

22

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DETERMINACION DE DIETILESTILBESTROL EN
MUESTRAS DE HIGADO DE BOVINO Y
CERDO PARA ABASTO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A**

CARLOS EMILIO BALDWIN SEVILLA

ASESOR: M.V.Z. RENE ROSILES MARTINEZ

México, D. F.

1979

8192



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN.

En un estudio piloto para detectar residuos de Dietilestilbestrol con una técnica de cromatografía en capa fina usando como reveladores Luz Ultravioleta y un colorante específico en muestras de hígado de 40 bovinos, macho y hembras y 40 cerdos, machos castrados y --- hembras provenientes del rastro de Santa Clara, Edo. de México, en 8 hígados de cerdo y en 24 hígados de bovino, se encontró que las cantidades de residuos de DES en cerdos (40 ± 13) y bovinos (33 ± 7.2) fue superior a la aceptada por la F.D.A., en los Estados Unidos de Norte América, re presentando esto un riesgo para la salud humana.

La técnica de Cromatografía en capa fina con el revelado con Luz Ultravioleta, permitió detectar tasas de DES en hígado de 50 ppb. o más y la del colorante específico de 25 ppb. o más. La sensibilidad de la técnica fue inferior a otras similares. Esto se atribuyó a diferencia de la edad de los reactivos, limpieza del material u otras causas no determinadas.

I N D I C E

	PAGINAS
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	11
RESULTADOS	16
DISCUSION	18
CONCLUSIONES	20
LITERATURA CONSULTADA	22

INTRODUCCION

Los estrógenos, sustancias productoras de estro, pueden ser por su origen naturales (esteroides), producidos por los ovarios, glándulas adrenales y algunas plantas o -- sintéticos (no esteroides). (18)

Estas sustancias hormonalmente activas se han utilizado como aditivos alimenticios o como implantes subcutáneos para incrementar la eficiencia alimenticia de los -- animales. (7). Witehair et al., (35) y Jordan., (17), sugirieron que el efecto de los estrógenos es debido a que au mentan la retención de nitrógeno. Clegg y Cole., (8), encontraron que los estrógenos causan hipertrofia adrenal con mayor producción de endrógenos y aceleración del metabolismo protéico.

Se han empleado como implantes subcutáneos el -- dietilestilbestrol (DES), dinestrol, estradiol etc., (1), - la dosis varía entre 12-36 mg./animal, (14).

Por vía oral generalmente se administran 1,200 - microgramos por kilo de alimento (12).

Teague et al (28), encontraron que la implantación en cerdos con 96 mg. de DES en machos y hembras resultó en un incremento de la tasa de crecimiento. Los machos crecieron más rápido que las hembras. Braude, (4), Christian y Turk (6), Sewell et al (25), Beeson et al (5), encontraron que el DES administrado oralmente aumentaba la tasa de crecimiento, y la conversión alimenticia de los cerdos; Christian y Turk, (6), observaron que alimentados los cerdos con una ración -- conteniendo de 10 a 50 mg. diarios de DES, desde un peso de 61 a 132 kg. disminuía el olor y el sabor indeseable de la carne de los verracos. Teague et al (28), determinaron que los cerdos implantados con 96 mg. tenían 48 horas después de suspender el DES, residuos de 0.558 ppb. en los músculos, menor que el necesario para la sensibilidad biológica de la -- prueba del útero de ratón.

Después de descubrir que los estrógenos estimulaban el crecimiento y la eficiencia alimenticia, nació el interés por conocer su ruta metabólica. Stroud, (27), encontró que después de la inyección de dietilestilbestrol (DES) en conejos, éste aparecía libre y combinado en la orina. Mazur-

y Sherr, (20) observaron que la forma combinada era el mono glucoronato. Malpres, (19), encontró que la principal forma de eliminación en humanos era como glucuronato y pequeñas cantidades como sulfato. Twombly y Schoenewald, (30), y Hanahan et al, (13), observaron que en conejos el DES era principalmente conjugado en hígado y excretado principalmente por la bilis al intestino y en menor cantidad por la orina. Stob, (23) determinó que la actividad estrogénica por cromatografía de gas era creciente en el excremento de ovejas implantadas con 12 mg./cabeza de DES. En la última muestra de excremento colectada a los 70 días, la actividad estrogénica había disminuido pero todavía era evidente. Ellis et al, (10), y Stob et al, (22) encontraron actividad estrogénica en el músculo de ovejas 104 y 106 días después de haber sido implantadas con 12 mg. de DES.

