. y E. ENGVALL.- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): theoretical and practical aspect. En: *Enzyme-immunoassay*, editado por E.T. Maggio. CRC Press. Boca Ratón, Florida, 1980, p: 167-196.

CLEGG, M.T., y H.H. COLE.- The action of stilbestrol on growth response on ruminants.

*J. Anim. Sci.* 13: 108-130, 1954.

COELHO, J.F.S., H. GALBRAITH y J. H. TOPPS.- The effect of a combination of trenbolone acetate and oestradiol-17 $\beta$  on growth performance and blood, carcass and body characteristics of wether lambs.

*Anim. Prod.* 32: 261-266, 1978.

COLL, J.M.- Development of a fast solid-phase enzyme immunoassay for C-reactive protein.

*Rev. Esp. Fisiol.* 44: 359-368, 1988.

COOPER, R.A.- Some aspects of the use of the growth promoter zeranol in ewe lambs retained for breeding. Effect on plasma LH levels.

*Br. Vet. J.* 141: 424-426, 1985.

DHAR, T.K., A.K. SAMANTA y E. ALI.- Homogeneous enzyme immunoassay of estradiol using estradiol-3-O-Carboxymethyl ether as hapten.

*Steroids* 51: 519-526, 1988.

DE BOEVER, J.F. KOHEN y D. VANDENKERCKOWE.- Solid-phase chemiluminiscence immunoassay for plasma estradiol-17 $\beta$  during gonadotrophin therapy compared with two radioimmunoassays.

*Clin. Chem.* 29: 2068-2072, 1983.

DE BOEVER, J.F. KOHEN, D. VANDENKERCKOWE y A. VAN MAEDE.- Solid-phase chemiluminiscence immunoassay for progesterone in unrestricted serum.

*Clin. Chem.* 30: 1637-1641, 1984.

- DE BOEVER, J.F., F. KOHEN, D. VANDENKERCKOWE, C. USANACHITT, D. LEYSEELE y L. VANDEWALLE.- Direct chemiluminiscence immunoassay for estradiol in serum.  
*Clin. Chem.* 32: 1895-1900, 1986.
- DE NAVER, P., y G. VASSART.- Structure and biosynthesis of thyroglobulin. En: *The Thyroid Gland*, editado por M. De Visscher. Raven Press, Nueva York, 1980, p: 21-37.
- DIELEMAN, S.J., M.M. BEVERS, J. POORTMAN y H.T.M. VAN TOOL.- Steroid and pituitary hormone concentrations in the fluid of preovulatory bovine follicles relative to the peak of LH in the peripheral blood.  
*J. Reprod. Fertil.* 69: 641-649, 1983.
- DIELEMAN, S.J., M.M. BEVERS, H.T.M. VAN TOOL y A.H. WILLEMSE.- Peripheral plasma concentrations of oestradiol, progesterone, cortisol, LH and prolactin during the oestrus cycle in the cow, with emphasys on the perioestrus period.  
*Anim. Reprod. Sci.* 10: 275-292, 1986.
- DIONNE, F.T., R.L. LEASAGE, J.V. DUDE, y R.R. TREMBLAY.- Androgen binding proteins in rat skeletal and perineal muscles: In vitro and in vivo studies.  
*J. Steroid Biochem.* 11: 1073, 1979.
- DOBSON, H.- Plasma gonadotropins and oestradiol during oestrus in the cow.  
*J. Reprod. Fert.* 52: 51-53, 1978.
- DOBSON, H. y M. KAMONPATANA.- A review of female cattle reproduction with special reference to a comparison between buffaloes, cows and zebu.  
*J. Reprod. Fert.* 77: 1-36, 1986.

DORRIGTON, J.H. y D.T. ARMSTRONG.- FSH stimulates estradiol-17 $\beta$  synthesis in cultured Sertoli cells.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 2677, 1975.

DRAY, F., J.M. ANDRIEU y F. RENAUD.- Enzyme immunoassay of progesterone at the picogram level using  $\beta$ -galactosidase as label.

*Biochem. Biophys. Acta* **403**: 131-138, 1975.

DUBE, J.Y., R. LESAGE y R.R. TREMBLAY.- Androgen and estrogen binding in rat skeletal and perineal muscles.

*J. Biochem.* **54**: 50-55, 1976.

DUFAU M.L., J. VELDHUIS, F. FRAIOLI, M.H. JOHNSON y K.J. CATT.- Mode of bioactive LH secretion in man.

*J. Clin. Metab.* **57**: 993-998, 1983.

EIK-NES, K.B. y P.F. HALL.- Secretion of steroid hormones in vivo.

*Vitam. Horm.* **23**: 153-171, 1965.

EKMAN, P., U. HERMANSSON, G. BERGSTROM, y L. ENGSTROM.- Rapid proteolytic removal of phosphopeptides and phosphorylatable sites from proteins in rat liver cell sap.

*Fedn. Biochem. Soc. Letts.* **86**: 250-254, 1978.

ENGVALL, E. y P. PERLMANN.- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.

*Immunochemistry* **8**: 871-874, 1971.

ENGVALL, E. y P. PERLMANN.- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled antiimmunoglobulin in antigen coated tubes.

