

01674



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y  
DE LA SALUD ANIMAL

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON ZILPATEROL,  
AGONISTA BETA-ADRENERGICO, SOBRE EL CICLO  
ESTRAL EN VAQUILLAS HOLSTEIN

## T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

JUAN HEBERTH HERNANDEZ MEDRANO

TUTOR:

DR. CARLOS G. GUTIERREZ AGUILAR

COMITE TUTORAL:

DR. EVERARDO GONZALEZ PADILLA  
DR. PEDRO GARCES YEPEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA

2005

m346406



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar, por compartir conmigo parte de su conocimiento y por todas las oportunidades que me dio siendo su alumno. También por su paciencia.


Al Dr. Everardo Gonzáles Padilla, por la orientación y los conocimientos compartidos, además de permitirme ser su alumno.

Al Dr. Pedro Garcés Yopez, aunque no fue mucho el tiempo compartido, sus enseñanzas fueron muy importantes para mi formación.

Al Dr. Roberto Ruiz, por el apoyo en la realización del estudio en el estado de Querétaro y por las enseñanzas compartidas durante mi estancia en aquel estado.

Al Sr. Martín Prieto L., por permitir la realización de este estudio en el Rancho “La Escondida”, por lo que el Departamento de Reproducción de FMVZ-UNAM y, en particular, un servidor le estamos muy agradecidos por las facilidades mostradas.

Al CONACYT, por la beca-crédito que me facilitó la dedicación de tiempo completo para la realización de mis estudios de maestría.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: JUAN HERBERT HERNÁNDEZ MEDRANO  
FECHA: 07/07/05  
FIRMA: 

**Cuadro 1.** Efecto de la Administración de Clorhidrato de Zilpaterol por 32 días (dosis 0.15 mg/kg P.V.) sobre la Duración del Ciclo Estral, del Diestro, Diámetro del Folículo Ovulatorio y Área Bajo la Curva de Progesterona en Vaquillas Holstein-Friesian (media  $\pm$  error estándar).

	<b>Zilpaterol (n = 10)</b>	<b>Control (n = 10)</b>	<b>Sig. (<math>\alpha</math>)</b>
<b>Ciclo Estral (Días)</b>	21.2 $\pm$ 0.8	21.1 $\pm$ 0.9	p=0.936
<b>Diestro (Días)</b>	16.1 $\pm$ 0.7	14.5 $\pm$ 0.9	p=0.195
<b>Diámetro del Folículo Ovulatorio (mm)</b>	17.3 $\pm$ 0.3	16.8 $\pm$ 0.3	p=0.183
<b>Progesterona, Área bajo la curva (ng/ml)</b>	46.9 $\pm$ 2.9	38.6 $\pm$ 4.6	p=0.138

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

**Cuadro 2.** Intervalo entre la Aplicación de D-Cloprostenol y el Estro, Intervalo del Estro al Pico Preovulatorio de LH y Diámetro del Folículo Preovulatorio en Vaquillas Holstein-Friesian en Fase Folicular, tratadas o no con Clorhidrato de Zilpaterol durante 24 días con una dosis de 0.15 mg/kg P.V.

	<b>Zilpaterol (n=4)</b>	<b>Control (n=4)</b>	<b>Sig. (<math>\alpha</math>)</b>
<b>D-cloprostenol al Estro (hr)</b>	40.50	52	p<0.1
<b>D-cloporstenol al pico de LH (hr)</b>	54*	56.5	p>0.1*
<b>Diámetro Folículo Preovulatorio (mm)</b>	16	14	p>0.1

\* En este caso la n=2, ya que el resto de las vaquillas del grupo zilpaterol presentaron celo antes del inicio del muestreo para LH.