Sin embargo, Andrews et al, (1), no encontraron actividad de DES en el músculo e hígado de ovejas, 73 días después de la implantación subcutánea de 12 mg. de DES. Stob et al (24), no observaron actividad de DES en hígados y riñones de novillos 140 días después de la implantación con 36 mg. de DES.

Preston et al (21), Turner, (29), Umberger et al - (32), y Wiberg y Stephenson, (36), no encontraron actividad en tejidos comestibles de novillos sacrificados 48 hrs. después - de suspenderse la ingestión de 36 mg. de DES. Sin embargo, Do noho et al (9), usando derivación y cromatografía gas-liquido, encontraron 1 ppb. de DES o su conjugado en hfgados de novi- llos sacrificados 72 hrs. después de cesar la ingestión de 20 mg. diarios/animal de DES.

Aschbacher, et al (2) encontraron 14C-DES en las he- ces fecales de ovejas, siete días después de suspenderse la in- gestión. Aschbacher et al (3), con dosis orales únicas de -- 14C-DES a novillos lograron determinar del 98.5 al 99.5% en -- las heces fecales de los novillos sacrificados en las 120 y 168 hrs. después.

Las concentraciones de 14C-DES fueron siempre más al- tas en hfgado, riñón y vesícula biliar que en ningún otro teji- do analizado. Una de las muestras de hfgado de un novillo sa- crificado 168 hrs. después de la dosificación tenía el 22% de 14C-DES, equivalente a una concentración de 0.1 ppb. de DES.

En los hígados de los novillos sacrificados a las 72 y 120 hrs., se encontraron 0.9 y 1.2 ppb. respectivamente. No se detectó DES, 178 hrs. después de finalizar la ingestión.

Los estrógenos son producidos normalmente en el organismo y en condiciones deficitarias se utilizan como terapéuticos de remplazo. También se han utilizado en humanos como anticonceptivos y para tratar el cancer de la glándula mamaria y próstata. Los estrógenos son biologicamente-inactivos en dosis pequeñas, pero como muchas otras substancias, pueden ocasionar efectos indeseables en grandes dosis.

Entre los efectos tóxicos de los estrógenos estan el incremento en la retención de agua, hemorragias uterinas mastodinia, agravación de fibroides uterinas, mastitis quistica crónica, migraña y el riesgo de tromboflebitis. Con dosis grandes administradas por periodos prolongados se ha provocado cancer en cepas de ratones susceptibles.

En la mujer la administración de anticonceptivos, por largo tiempo o como terapia de remplazo en menopausia,

u ovariectomía no ha incrementado el cáncer mamario. Aun las mujeres con alta sensibilidad del endometrio a los estrógenos que responden a ellos con hiperplasia adenomatosa, al cesar la terapia se recuperan.

Herbert, Unfelder y Poskanzer., (15), reportaron - casos de adeno-carcinoma vaginal en mujeres jóvenes cuyas madres habían recibido terapia con dietilestilbestrol durante - la preñez. La dosis administrada se encontraba en el rango de 0.1 a 100 mg. por día durante 3 meses.

La F.D.A., en los Estados Unidos de Norte América tolera como residuo con los tejidos animales comestibles hasta una parte por billón de DES (1ppb.).(31). Existen de ---- 15,000 a 65,000 sitios receptores en las células blanco capaces de reaccionar con sustancias hormonalmente activas. Cada receptor posiblemente conjuga hasta cinco moléculas.

En la actualidad es posible detectar residuos estrogénicos en los tejidos comestibles de los animales muy inferiores al umbral capaz de producir una respuesta biológica. (31).

Existe evidencia de que cada receptor necesita una o dos moléculas, por lo tanto se necesitan entre 5,000 y -- 100 millones de moléculas por célula para producir una respuesta fisiológica.