*J. Immunol.* **109**: 129-135, 1972.



- ENGVALL, E.- Enzyme-Immunoassay ELISA and EMIT.  
*Methods in Enzymology* 70: 419-439, 1980.
- ENGVALL, E. y I. LJUNGSTROM.- Detection of human antibodies to *Trichinella spiralis* by enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA.  
*Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C* 83: 231-237, 1975.
- ESTEBAN, R.- Influencia de la lidia en los perfiles hormonales plasmáticos de cortisol y testosterona en toros y novillos. Tesina. U.C.M., 1992.
- FLAIM, K.E., J.B. LI y L.S. JEFFERSON.- Protein turnover in rat skeletal muscle: effect of hypophysectomy and growth hormone.  
*Am. J. Physiol.* 234: E38-E43, 1978
- GALBRAITH, H. y H.B. WATSON.- Performance blood and carcass characteristics of finishing steer treated with trenbolone acetate and hexoestrol.  
*Vet. Rec.* 103: 28-39, 1978.
- GALBRAITH, H.- The effect of trenbolone acetate on growth, blood hormones and metabolites and nitrogen balance of beef heifers.  
*Anim. Prod.* 30: 389-394, 1980.
- GARVERICK, H.A., R.E. ERB, G.D. NISWENDER y C.J. CALLAHAN.- Reproductive steroids in bovine. III. Changes during the estrous cycle.  
*J. Anim. Sci.* 32: 946-956, 1971.
- GETTYS, T.W., M.J.D. OCCHIO, C.M. HENRICKS y B.D. SCHANBACHER.- Suppression of LH secretion by oestradiol, dihydrotestosterone and trenbolone acetate in the acutely castrated bull.  
*J. Endocrinol.* 100: 107-112, 1984.

- GRANDADAM, J.A., J.P. SCHEID, A. JOBARD, H. DREUX y J.M. BOISSOM.-  
Results obtained with trenbolone acetate in conjunction with estradiol-17 $\beta$  in  
veal calves, feedlot bulls, lambs and pigs.  
*J. Anim. Sci.* 41: 969-977, 1975.
- GRANNER, D.K.- En: *Glucorticoid Hormone Action*, editado por, J.D. Baxter y G.G.  
Rousseau. Springer- Verlag, Berlin, 1979, p: 593-611.
- GROPP, J., E. BOEHNCKE, V. SCHULZ, J. SANDERSLEBEN, O. GIESEL, UND  
T. HÄNICHEN.- Die wirkung von 17 $\beta$ -estradiol und trebolonacetat in untren-  
schiedlicher dosierung auf verschiedene physiologische und morphologische  
parameter (provokationsversuch). En: *Fortschritte in der tierphysiologie und  
tierernahrung. Behiefte zur Z. für Tierphysiologie Tierernahrung und  
Futtermittelkunde* 6: 33-52, 1975.
- GUTIERREZ-HARTMANN, A. y J.D. BAXTER.- Differential ability of various  
plasmoid DNAs to requester inhibitors of RNA polymerase III transcription.  
*DNA* 6: 231-237, 1987.
- GUYTON, A.C.- Hormonas tiroideas. En: *Fisiología Médica*, editado por A.C.  
Guyton. Madrid: EMALSA, 1983, p: 1101-1114.
- GUYTON, A.C.- Metabolismo de las proteínas. En: *Tratado de Fisiología Médica*,  
editado por Mc Graw Hill. Madrid, 1988, p: 822-827
- HALL, P.F.- Testicular steroid synthesis: organization and regulation. En: *The  
Physiology of Reproduction*, editado por E. Knobil y J.D. Neill. New York:  
Raven Press, 1988, p: 975-998.
- HANSEL, W. y S.E. ECHTERNKAMP.- Control of ovarian function in domestic  
animals.  
*Amer. Zool.* 12: 225-229, 1972.

HANSEL, W. y E.M. CONVEY.- Physiology of the oestrus cycle.

*J. Anim. Sci.* **57** (Suppl. 2): 404-424, 1983.

HEITZMAN, R.J. y K.H. CHAN.- Alterations in weight gain and levels of plasma metabolites, proteins, insulin and free fatty acids following implantation of and anabolic steroid in heifers.

*Brit. Vet. J.* **130**: 532-537, 1974.

HEITZMAN, R.J., G. OETTEL y B. HOFFMANN.- The determination by radioimmunoassay of residues of an anabolic steroid in tissues of calves treated with a combined preparation of trenbolone acetate and oestradiol-17 $\beta$ .

*J. Endocrinol.* **69**: 10-21, 1976.

HEITZMAN, R.J.- En: Anabolic Agents in Animal Production, Suppl V, editado por F. Coulston y F. Corte. Thieme, Stuttgart, 1976, p: 89-98.

HEITZMAN, R.J. y D.J. HARWOOD.- Residue levels of trenbolone and oestradiol-17 $\beta$  in plasma and tissues of steers implanted with anabolic steroid preparations.

*J. Brit. Vet.* **133**: 564-571, 1977.

HEITZMAN, R.J., D.J. HARWOOD y C.B. MALLINSON.- The effect of an anabolic steroid, trenbolone acetate, on oestrus cycling in dairy cows.