**Cuadro 3.** Efecto de la Administración de Clorhidrato de Zilpaterol (0.15 mg/kg P.V.) sobre el Peso Corporal y la Ganancia Diaria de Peso en Vaquillas Holstein-Friesian (media  $\pm$  error estándar)

	<b>Zilpaterol (n = 15)</b>	<b>Control (n = 15)</b>	<b>Sig. (<math>\alpha</math>)</b>
<b>Peso Inicio (Kg)</b>	352.7 $\pm$ 8.6	344.2 $\pm$ 8.4	p=0.48
<b>Peso Final (Kg)</b>	397.5 $\pm$ 9.0	376.6 $\pm$ 7.3	p=0.03
<b>Ganancia de Peso (Kg)</b>	44.8 $\pm$ 4.9	32.4 $\pm$ 3.7	p=0.03
<b>Ganancia Diaria de Peso (Kg)</b>	1.6 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.1	p=0.02

**Cuadro 4.** Efecto de la Administración de Clorhidrato de Zilpaterol (0.15 mg/kg P.V.) en Grasa Dorsal y Profundidad del Músculo Largo Dorsal en Vaquillas Holstein-Friesian (media  $\pm$  error estándar).

	<b>Zilpaterol (n = 15)</b>	<b>Control (n = 15)</b>	<b>Sig (<math>\alpha</math>)</b>
<b>Grasa Dorsal Inicial (mm)</b>	6.9 $\pm$ 0.3	5.8 $\pm$ 0.2	p=0.002
<b>Grasa Dorsal Final (mm)</b>	5.1 $\pm$ 0.2	6.1 $\pm$ 0.3	p=0.008
<b>Cambio en Grasa Dorsal (mm)</b>	-1.8 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.3	p<0.001
<b>Profundidad Muscular (mm)</b>	53.3 $\pm$ 1.6	45.8 $\pm$ 1.2	p=0.001

**Cuadro 2.** Intervalo entre la Aplicación de D-Cloprostenol y el Estro, Intervalo del Estro al Pico Preovulatorio de LH y Diámetro del Folículo Preovulatorio en Vaquillas Holstein-Friesian en Fase Folicular, tratadas o no con Clorhidrato de Zilpaterol durante 24 días con una dosis de 0.15 mg/kg P.V.

	<b>Zilpaterol (n=4)</b>	<b>Control (n=4)</b>	<b>Sig. (<math>\alpha</math>)</b>
<b>D-cloprostenol al Estro (hr)</b>	40.50	52	p<0.1
<b>D-cloporstenol al pico de LH (hr)</b>	54*	56.5	p>0.1*
<b>Diámetro Folículo Preovulatorio (mm)</b>	16	14	p>0.1

\* En este caso la n=2, ya que el resto de las vaquillas del grupo zilpaterol presentaron celo antes del inicio del muestreo para LH.



## CONTENIDO

	<b>Página</b>
Dedicatorias	I
Agradecimientos	II
Resumen	III
Abstract	IV
1. Introducción	1
1.1 Hipótesis	2
1.2 Objetivo General	2
1.3 Objetivos Específicos	2
2. Revisión de Literatura	3
2.1 Ciclo Estral	3
2.1.1 Endocrinología del Ciclo Estral	3
2.1.2 Dinámica Folicular	5
2.1.3 Ovulación	7
2.1.4 Regresión del Cuerpo Lúteo (Luteólisis)	9
2.2 Sistema Nervioso Autónomo	13
2.2.1 Divisiones del Sistema Nervioso Autónomo	13
2.2.1.1 Metabolismo de los Neurotransmisores	14
2.2.1.2 Receptores Autónomos	15
2.2.1.3 Tipos de Receptores Adrenérgicos	16
2.2.1.4 Transducción de la Señal	18
2.2.2 Inervación Autónoma del Ovario	19
2.2.2.1 Inervación intrínseca	20
2.2.2.2 Neurotrofinas	21
2.2.2.3 Origen de las Catecolaminas en el Ovario	21
2.2.2.4 Receptores Adrenérgicos del Ovario	22
2.2.2.5 Efectos Inducidos por los receptores $\beta$ -Adrenérgicos	23