En los hígados de bovinos conteniendo ilegalmente 2 ppb. de DES se encuentran 8.4×10^{12} moléculas. Si al comer hígado del animal se absorviera el 3% o sea 2.5×10^{11} , moléculas; una mujer con útero que pesa aproximadamente de 30 a 40 g. y 6×10^{10} células, cada célula recibiría aproximadamente 4 moléculas de DES muy inferior a las 5,000 a 100 millones necesarios para que sea una respuesta fisiológica.

Aun cuando un individuo comiera 500 g. de hígado conteniendo 2 ppb. el número de moléculas ingeridas sería de 2.24×10^{15} y el 3% absorbido por el intestino será de -- 6.7×10^{13} .

Si todas las moléculas fueran al útero cada célula se expondría a 1,100 moléculas de DES todavía muy inferior al necesario para provocar la respuesta fisiológica.

La dosis mínima para provocar una respuesta fisiológica al DES es de 100 microgramos ó 2.2×10^{17} moléculas. La evidencia indica que con las dosis altas de re siduos de DES calculados anteriormente no existe peligro en el humano (31).

Sin embargo, Dalane, (31), menciona que "sólo es necesario una molécula de alguna substancia en el sitio y momento adecuado para causar un cambio en el genoma celular y producir cancer". De acuerdo a esto, las cant idades ínfimas de DES encontradas en los tejidos animales comestibles bastarían para provocar cancer.

Umberg et al (32), Wiberg y Stephenson, (36), emplearon un bioensayo basado en el incremento de peso uterino de ratonas inmaduras para la determinación de la ta sa de residuos de DES, en huevos, carne de pollo y bovi no. Sin embargo, este procedimiento es difícil de realizar rutinariamente pues es inespecífico y sólo mide acti dad estrogénica.

Goodyear y Jenkinson., (11), Umberg et al, (34), -- desarrollaron métodos químicos que emplean un procedimiento-- colorimétrico o fluorométrico. Esta técnica requiere de muestras grandes y no se ha encontrado adecuada aun para medir el DES en tejidos animales. Se han utilizado otros métodos para detectar DES, estos incluyen cromatografía en capa fina o -- irradiación subsecuente con luz ultravioleta por la técnica - Schuller, (26), o con colorantes específicos según Jellinek - (16).

También se han utilizado varias técnicas de cromatografía de gas para medir DES en alimentos animales ya sea como DES libre, ésteres o dicloroacetatos de dietilstilbestrol. Donoho et al, (9), utilizaron esta técnica para detectar residuos de DES en tejidos animales. Coffin y Pilon., (5), determinaron con esta técnica tasas de 2 a 10 ppb. en tejidos animales.

La finalidad del presente trabajo es la de hacer un muestreo piloto para determinar los valores residuales de DES en hígados de bovinos y cerdos provenientes del rastro de Santa Clara, Edo. de México.

Utilizando la Técnica de extracción y purificación citada por Coffin y Pilon (5), después para su lectura, la técnica de Cromatografía en capa fina y confirmando la presencia de DDT por la formación de un derivado con el reactivo de Jellinek., (16), o con luz ultravioleta, Schuller., (26). También evaluar el método usado y determinar teóricamente el peligro de los individuos que consumen el hígado de animales con residuos de DDT.

MATERIAL Y METODOS

Se colectaron aproximadamente 100 g. de hígados de 40 bovinos machos y hembras de 2 a 3 años de edad y de 40 cerdos machos castrados y hembras de 6 meses a 5 años de edad, sacrificados en el rastro municipal de Santa Clara, Edo. de México. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico limpias y se trasladaron al laboratorio de -- Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., y se congelaron a -20° C. hasta el momento de la determinación de Dietilestilbestrol (DES) -- extrayendo y purificando el DES de acuerdo a la técnica -- descrita por Coffin y Pilon (5), y después utilizando para la lectura la técnica de Cromatografía en capa fina -- descrita por Aschbacher (1972), y confirmando la presencia con la formación de un derivado con el reactivo de Jelinek (16), o con luz ultravioleta de acuerdo a Schuller (26). La técnica consistió en licuar 20 g. de hígado con 50 ml. de acetona por 5 min. Centrifugar a 1,500 r.p.m. por 10 min., decantar el sobrenadante en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. El residuo se licuó con 60 ml. de acetona al 80% (120 ml. de acetona + 30 ml. de agua) por-

5 min. Se centrifugó por 10 min. a 1,500 r.p.m., se adiciona el sobrenadante al decantado anterior. Se agregó a este combinado 10 ml. de 2 N HCL. Se removi6 la acetona por evaporación en un vaporizador a 50° C. una vez -- terminada la evaporación se removi6 completamente la acetona bajo una suave corriente de gas nitr6geno.