*Acta Endocrinol.* **85**: 212-259, 1977.

HEITZMAN, R.J., K.H. CHAN y I.C. HART.- Liveweight gains, blood levels of metabolites, proteins and hormones following implantation of anabolic agents in steers.

*Brit. Vet. J.* **133**: 62-70, 1977.

- HEITZMAN, R.J., D.J. HARWOOD, R.D. KAY, W. LITTLE, C.B. MALLINSON y I.P. REYNOLDS.- Effects of implanting prepuberal dairy heifers with anabolic steroids on hormonal status, puberty and parturition.  
*J. Anim. Sci.* **48**: 859-866, 1979.
- HEITZMAN, R.J.- The efficacy and mechanism of action of anabolic agents as growth promoters in farm animals.  
*J. Steroid Biochem.* **11**: 927-930, 1979.
- HENRICKS, D.M., R.L. EDWARDS, K.A. CHAMPE, T.W. GETTYS, G.C. SKELLEY, Jr y T. GIMENEZ.- Trenbolone, estradiol-17 $\beta$  and estrone levels in plasma and tissues and live weight gains of heifers implanted with trenbolone acetate.  
*J. Anim. Sci.* **55**: 1048-1056, 1982.
- HENRICKS, D.M., J.W. COOPER, J.C. SPITZER y L.W. GRIMES.- Sex differences in plasma cortisol and growth in the bovine.  
*J. Anim. Sci.* **59**: 376-387, 1984.
- HENRICKS, D.M., T. GIMENEZ, T.W. GETTYS y B.D. SCHANBACHER.- Effect of castration and an anabolic implant on growth and serum hormones in cattle.  
*Anim. Prod.* **46**: 35-41, 1988.
- HENSHAW, E.C.- En: *Molecular Biology of Gene Expression*, editado por M.J. Clemens. CRC Press, Boca Ratón, Florida, 1980.
- HILLIER, A.P.- Human thyroxine-binding globulin and thyroxine-binding prealbumin: dissociation rates.  
*J. Physiol.* **217**: 625-634, 1971.

HILLIER, A.P.- The rate of triiodothyronine dissociation from binding sites in human plasma.

*Acta Endocrinol.* **80**: 49-57, 1975.

HIRSCH, C.A.- Quantitative determination of ribosomal ribonucleic acid content of liver and Novikoff hepatoma from fed and from fasted rats.

*J. Biol. Chem.* **242**: 2822-2827, 1967.

HOFFMANN, B., H. KARG, K. VOGT y H.J. KYREIN.- En: Forschungsbereich der DFG. Rückstände in Fleisch und Fleischerzeugnissen, Harald Boldt, Boppard, 1975, p: 32-59.

HOFFMANN, B. y H. KARG.- Metabolic fate of anabolic agents in treated animals and residue levels in their in meat. En: environmental quality and safety, editado por, F. Coulston y F. Corte. Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 1976, p: 131-181.

HOFFMANN, B. y G. OETTEL.- Radioimmunoassays for free and conjugated trenbolone acetate in bovine tissue and plasma samples.

*Steroids.* **27**: 509-523, 1976.

HOFFMANN, B. y E. RATTENBERGER.- Testosterone concentrations in tissue from veal calves, bulls and heifers in milk samples.

*J. Anim. Sci.* **46**: 634, 1977.

HOFFMANN, B.- Use of radioimmunoassay (RIA) for monitoring hormonal residues in edible animal products. Symposium on drug residues in animal tissues.

*J. Ass. Off. Anal. Chem.* **61**: 1263-1273, 1978.

HOFFMANN, B.- Some implications of the use of anabolic agents. En: Protein deposition in animals, editado por P.J. Buttery y D.B. Lindsay. London, Boston, 1980, p: 205-214.

HOFFMANN, B.- Natural occurrence of steroid hormones in food producing animals  
En: Anabolics in animal production, Symposium OIE Paris, febrero, 1983, p:  
215-231.

HUNT, D.W., D.M. HENRICKS, G.C. SKELLEY y L.W. GRIMES.- Use of  
trenbolone acetate and estradiol in intact and castrate male cattle: effects on  
growth, serum hormones, and carcass characteristics.  
*J. Anim. Sci.* **69**: 2552-2462, 1991.

ILLERA, M.- Glándula tiroides. En: Endocrinología Veterinaria y Fisiología de la  
Reproducción, editado por M. Illera. Colibac, Madrid, 1984, p: 62-67.

ILLERA, M.- Glandulas Adrenales. Testículo y Sistema Reprodutor Masculino En:  
Endocrinología Veterinaria y Fisiología de la Reproducción, editado por M.  
Illera. Colibac, Madrid, 1984, p: 146-183, 209-233.

ILLERA, M., J.C. ILLERA y G. SILVAN.- The anabolic agents, natural and synthetic  
and the animal productions. XXIII World Veterinary Congress. Montreal,  
Canadá, 107, 1987.

ILLERA, M., J.C. ILLERA, G. SILVAN y M.J. ILLERA.- Endocrine control of meat  
production and its possible modifications. XXIV World Veterinary Congress.  
Río de Janeiro, Brasil, 28, 1991.