2.3	Compuestos Agonistas $\beta$ -Adrenérgicos	25
2.2.3	Farmacocinética	25
2.2.3.1	Vida Media	26
2.2.4	Mecanismo de Acción	27
2.2.5	Efectos en Tejido Muscular	28
2.2.6	Efectos sobre Tejido Adiposo	29
2.2.7	Efectos Endocrinos y Metabólicos	30
2.2.8	Variación en la respuesta a los Agonistas $\beta$ -Adrenérgicos	32
2.2.9	Uso de los Agonistas $\beta$ -Adrenérgicos en la Producción Animal	33
3	Material y Métodos	35
3.1	Diseño Experimental	37
3.2	Análisis Estadístico	40
4	Resultados	41
4.1	Experimento I. Efectos del Zilpaterol sobre el Ciclo Estral	41
4.2	Experimento II. Efecto del Zilpaterol en la Fase Folicular del Ciclo Estral	42
4.3	Fertilidad	42
4.4	Evaluación del Peso, Condición y Composición Corporal	43
5	Discusión y Conclusión	44
6	Literatura Citada	49
7	Apéndices y Anexos	58

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Efecto de la Administración de Clorhidrato de Zilpaterol por 32 días (dosis 0.15 mg/kg P.V.) sobre la Duración del Ciclo Estral, Días en Diestro y Diámetro del Folículo Ovulatorio en Vaquillas Holstein Friesian.	59
<b>Cuadro 2.</b> Intervalo entre la aplicación de D-Cloprostenol y el Estro, del Estro al pico preovulatorio de LH y Diámetro del Folículo Preovulatorio en Vaquillas Holstein-Friesian en Fase Folicular, tratadas o no con Clorhidrato de Zilpaterol durante 24 días a dosis de 0.15 mg/kg P.V.	60
<b>Cuadro 3.</b> Efecto de la Administración de Clorhidrato de Zilpaterol (0.15 mg/kg P.V.) sobre el Peso Corporal y la Ganancia Diaria de Peso en Vaquillas Holstein-Friesian.	61
<b>Cuadro 4.</b> Efecto de la Administración de Clorhidrato de Zilpaterol (0.15 mg/kg P.V.) en Grasa Dorsal y Profundidad del Músculo Largo Dorsal en Vaquillas Holstein-Friesian.	62
<b>Figura 1.</b> Diseño del Experimento I	63
<b>Figura 2.</b> Concentraciones séricas promedio de Progesterona durante el ciclo estral de vaquillas Holstein tratadas o no con 0.15 mg/kg P.V. de Clorhidrato de Zilpaterol (Zilmax <sup>®</sup> , Intervet).	64
<b>Figura 3.</b> Concentraciones séricas promedio de Insulina en vaquillas Holstein tratadas o no con Clorhidrato de Zilpaterol (Zilmax <sup>®</sup> , Intervet) a una dosis de 0.15 mg/kg P.V.	65
<b>Figura 4</b> Concentraciones séricas promedio de IGF-I en vaquillas Holstein tratadas o no con Clorhidrato de Zilpaterol (Zilmax <sup>®</sup> , Intervet) a una dosis de 0.15 mg/kg P.V.	66
<b>Figura 5.</b> Concentraciones de progesterona en el día 7 del ciclo estral y 24 horas después de la aplicación de D-Cloprostenol en vaquillas Holstein tratadas o no con clorhidrato de zilpaterol (Zilmax <sup>®</sup> , Intervet) por 24 días a una dosis de 0.15mg/kg P.V.	67