Se transfiri6 el residuo acuoso a un matraz separador de 250 ml. Se hicieron dos extracciones sucesivas con 40 y 20 ml. de cloroformo ($CHCl_3$), se lav6 el -- combinado de extractos clorof6rmicos con 20 ml. de una -- soluci6n de carbonato de sodio al 10%, lavando la soluci6n de carbonato con 20 ml. de cloroformo. Se extrajo el combinado clorof6rmico con 20 ml. de 1 N NaOH y se desech6 el cloroformo. El NaOH se extrajo tres veces consecutivas con 40 ml. de cloroformo. Una vez separado el cloroformo se acidific6 el NaOH con 12 ml. de 2 N HCL. .

Se lav6 el combinado de extractos clorof6rmi-- cos con 10 ml. de una soluci6n de carbonato al 10% la cual se desech6 y el residuo se extrajo con 10 ml. de 1 N NaOH; se lav6 el extracto de NaOH 2 veces consecutivas con 20 ml. de cloroformo.

Una vez separado el cloroformo, se acidificó el NaOH con 6 ml. de 2 N HCL lavando 2 veces consecutivas -- con 20 ml. de cloroformo. Se lavó el combinado de extractos con 10 ml. de una solución de carbonato al 10% y se desechó la solución de carbonato, los extractos clorofórmicos se extrajeron con 10 ml. de 0.2 N NaOH, se lavó el NaOH, primero con 20 ml. de cloroformo y enseguida con 20 ml. de cloruro de metilo (CH_2Cl_2), desechando tanto el -- cloroformo como el cloruro de metilo, se acidificó el --- NaOH con 2 ml. de 2 N HCL y se extrajo 2 veces consecutivas con 10 y 4 ml. de cloruro de metilo. Se filtró el ex^{tr}acto de cloruro de metilo a través de una placa de 2 a 3 cm. de sulfato de sodio anhidro dispuesta sobre el filtro de fibra de vidrio. Se lavó la placa de sulfato de sodio anhidro con 6 ml. de cloruro de metilo. Se evaporó hasta 3-5 ml. el extracto de cloruro de metilo en un vapo^rizador a 50° C. y bajo una suave corriente de gas nitrógeno. Se transfirieron los 3-5 ml. de cloruro de metilo a un tubo de centrifuga finalizando la evaporación a la temperatura de la habitación bajo una suave corriente de gas nitrógeno.

Se resuspendió en 0.2 ml. de hexano quedando listas las muestras para ser colocadas en la placa de sílica gel "G".

Se prepararon placas de 20 x 20 cm. de superficie y de 0.25 mm. de sílica "Gel "G", activándose durante toda la noche a 110° C. De un estándar de 5mg de dipropionato de dietilestilbestrol se colocaron sobre las placas cantidades de 5, 10, 20 y 40 microlitros, y las muestras problema en cantidades de 10, 20 y 40 microlitros. Posteriormente, se desarrollaron en un sistema de solventes: Hexano-éter etílico-diclorometano en la siguiente proporción: 4:3:2.

Del estándar se utilizaron también diluciones decuples para saber cual era el grado máximo de detección de DES.

A continuación se irradiaron con luz ultravioleta de onda larga por un lapso de 45 min. con esto -- las muestras positivas adquieren un color amarillo limón que las hizo visibles a simple vista o con la ayu-

da de una lámpara de Wood según el método de Schuller, - (26), Enseguida con el fin de comprobar la presencia de estos compuestos que se comportaban igual que el estándar, se atomizaron las placas con un reactivo a base de Cloruro Férrico y Ferricianuro de Potasio ($\text{FeCl}-\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_5$), seguidas de otra atomización con 2N de HCl ., (16), con esto se obtuvo una mejor detección a simple vista.