IRELAND, J.J. y J.F. ROCHE.- Development of antral follicles in cattle after  
prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in  
follicular fluid, and gonadotrophin receptors.  
*Endocrinology* **111**: 2077-2086, 1982.

IRELAND, J.J., R.L. FOGWELL, W.D. OXENDER, K. AMES y J.L. COWLEY.-  
Production of oestradiol by each during the estrous cycle of cows.  
*J. Anim. Sci.* **59**: 764-771, 1984.

IRELAND, J.J. y J.F. ROCHE.- Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. En: Follicular growth and ovulation rate in farm animals, editado por J.F. Roche y D. O'Callaghan. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht/Boston/Lancaster, 1987, p: 1-18.

IRELAND, J.J.- Control of follicular growth and development.  
*J. Reprod. Fert. Suppl* **34**: 39-54, 1987.

JAMES, V.H.T.- The adrenal gland. New York: Raven Press, 1979.

JEFFERSON, L.S., D.E. RANNELS, B.L. MUNGER y H.E. MORGAN.- Insulin in the regulation of protein turnover in heart and skeletal muscle.  
*Fedn. Proc.* **33**: 1098-1104, 1974.

JONES, S.J., C. CALKINS, R. JOHNSON y M. DIKEMAN.- The effects of trenbolone acetate on cortisol release and growth in steers and bulls.  
*MP. Univ. Neb. Agric. Exp. Stn.* **53**: 77-79, 1988.

JONES, S.J., R.D. JOHNSON, C.R. CALKINS y M.E. DIKEMAN.- Effects of trenbolone acetate on carcass characteristics and serum testosterone and cortisol concentrations in bulls and steers on different management and implant schemes.  
*J. Anim. Sci.* **69**: 1363-1369, 1991.

JOUQUEY, A., M. MOUREN, J. SALMON.- Analytical methods for trenbolone. Symposium OIE Paris, febrero, 1983, p: 423-441.

KARG, H. y K. VOGT.- Control of hormone treatment in animals and residues in meat--regulatory aspects and approaches in methodology.  
*J. Ass. Off. Anal. Chem.* **61**: 1201-1208, 1978.

KESNER, J.S., E.M. CONVEY y C.R. ANDERSON.- Evidence that estradiol induces the preovulatory LH surge in cattle by increasing pituitary sensitivity to LHRH and then increasing LHRH release.

*Endocrinology* **108**: 1386-1390, 1981.

KLOSTERMAN, E.W., V.R. CAHILL, L.E. KUNKLE y A.L. MOXON.- The subcutaneous implantation to estilbestrol in fattening bulls and steers.

*J. Anim. Sci.* **14**: 1050-1058, 1955.

KNOWLES, S.E. y F.J. BALLARD.- Selective control of the degradation of normal aberrant proteins in Reuber H35 hepatoma cells.

*Biochem. J.* **156**: 609-617, 1976.

KOCHAKIAN, C.D., C. TILLOTSON, y G. ENDAHL.- Castration and the growth of muscles in rat.

*Endocrinology* **58**: 231, 1956.

KOHEN, F., Z. HOLLANDER, R.J. CARRICO y R.C. BOGULASKY.- A homogeneous enzyme-immunoassay for estriol monitored by co-enzymic cyclic reactions. En: *Enzyme Labelled Immunoassay of Hormones and Drugs*, editado por S.B. Pal Walter de Gruyter. Berlín, New York, 1978, p: 67-80.

KRIEG, M.- Characterization of the androgen receptor in the skeletal muscle of the rat.

*Steroids* **28**: 261-274, 1976

LAMO, A.- La Saucedilla, ganadería de vacuno Limousine.

*Mundo Ganadero* **8**: 18-20, 1990.



LEE, C.Y., D.M. HENRICKS, G.C. SKELLEY y L.W. GRIMES.- Growth and hormonal response of intact and castrate male cattle to trenbolone acetate and estradiol.

*J. Anim. Sci.* **68**: 2682-2689, 1990.

LEWIS, J.C. y P.N. ELDER.- An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma cortisol.

*J. Steroid. Biochem.* **22**: 673-676, 1985.

LI, J.B., J.E. HIGGINS y L.S. JEFFERSON.- Changes in protein turnover in skeletal muscle in response to fastening.

*Am. J. Physiol.* **236**: E22-E228, 1979.

LOEB, J.N.- Corticosteroid and growth.

*New. Engl. J. Med.* **295**: 547-522, 1976.

LU, F.C. y J. RENDEL.- En: *Anabolic Agents in Animal Production*, editado por F. Coulston y F. Corte. Thime, Stuttgart, 1976, p: 75-78.

MAGGIO, E.T.- Enzymes as immunochemical labels. En: *Enzyme-Immunoassay*, editado por E.T. Maggio. CRC Press Inc. Boca Ratón, Florida, 1980, p: 53-70.

MAGGIO, E.T.- Enzyme-Immunoassay. En: *Enzyme-Immunoassay*, editado por E.T. Maggio. CRC Press. Boca Ratón, Florida, 1980, p: 1-3.