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue conocer el efecto del zilpaterol (agonista beta-adrenérgico) sobre el ciclo estral en vaquillas. Se emplearon 30 vaquillas Holstein-Friesian, sincronizadas con D-Cloprostenol y divididas en dos grupos: control y zilpaterol. Las últimas fueron suplementadas con zilpaterol por 32 días. Se hicieron dos estudios donde se evaluó el efecto del zilpaterol en: 1) La fase lútea y dinámica folicular durante el ciclo estral, así como las concentraciones de progesterona, IGF-I e insulina, y 2) la luteólisis y la ovulación. El zilpaterol adelantó la presentación del estro (Zilpaterol, 40.5 hrs vs. Control, 52 hrs,  $p=0.07$ ) sin afectar la fertilidad. Las concentraciones de progesterona antes y después de la aplicación de D-cloprostenol fueron similares ( $p>0.05$ ) entre grupos. La duración del ciclo estral (Zilpaterol,  $21.2\pm 0.8$  días vs. Control,  $21.1\pm 0.9$  días), el diestro (Zilpaterol,  $16.1\pm 0.7$  días vs. Control,  $14.5\pm 0.9$  días) y diámetro del folículo preovulatorio (Zilpaterol,  $17.3\pm 0.3$ mm vs. Control  $16.8\pm 0.3$ mm) fueron similares ( $p>0.05$ ). Las concentraciones de progesterona y el área bajo la curva no difirieron entre grupos ( $p>0.05$ ). En animales suplementados con zilpaterol la grasa dorsal disminuyó en 26% y la profundidad muscular aumentó (Zilpaterol,  $53.33\pm 1.6$ mm vs. Control,  $45.80\pm 1.2$ mm). La ganancia diaria de peso en ambos grupos difirió ( $p<0.05$ ) en 0.5 kg, lo que se refleja en el peso final: Zilpaterol=  $397.5\pm 9$  kg vs. Control=  $376.6\pm 7.3$  kg. La condición corporal al final fue medio punto más alta para los animales tratados. Las concentraciones de insulina durante la suplementación fueron menores ( $p<0.05$ ) en los animales tratados con zilpaterol mientras que las de IGF-I no difirieron. En conclusión, el zilpaterol adelantó la presentación del estro y la ovulación en las hembras sin afectar negativamente la fertilidad, la duración del ciclo estral o la dinámica folicular, pero mejorando la ganancia diaria de peso, el peso final y masa muscular.

**Palabras Clave:** Zilpaterol;  $\beta$ -Agonistas; Ciclo Estral; Dinámica Folicular; Ovulación; Luteólisis.

## ABSTRACT

The aim of this study was to establish the effect of zilpaterol chloride (beta-adrenergic agonist) on the oestrous cycle in heifers. Thirty Holstein-Friesian heifers were divided in two groups (treated and control) and supplemented with zilpaterol for 32 days. Oestrus was synchronized with D-cloprostenol. The study was divided in two experiments in order to evaluate the effect of zilpaterol on: 1) luteal phase, follicular dynamics during the oestrous cycle and the serum concentrations of progesterone, insulin and IGF-I, 2) luteolysis and ovulation. In the zilpaterol-treated heifers, oestrus occurred earlier than in control heifers ( $p < 0.1$ ) and fertility was not affected. Plasmatic progesterone concentrations before and after D-cloprostenol were similar between groups ( $p > 0.05$ ). Oestrous cycle length (zilpaterol,  $21.2 \pm 0.8$  days vs. control,  $21.1 \pm 0.9$  days), diestrous length (zilpaterol,  $16.1 \pm 0.7$  days vs. control  $14.5 \pm 0.9$  days) and preovulatory follicle diameter (zilpaterol,  $17.3 \pm 0.3$  mm vs. control,  $16.8 \pm 0.3$  mm) were similar between groups ( $p > 0.05$ ). Dorsal fat was reduced 26% in zilpaterol-treated heifers ( $p < 0.05$ ) while *longissimus* dorsal muscle depth increased (zilpaterol,  $53.33 \pm 1.6$  mm vs. control,  $45.80 \pm 1.2$  mm,  $p < 0.05$ ). Average daily weight gain was 0.5 kg greater in zilpaterol-treated heifers than in controls ( $p < 0.05$ ). In addition, final weight was greater in zilpaterol-treated heifers (zilpaterol,  $397.5 \pm 9$  kg vs. control,  $376.6 \pm 7.3$  kg,  $p < 0.05$ ), which also had a better body condition score ( $p < 0.05$ ). Insulin serum concentrations during zilpaterol supplementation were lower in treated heifers ( $p < 0.05$ ) while IGF-I serum concentrations were not altered by treatment ( $p > 0.05$ ). In conclusion, zilpaterol caused an earlier oestrus presentation and ovulation in treated heifers than in controls; however it did not affect fertility, oestrous cycle length or follicular dynamics. In addition, zilpaterol enhanced average daily weight gain, final weight and muscular accretion.