* Merck de México.

RESULTADOS

Los residuos encontrados en los hígados de 24 bovinos y 8 cerdos de las 80 muestras estudiadas fue superior a los límites de 0.1 - 1.0 ppb. aceptado en los Estados Unidos. (31).

Por el método de Luz ultravioleta (U.V.) propuesto por Schuller., (26), sólo se pudieron detectar 50 ppb. o más de DES y con el reactivo revelador de Jellinek., (16), de 25 ppb. o más (cuadro 1).

Con el método propuesto por Schuller, sólo se pudieron detectar 8 muestras de hígado positivas en bovinos y con el reactivo de Jellinek, se detectaron 24 - muestras positivas. Con el primer método se detectaron 50 ppb. o más y con el segundo método se detectaron desde 25 ppb. lo que lo hace aun más adecuado para detectar DES.

CUADRO No. 1

VALORES DE LOS RESIDUOS DE DES EN HIGADOS DE BOVINOS Y CERDOS CON LA TECNICA DE SCHULLER Y JELLINK.

ESPECIE	No. DE MUESTRAS	MUESTRAS NEGATIVAS A DES	JELLINK		$\bar{X} \pm S$	MUESTRAS NEGATIVAS A DES	SCHULLER		$\bar{X} \pm S$
			25 ppb. de DES	50 ppb. de DES			25 ppb. de DES	50 ppb. de DES	
BOVINOS	40	16	16	8	33 ± 7	32	0	8	50 ± 0
CERDOS	40	32	3	5	40 ± 13	40	0	0	0
TOTAL	80	48	19	13		72	0	8	

SCHULLER.- Técnica de Luz Ultravioleta (U.V.)

JELLINK.- Técnica de Cloruro Férrico-Ferri-
cianuro de potasio.

DISCUSION

La extracción y purificación de DES en Hfgados de bovinos y cerdos de acuerdo a la técnica de cromatografía descrita por Coffin y Pilon., (7), la técnica en capa fina de Kochbacher (3), y en revelado con Luz Ultra violeta según Schuller, (26), permitió detectar valores de 50 o más ppb. con la técnica de revelado de Jellinek, (16), fue posible detectar 15 ppb. o más. El compuesto coloreado por el reactivo de Jelliken(16), permitió una mejor observación del derivado formado. Estas técnicas, utilizadas para medir residuos de DES en hfgados de bovino y cerdo tuvieron una sensibilidad menor a las 10 ppb. que las técnicas de cromatografía en capa fina son capaces de detectar (31). Sin embargo, el límite real de detectibilidad de esas técnicas en extractos hepáticos es variable y depende de la pureza de la muestra, edad de los reactivos, etc., limpieza del material usado, etc.,- Esta falta de linealidad hace imposible cualquier determinación exacta del residuo y prohíbe una declaración definitiva acerca de la sensibilidad de la detección.

La técnica de Cromatografía en capa fina es sencilla, rápida y permite realizar reacciones específicas con la formación de derivados del compuesto en cuestión, lo que permite corroborar su presencia. La Cromatografía de gases permite una separación inicial y una determinación exacta de DES con espectroscopia de masas, pero el equipo es más costoso.

Los valores de DES encontrados en hígados de 24 bovinos y 8 cerdos (25 y 50 ppb), fueron superiores a los aceptados como tolerables en Estados Unidos (31). Esto significaría que si una mujer ingeriera 500 g. de hígado de esos animales conteniendo 50 ppb. con un número de moléculas de DES de 56×10^{17} si absorbiera 3% de ellos o sea 15.5×10^{14} , cada una de las 6×10^{10} células de su útero de aproximadamente 30 - 40 g. recibiría 27, 500 moléculas de DES, un número capaz de producir efectos fisiológicos y/o patológicos. Entre los efectos dañinos producidos por el DES se encuentran: cáncer, secreción vaginal, retención de agua y sodio, sangrado uterino, mastodinia (3).

CONCLUSIONES:

La técnica de Cromatografía en capa fina utilizada permitió con irradiación ultravioleta, detectar tasas de residuos de DES en hígados de bovinos y cerdos de 50 ppb. o más y con el revelador específico usado, - de 25 ppb. o más.