MARCUS, G.J. y R. DURNFORD.- A simple enzyme-linked immunosorbent assay for testosterone.

*Steroids* **46**: 975-986, 1986.

MARCUS, G.J. y R. DURNFORD.- Estradiol assay by microtitre plate enzyme immunoassay.

*J. Steroid Biochem.* **29**: 207-212, 1988.

MAUREL, M.C., H. LABROUSSE, M. TERQUI y S. AVRAMEAS.- Microtitre plate enzyme immunoassay of estradiol-17 $\beta$ .

*J. Steroid Biochem.* **25**: 48S, Abst 135, 1986.

MAYER M. y F. ROSEN.- Interaction of corticoids and androgens with skeletal muscle.

*Metabolism* **26**: 937-962, 1977.

MAYER, R.J., R.J. BURGESS y S.M. RUSSELL.- Factors controlling intracellular breakdown of proteins. En: Protein deposition in animals, editado por, P.J. Buttery y D.B. Lindsay. Butterworths, London-Boston, 1980, p: 21-49.

MAZUMDER, R. y W. SZER.- En: Comprehensive Biochemistry, editado por M. Florkin, A. Neuberger y L.L.M. Van Deenen. Elsevier North-Holland, Amsterdam, 1977, p: 186-234.

McDONALD, L.E.- The adrenal cortex. En: Veterinary Endocrinology and Reproduction, editado por Lea & Febiger, Filadelfia, 1980, p: 161-207.

McDONALD, L.E.- Reproducción y Endocrinología Veterinaria, editado por Interamericana S.A. de C.V.- Mexico, D.F. 1983, p: 201-234.

McLENDON, G. y E. RADANY.- Is protein turnover thermodynamically controlled?.  
*J. Biol. Chem.* **253**: 6335-6337, 1978.

MEYER, H.H.D., H. SAUERWEIN y B.M. MUTAYOBA.- Immunoaffinity chromatography and a biotin-streptavidin amplified enzyme immunoassay for sensitive and specific estimation of estradiol-17 $\beta$ .

*J. Steroid Biochem.* **35**: 263-269, 1990.

MICHEL, G. y E.E. BAULIEU.- En: *Anabolic Agents in Animal Production, Environmental Quality and Safety*, editado por F.C. Lu y J. Rendel. Thieme, Stuttgart, 1976, p: 54-59.

MICHEL, G. y E.E. BAULIEU.- Androgen receptor in rat skeletal muscle: Characterization and physiological variation.  
*Endocrinology* 107: 2088-2095, 1980.

MILES, L.E. y C.N. HALES.- Labelled antibodies and immunological assay systems.  
*Nature* 219: 186-188, 1968.

MILLWARD, D.J., P.J. GARLICK, W.P.T. JAMES, D.O. NNANYELUGO y J.S. RYATT.- Relationship between protein synthesis and RNA content in skeletal muscle.  
*Nature* 241: 204-205, 1973.

MOOR, R.M., H.F. HAY y R.F. SEAMARK.- The sheep ovary: regulation of steroidogenic, haemodynamic and structural changes in the largest follicle and adjacent tissue before ovulation.  
*J. Reprod. Fert.* 45: 595-604, 1978.

MORAN, C., D.J. PRENDIVILLE, J.F. QUIRKE y J.F. ROCHE.- Effects of estradiol, zeranol or trenbolone acetate implants on puberty, reproduction and fertility in heifers.  
*J. Reprod. Fert.* 89: 527-536, 1990.

MUNRO, C. y G. STABENFELDT.- Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone.  
*J. Endocrinol.* 101: 41-49, 1984.

- MUNRO, C.J. y B. LASLEY.- *Non-Radiometric methods for immunoassay of steroid hormones*. En: *Non-Radiometric Assays: Technology and Application in Peptide and Steroid Hormone detection*, editado por Alan R., Liss Inc., 1988, 289-329.
- NANDA, A.S., H. DOBSON y W.R. WARD.- *Relationship between an increase in plasma cortisol during transport-induced stress and failure of oestradiol to induce luteinizing hormone surge in dairy cows*.  
*Res. Vet. Sci.* 49: 25-28, 1990.
- NEUMANN, F.- En: *Anabolic Agents in Animal Production*, FAO/WHO, Symp. Rome, 1975, p: 253-264.
- NEUMANN, F.- *Pharmacological and endocrinological studies on anabolic agents*. En: *Anabolic Agents in Animal Production*, editado por F. Coulston y F. Korte. Thieme, Stuttgart, 1976, p: 253-264.
- NORMAN, A.W. y G. LIWACK.- *Hormones*, editado por A.W. Norman y G. Linack. Academic Press, London, 1987.
- O'LAMHNA, M.P. y J.F. ROCHE.- *Effect of long or short acting anabolic agents, given singly or repeated, on growth rate and carcass weight of steers*.  
*Vet. Rec.* 114: 182-184, 1984.
- OELLERICH, M.- *Principles of enzyme-immunoassay*. En: *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 1: *Fundamentals*, editado por M.V. Bergmeyer. Verlag Chemie. Florida, 1983, p: 233-260.
- OPPENHEINER, J.H., G. BERNSTEIN y J. HASEN.- *Estimation of rapidly exchangeable cellular thyroxine from plasma disappearance curves of simultaneously administered thyroxine I<sup>131</sup> and albumin I<sup>125</sup>*.  
*J. Clin. Invest.* 46: 762-777, 1967.