**Key Words:** Zilpaterol; Beta-Adrenergic Agonists; Oestrous Cycle; Follicular Dynamics; Ovulation; Luteolysis.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (A $\beta$ A) son análogos sintéticos de las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), y al unirse a su receptor provocan la liberación de AMPc y la activación de proteína cinasa A (Smith, 1998). En medicina humana, los A $\beta$ A son empleados como fármacos broncodilatadores y tocolíticos. En veterinaria, los A $\beta$ A se emplean como promotores de crecimiento por su efecto anabólico en el músculo esquelético y catabólico en el tejido adiposo. En el músculo esquelético favorece la deposición de proteína a través de un incremento en la síntesis y una disminución en la proteólisis y oxidación de aminoácidos. Mientras que en el tejido adiposo provoca un incremento en la lipólisis y disminución en la lipogénesis (Mersmann, 1998). Además, los A $\beta$ A pueden provocar la disminución en el consumo diario al hacer más eficiente el uso de los nutrientes (NRC, 1994). Debido a lo anterior, a estos compuestos se les conoce como agentes repartidores de nutrientes (NRC, 1994). Sin embargo, poco se conoce acerca de los efectos de los A $\beta$ A sobre la reproducción.

En estudios realizados con ratas (Illera *et al.*, 2003) y cerdos (Biolatti *et al.*, 1994) se encontró que la administración crónica de un A $\beta$ A provoca la formación de quistes foliculares. Se sabe que en vacas con quistes foliculares los niveles de LH son elevados pero no ocurre el pico preovulatorio, lo que puede deberse a una falla en la retroalimentación positiva entre estrógenos y LH (Webb *et al.*, 1998). Sin embargo, no se conoce el mecanismo mediante el cual los A $\beta$ A provocan la formación de quistes foliculares, pero se sabe que los niveles séricos de progesterona y oxitocina se elevan.

En el cuerpo lúteo bovino, *in vivo* e *in vitro*, los fármacos A $\beta$ A ocasionan un incremento en la liberación de progesterona y oxitocina (Kotwica *et al.*, 2002). Los A $\beta$ A incrementan la liberación de progesterona estimulando a las enzimas esteroideogénicas (P450<sub>scc</sub> y  $3\beta$ HSD), y estimulando directamente a las células lúteas grandes provocan la liberación de oxitocina (Miszkiel y Kotwica, 2001). Debido a los efectos reportados de los A $\beta$ A sobre la producción de oxitocina se podría pensar que estos compuestos son capaces de acortar el ciclo estral en las vacas.

El zilpaterol es un compuesto A $\beta$ A que ha sido aprobado en México para su uso en animales. En bovinos aumenta la ganancia de peso mediante una ganancia neta de músculo, sin afectar la cantidad de grasa en la canal y disminuye el consumo alimenticio (Plascencia *et al.*, 1999). Sin embargo, la información acerca de los efectos de este compuesto en el ciclo estral no existe.

### **1.1 HIPÓTESIS**

Los compuestos A $\beta$ A alteran la dinámica folicular, los patrones de secreción de progesterona y la duración del ciclo estral.

### **1.2 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los efectos del zilpaterol sobre la dinámica folicular, la duración del ciclo estral y los patrones de secreción de progesterona y LH en vaquillas Holstein.