Los valores detectados son mayores a los detectados por otras pruebas de cromatografía en capa fina (10 ppb. o más). Esto se atribuyó a diferencias en la edad de los reactivos, limpieza del material u otras causas no determinadas.

Se encontraron residuos de DES en los hígados de 8 cerdos (40 ± 13 ppb.) 24 bovinos (33 ± 7.2 ppb.), superiores a las cantidades toleradas (0.1 - 1.0 ppb.) en los Estados Unidos de Norteamérica. Esto constituye un riesgo potencial para la salud humana ya que esas cantidades pueden producir respuestas fisiológicas y/o patológicas en los tejidos humanos.

Los hallazgos de DES en tejidos comestibles - en cantidades intolerables sugieren que debe prohibirse su aplicación, encontrar una forma práctica de evitar - su utilización inadecuada.

LITERATURA CONSULTADA

- 1.- Andrews, F.N., Stob, M., Perry, T.W. and Deeson, W.N.
"The effect of oral and subcutaneous estrogen and androgen administration on growth and carcass quality of lambs".
J. Anim. Sci. 15:575., 1956.
- 2.- Aschbacher, P.W.
"Metabolism of ¹⁴C-Diethylstilbestrol in sheep"
J. Anim. Sci. 35:1031., 1972
- 3.- Aschbacher, P.W. and Thacker, E.S.
"Metabolic fate of oral Diethylstilbestrol in steers"
J. Anim. Sci. 39:1185., 1974.
- 4.- Draude, R.
"Stimulation of growth in pig by iodinated casein and stilbestrol".
Brit. J. Nutr., 4:138., 1950.
- 5.- Deeson, W.N., Andrews, F. N., Perry, T.W. and Stob, M.
"The effect of orally administered stilbestrol and --

testosterone on growth and carcass composition on swine"

J. Anim. Sci. 14:475., 1955.

- 6.- Christian, R.E., Story, C.D. Culbertson and Burroughs, P.

"A study of the cause of sexual odor in the boar".

J. Anim. Sci. 16:1024., 1957.

- 7.- Coffin, D. E. and Pilon, J.C.

"Gas chromatographic determination of diethylstilbestrol residues in animal tissues".

J. Ass. Off. Analyt. Chem. 56:352., 1973.

- 8.- Clegg, M. T. and Cole, H. H.

"The action of stilbestrol on the growth response in ruminants".

J. Anim. Sci. 13:108., 1954.

- 9.- Donoho, A.L., Johnson, W.S., Sieck, R.F. and Sullivan, W.L.

"Gas Chromatographic determination of diethylstilbestrol and its glucuronide in cattle tissues".

J. Ass. Off. Analyt. Chem. 56: 736., 1973.

- 10.- Ellis, P.J., Allen, C. E. and Whiting, F.
"I.- Synthetic estrogen implants in lambs.
II.- The diethylstilbestrol content of treated
lamb tissues."
Can. J. Agr. Sci. 34:292., 1954.

- 11.- Goodyear, J. H. and Jenkinson, H. R.
" Gas Chromatographic technic".
Ana. Chem., 33:853., 1961.

- 12.- Hale, W.H., Story, C. D., Culbertson, N. and Burroughs, P.
"Responses of lambs fed varied levels of diethyl
stilbestrol."
J. Anim. Sci. 13:31., 1954.

- 13.- Hanahan, G. J., Daskalakis, E.G., Edwards, T.,
Dauben, H. J. Jr. and Meikle, R. W.
"Observations on metabolism of ¹⁴C-diethylstilbes
trol."
Arch. Biochem. Bioph. 33:342., 1951

- 14.- Harlan, D. F., Howhins, D. And Henderson, H. L.
"Growth stimulants for feedlot cattle"
Comp. Ext. Serv., Michigan State University.,
1973.
- 15.- Herbst, A. L., Green, T. H. Jr. and Ulfelder, H.
"Primary carcinoma of the vagina: and analysis -
of 68 cases "
Am. J. Obstet. Gynecol., 106:210., 1970.
- 16.- Jellinek., P. H.
"Technic and reaction in thin layer chromatogra-
phic".
Nature. 171: 750., 1953.
- 17.- Jordan, R. M.
"Effect of stilbestrol on suckling and fattening
lambs".
J. Anim. Sci. 12:670., 1953
- 18.- Litter, M.
"Manual de Farmacologia"
5a. Edición.
Editorial el Ateneo, 1970.