PAIN, V.M.- En: Protein turnover in Mammalian tissues and in the whole body, editado por, J.C. Waterlow, P.J. Garlick y D.J. Millward. Elsevier-North-Holland, Amsterdam, 1978.

PAIN, V.M. y M.J. CLEMENS.- En: Comprehensive Biochemistry, editado por Florkin, Stotz, Neuberger y Van Deenen. Elsevier, Amsterdam. 1980, Vol. 198, p: 1-76.

PANGARO, L., K.D. BURMAN, L. WARTOFSKI, H.J. CAHNMANN, R.C. SMALLRIDGE, J.T. O'BRIEN, F.D. WRIGHT y K. LATHAM.- Radioimmunoassay for 3,5-diiodothyronine and evidence for dependence conversion from 3,5,3'-triiodothyronine.

*J. Clin. Endocrinol. Metab.* **50**: 1075-1081, 1980.

PAPANICOLAOU, G.N. y E.A. FALK.- General muscular hypertrophy induced by androgenic hormone.

*Science* **87**: 223-230, 1983.

PERRY, T.W., W.M. BEESON, F.N. ANDREWS y M. STOB.- The effect of oral administration of hormones on growth rate and deposition in the carcass of fattening steers.

*J. Anim. Sci.* **14**: 329-335, 1955.

PETERS, A.R., D.G. EVANS y D.J. READ.- Effects of trenbolone acetate and hexoestrol on live-weight gain, and serum hormone and metabolite concentrations, in steers.

*Anim. Prod.* **38**: 385-390, 1984.

PETERS, A.R.- Hormonal control of the bovine oestrus cycle. I. The natural cycle.

*Brit. Vet. J.* **141**: 564-573, 1985.

- PETERS, A.R. y P.J.H. BALL- Reproduccion en ganado vacuno, editado por Acribia. Zaragoza, 1987, p: 23-45.
- PETERS, A.R.- Effect of trenbolone acetate in ovarian function in culled dairy cows. *Vet. Rec.* 120: 413-416, 1987.
- POTTIER, J., M. BUSIGNY y J.A. GRANDADAM.- Plasma kinetics, excretion in milk and tissue levels in the cow following implantation of trenbolone acetate. *J. Anim. Sci.* 41: 962-968, 1975.
- POWERS, M.L. y J.R. FLORINI.- A direct effect of testosterone on muscle cells in tissue culture. *Endocrinology* 97: 1043-1047, 1975.
- RANAWEERA, P.- The effects of trenbolone acetate in growing turkeys. Tesis Doctoral. University of Cambridge, 1977.
- RANNELS, S.R., D.E. RANNELS, A.E. PEGG y L.S. JEFFERSON.- Glucocorticoid effect on peptide chain initiation in skeletal muscle and heart. *Am. J. Physiol.* 235: E134-139, 1978.
- REID, J.F.S.- Significance of natural oestrogen-implanted beef to human health. The use, Residues and toxicology of growth promoters. 1980, p: 24-58.
- REVEL, M. y Y. GRONER.- Post-transcriptional and translational controls of gene expression in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem* 47: 1079-1126, 1978.
- RIAD-FAHMY, D., G.F. READ, B.G. JOYCE y R.F. WALKER.- Steroid immunoassays in endocrinology. En: Immunoassays for the 80's, editado por A. Voller, A. Barlett y D. Bidwell. MTP Press, Ltd., Lancaster, England, 1981, p: 205-261.

- RICO, A.G., V. BUGART-SACAZE, J.P. BRAUN y P. BENARD.-** Metabolism of endogenous and exogenous anabolic agents in cattle. Anabolic agents in beef and veal-production proceedings of a workshop help. Bruselas, 1981, p: 45-56.
- ROBBINS, J., J.E. RALL.-** The iodine-containing hormones. En: *Hormones in the blood*, editado por, C.M. Gray y A.L. Bacharach. Academic Press. Londres, 1979 p: 576-688.
- ROCHE, J.F. y W.D. DAVIS.-** Effect of trenbolone acetate and resorcyclic acid lactone alone or combined on daily liveweight and carcass weight in steers. *Irish. J. Agr. Res.* 17: 7-18, 1978.
- ROCHE, J.F. y J.J. IRELAND.-** The differential effect of progesterone on concentrations of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in heifers. *Endocrinology* 108: 568-570, 1981.
- ROCHE, J.F.-** Anabolics in animal production, Symposium OIE Paris, 1983, p: 119.
- ROCHE, J.F. y J.F. QUIRKE.-** En: *Control and Manipulation of Animal Growth*, editado por Buttery, Hayness y Lindsay. Butterworths, Londres, 1986, p: 39-51.
- ROSS, D.B.-** Toxicology and residues of trenbolone acetate as a model. Comummunication: Steroids in animal production. Internation. Symp. Varsovie, 1980.
- RUBENSTEIN, K.E., R.S. SCHNEIDER y E.F. ULLMAN.-** Homogeneous enzyme-immunoassay. A new immunochemical technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47: 846-852, 1972.

SAUER, M.J., J.A. FOULKES y A.D. COOKSON.- Direct enzymeimmunoassay of progesterone in bovine milk.

*Steroids* 38: 45-53, 1981.

SAUER, M.J., J.A. FOULKES y P.M. O'NEILL.- Use of microtitre plate EIA for direct determination of progesterone in whole milk: Application of heterologous systems for improved sensitivity.

*Br. Vet. J.* 138: 522-532, 1982.

SAUER, M.J., J.A. FOULKES, A. WORSFOLD y B.A. MORRIS.- Use of progesterone 11-glucuronide-alkaline phosphatase conjugate in a sensitive microtitre plate enzymeimmunoassay of progesterone in milk and its application to pregnancy testing in dairy cattle.

*J. Reprod. Fert.* 76: 375-391, 1986.

SCHALLENBERGER, E., D. SCHAMS, B. BULLERMAN y D.L. WALTERS.-

Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during prostaglandin-induced regression of the corpus luteum in the cow.

*J. Reprod. Fert.* 71: 493-501, 1984.

SCHAMS, D., E. SCHALLENBERGER, B. HOFFMAN y H. KARG.- The oestrus cycle of the cow: Hormonal parameters and time relationships concerning oestrus, ovulation, and electrical resistance of the vaginal mucus.

*Acta Endocrinol. Copenh.* 86: 180-192, 1977.

SCHEELE, G., B. DOBBERSTEIN y G. BLOBEL.- Transfer of proteins across membranes, Biosynthesis in vitro of pretrypsinogen and trypsinogen by cell fractions of canine pancreas.

*Eur. J. Biochem.* 82: 593-599, 1978.



SCHOPPER, D., B. HOFFMANN, H. KARG, P.L.M. BERENDE, E.J. VAN WEERDEN y P. VAN DER WAL.- Untersuchungen zur analytischen erfaßbarkeit der exogenen verabreichung von 17 $\beta$ -oestradiol und trenbolonacetat im blutplasma und im urin beim kalb.

*Vet. Med.* 30: 585-600, 1983.

SCHOPPER, D.- Nachweis des synthetischen anabolikums trenbolonacetat bei schlachttieren.

*Fleischwirtsch* 63: 3, 1983.

SCHUURS, A.H.W.M. y B.K. VAN WEEMEN.- Enzyme-immunoassay: a powerful analytical tool.

*J. Immunoassay* 1: 229-249, 1980.

SCHWÄZE, E. y L. SCHRÖDER.- El sistema endocrino. En: Compendio de Anatomía Veterinaria, editado por E. Schwäze y L. Schröder. Zaragoza: Acribia, 1972, p: 176-178.

SILVAN, G.- Correlaciones entre tamaño folicular y niveles de hormonas esteroides en ganado vacuno. Tesis doctoral. U.C.M., 1991.

SISSON, S. y J.D. GROSSMAN.- Glándula tiroides. En: Anatomía de los animales domésticos, editado por S. Sisson y J.D. Grossman. Barcelona: Salvat, 1975, p: 524-525.

SNYDER, S.M., R.R. CAVALIERI, I.D. GOLDFINE, S.H. INGBAR y E.C. JORGENSEN.- Binding of thyroid hormones and their analogues to thyroxine-binding globulin in human serum.

*J. Biol. Chem.* 251: 6489-6494, 1976.

STABENFELDT, G.H., L.L. EWING y L.E. McDONALD.- Peripheral plasma progesterone levels during the bovine oestrous cycle.

*J. Reprod. Fert.* **19**: 433-439, 1969.

TATEISHI, K., H. YAMATO, T. OGIHARA y C. HAYASHI.- Enzyme immunoassay of serum testosterone.

*Steroids* **30**: 25-32, 1977.

TAUROG, A.- Biosynthesis of iodoamino acids. En: *Handbook of Physiology*, editado por M.A. Green y D.H. Solomon. Washington D.C.: American Physiological Society, 1974, p: 101-133.

THOMAS, K.M. y R.G. RODWAY.- Suppression of adrenocortical function in rats and sheep treated with the anabolic steroid trenbolone acetate.

*Proc. Nutr. Soc.* **41**: 138-144, 1982.

TIEWS, J., J. GROPP y E. BOEHNCKE.- Exposés d'une journée d'études consacrée a l'utilisation des oestrogènes en élevage. 1972, p:7-11.

TIJSSEN, P.- Practice and theory of enzyme immunoassays. En: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, editado por R.H. Burdon y P.H. van Knippenberg. Elsevier. Amsterdam. New York. Oxford, 1985.

TSUJI, A., M. MAEDA, H. ARAKAWA, S. SCHIMIZU, T. IKEGAMI, Y. SUDO, H. HOSODA y T. NAMBARA.- Fluorescence and chemiluminiscence enzyme immunoassay of 17- $\alpha$ -hydroxy-progesterone in dried blood spotted on filter paper.

*J. Steroid Biochem.* **27**: 33-40, 1987.