19.- MALPRESS, F. H.

"Metabolism of diethylstilbestrol"

Ibid., 42: 40., 1948.

20.- Mazur, A., and Shorr, E.

"Metabolism of synthetic estrogen".

J. Biol. Chem. 194: 283., 1952.

21.- Preston, R., Cheng, E., Story, C. D., Homeyer, P., Pauls, J. and Burroughs, W.

" The influence of oral administration of diethylstilbestrol upon estrogenic residues in the tissue of beef cattle. J. A

J. Anim. Sci. 15:3., 1956.

22.- Stob, H., Andrews, F. W., Zarrow, H. X. and --
Season, M. H.

"Estrogenic activity of the meat of cattle, --
sheep and poultry following treatment with sin-
thetic estrogens and progesterone".

J. Anim. Sci., 13:138., 1954.

- 23.- Stob, M., Perry, T. W., Andrews, F. H. and -
Beeson, W. M.

" Residual estrogen in the tissues of cattle
treated orally with diethylstilbestrol, di-
nестrol, hexestrol and chlortetracycline".
J. Rim. Sci. 15: 997., 1956

- 24.- Stob, M., Beeson, W. M., Perry, T. W. and -
Mohler, M. T.

"Effects of coumestrol in combination with -
implanted and orally administered diethyl--
stilbestrol on gains and tissue residues in
cattle".

J. Anim. Sci. 27: 1638., 1968.

- 25.- Sewell, R. F., Warren, E. P. and O'Mary, C.G.

"Effect of orally administered diethylstilbes-
trol and a fermentation product on growing -
finishing swine".

J. Anim. Sci. 16:20 1957.

- 26.- Schuller, P. L.

"Thin layer chromatographic techniques".

J. Chromatogr. 31: 227., 1957.

27.- Stroud, S. W.

"Metabolism of diethylstilbestrol"

J. Endocrinol. 1:201., 1939.

28.- Teague, H. S., Plimpton, R. F. Jr., Cahill,

V. R., Grifo, A. P. Jr. and Kunkle, L. E.

"Influence of diethylstilbestrol implantation
on growth and carcass characteristics of boars"

J. Anim. Sci., 23: 322., 1955

29.- Turner, G. W.

"Biological assay of beef steer carcasses for
estrogenic activity following the feeding of
diethylstilbestrol at a level of 10 mg. per -
day in the ration".

J. Anim. Sci. 15:13 1956.

30.- Twombly, G. H. and Schoenewaldt, E. F.

"Tissue localization and excretion routes of
radioactive diethylstilbestrol"

Cancer, 4:396., 1951

- 31.- Council on Agricultural Science and Technology
Veterinary and Human Toxicology.
19:133., 1977.
- 32.- Umberger, E. J., Gass, G. H. and Curtis, J. M.
"Design of a biological assay method for the -
detection and estimation of estrogenic resi--
dues in the edible tissues of the domestic, -
animals treated with estrogens".
Endocr. 63:806 1958.
- 33.- Umberger, E. J., Curtis, J. M. and Gass, G. H.
"Failure to detect residual estrogenic activity
in the edible tissues of steers fed stilbestrol"
J. Anim. Sci. 18:221 (1959).
- 34.- Umberger, E. J., Ganes, G., Runzo, F. H. and --
Colson, G. H.
"Chemical determination of diethylstilbestrol, re--
sidues in the tissues of treated chickens"
J. Ass. Off. Anal. Chem. 50:703., 1968.

35.- Whitehair, C. K., Callup, W. D. and Bell, M. C.

"Effect of stilbestrol on Ration digestibility and on calcium, phosphorus and nitrogen retention in lambs".

J. Anim. Sci. 12:331 (1955).

36.- Wiberg, G. S. and Stephenson, H. R.

"The detection of estrogenic activity in tissues - of steers which have been fed diethylstilbestrol"
Can. J. Biochem. And Physiol., 35:1107., 1957.