VAN DER WAL, P., y P.L.M. BERENDE.- Effects of anabolic agents on food producing animals. En: *Anabolics in animal production*, editado por E. Meissonnier. Soregraph, Levallois, France, 1983, p: 73-115.

- VAN DER WAL, P.- General aspects of the effectiveness of anabolic agents in increasing protein production in farm animals, in particular in bull calves. En: Environmental Safety and Quality, editado por F.G. Lu and J. Rendel. Thieme, Stuttgart. 1975, p: 60-78.
- VAN DE WIEL, D.F.M. y W. KOOPS.- Direct measurement of progesterone in milk and plasma by a sensitive and simple enzymeimmunoassay.  
*Br. Vet. J.* 138: 454-463, 1982.
- VAN DE WIEL, D.F.M. y W. KOOPS.- Development and validation of an enzymeimmunoassay for progesterone in bovine milk or blood plasma.  
*Anim. Reprod. Sci.* 10: 201-213, 1986.
- VAN WEEMEN, B.K. y A.H.W.M. SCHUURS.- Immunoassay using antigen enzyme conjugates.  
*Febs Lett.* 15: 232-237, 1971.
- VAN WEEMEN, B.K. y A.H.W.M. SCHUURS.- Immnoassay using haptenezime conjugates.  
*Febs Lett.* 24: 77-81, 1972
- VAN WEEMEN, B.K. y A.H.W.M. SCHUURS.- The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labelled estrogen on the characteristics of estrogen enzyme-immunoassays.  
*Immunochemistry* 12: 667-670, 1975.
- VAN WEEMEN, B.K. y A.H.W.M. SCHUURS.- Sensitivity and specificity of hapten enzyme-immunoassays. En: First International Symposium on Immunoenzymatic Techniques. INSERM. Symposium nº 2, editado por Feldmann, E. North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1976, p: 125-133.

- VAN WEEMEN, B.K., A.M.G. BOSCH, E.C. DAWSON y A.H.W.M. SCHUURS.-  
Enzyme-Immunoassay of steroids: possibilities and pitfalls.  
*J. Steroid Biochem.* 11: 147-151, 1979.
- VAN DE WIEL, D.F.M. y W. KOOPS.- Development and validation of an  
enzymeimmunoassay for progesterone in bovine milk or blood plasma.  
*Anim. Reprod. Sci.* 10: 201-213, 1986.
- VOLLER, A., D.E. BIDWELL y A. BARTLETT.- The enzyme-linked immunosorbent  
assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech  
Europe, Guernsey, 1987.
- WALTERS, D.L., D. SCHAMS y E. SCHALLENBERGER.- Pulsatile secretion of  
gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the luteal phase  
of the oestrus cycle in the cow.  
*J. Reprod. Fert.* 71: 479-491, 1984.
- WANG, D.Y. y R.D. BULBROOK.- Steroid sulphates.  
*Adv. Reprod. Physiol.* 3: 113-146, 1968.
- WEBER, A.F., S.H. Mc NUTT y B.B. MORGAN.- Structure and arrangement of zona  
glomerulosa cells in the bovine adrenal.  
*J. Morph.* 87: 393- 400 ,1950
- WETTEMANN, R.P., H.D. HAFS, L.A. EDGERTON y L.V. SWANSON.- Estradiol  
and progesterone in blood serum during the bovine estrous cycle.  
*J. Anim. Sci.* 34: 1020-1024, 1972.
- WIGGINS, J.P., L.L. WILSON, H. ROTHENBACHER y S.L. DAVIS.- Effects of  
diethylstilbestrol, zeranol and sex on live, blood metabolite, carcass and  
endocrine characteristics of lambs.  
*J. Anim. Sci.* 43: 518-525, 1976.

- WIMPY, T.H., C.F. CHANG, V.L. ESTERGREEN y J.K. HILLERS.- Milk progesterone enzyme immunoassay: modifications and a field trial for pregnancy detection in dairy cows.  
*J. Dairy Sci.* **69**: 1115-1121, 1986.
- WISE, T.H., D. CATON, W.W. THATCHER, A. RAMI y M.J. FIELDS.- Androstenedione, dehydroepiandrosterone and testosterone in ovarian vein plasma and androstenedione in peripheral arterial plasma during the bovine oestrus cycle.  
*J. Reprod. Fert.* **66**: 513-518, 1982.
- WOOL, I.G., W.S. STIREWALT, K. KURIHARA, R.B. LOW, P. BAILEI y D. OYER.- Mode of action of insulin in the regulation of protein biosynthesis in muscle.  
*Rec. Progr. Horm. Res.* **24**: 139-209, 1968.
- YALOW, R.S. y S.A. BERSON.- Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods.  
*Nature* **184**: 1648-1649, 1959.
- YALOW, R.S. y S.A. BERSON.- Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.  
*J. Clin. Invest.* **39**: 1157-1162, 1960.
- YOUNG, V.R.- En: *Mammalian Protein Metabolism*, editado por, H.N. Munro. Academic Press, New York, 1970, p: 585-674.
- ZARCO, L.- EIA for estradiol 17 $\beta$  (resultados sin publicar). 1988.