### **1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Evaluar los efectos del zilpaterol sobre:

1. La dinámica folicular y patrones de secreción de la progesterona.
2. La fase folicular del ciclo estral: luteólisis y pico preovulatorio de LH.
3. La fertilidad.
4. La condición y composición corporales.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA.**

### **2.1.1 CICLO ESTRAL**

El ciclo estral (CE) es la serie de eventos ováricos, endocrinos y conductuales recurrentes que tienen como objeto la ovulación, el apareamiento y la gestación. En los bovinos la duración varía de 17 a 25 días, y comprende al periodo ocurrido entre estro y estro (Bearden y Fuquay, 2000). Se ha dividido al ciclo estral en 4 etapas: a) Estro, etapa de receptividad sexual (inicio del ciclo (día 0)), con una duración de 12 a 18 horas en bovinos. b) Metaestro: etapa de desarrollo temprano del cuerpo lúteo (CL), en bovinos ocurre la ovulación (10-12 horas del final del estro) y un leve sangrado conocido como sangrado de metaestro. c) Diestro: etapa caracterizada por la funcionalidad total del CL, en la vaca comienza el día 5 cuando se puede detectar el incremento en los niveles sanguíneos de progesterona ( $> 1\text{ng/ml}$ ) y termina con la regresión del CL, día 16-17. d) Proestro: ocurre la regresión del CL y la maduración final del folículo ovulatorio (Aréchiga, 1999).

El ciclo de acuerdo al ambiente hormonal y las estructuras ováricas presentes ha sido dividido en 2 fases: a) fase folicular: predominan estrógenos producidos por los folículos ováricos; en ella inicia la regresión del CL y finaliza con la ovulación (3-6 días), y b) fase lútea: con concentraciones elevadas de progesterona de origen lúteo (16-17 días) (Bearden y Fuquay, 2000).

### **2.1.2 ENDOCRINOLOGÍA DEL CICLO ESTRAL**

El control del CE requiere de comunicación entre el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios. Adicionalmente debe existir una interacción entre el útero y los ovarios, ya que la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), es importante en la regresión del CL.

Los niveles sanguíneos de progesterona son elevados en el diestro y su disminución ( $< 1\text{ng/ml}$ ) indica el inicio del proestro. Conjuntamente comienza un incremento ligero en la pulsatilidad de LH y estradiol, cercanos al inicio del estro. En el metaestro y la mitad del diestro, se presentan pequeños incrementos séricos de FSH y estrógenos (Aréchiga, 1999).



Durante el diestro, las altas concentraciones de progesterona disminuyen la liberación de FSH y LH a través de retroalimentación negativa hacia el hipotálamo y la hipófisis e inhibe la manifestación de estro. Los pulsos de LH presentes en el diestro mantienen la función del CL y el crecimiento del folículo dominante. Cuando no hay gestación, la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  se libera del útero y es transportada hacia el ovario por un mecanismo de contracorriente entre la vena útero-ovárica y la arteria ovárica. La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  provoca la regresión del CL entre 10 y 14 días posteriores a su formación (Aréchiga, 1999; Bearden y Fuquay, 2000).

Al disminuir la progesterona circulante, la inhibición sobre el hipotálamo desaparece, con lo que comienza la liberación pulsátil creciente, en amplitud y frecuencia, de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y LH. La elevación en los niveles de FSH estimula el crecimiento folicular y el incremento en los niveles de estradiol. Los incrementos de FSH y estradiol que ocurren durante el metaestro y la mitad del diestro favorecen la selección y el crecimiento folicular (Aréchiga, 1999; Bearden y Fuquay, 2000).

La sensibilidad de la hipófisis se incrementa por efecto de la GnRH sobre sus propios receptores incrementando la frecuencia de los pulsos. El incremento en los niveles de estradiol, favorece la formación de receptores ováricos para FSH y LH (Bearden y Fuquay, 2000).

Dos o tres días después de la caída de progesterona, el estradiol alcanza su concentración más alta y mediante retroalimentación positiva hacia el hipotálamo estimula la secreción del pico preovulatorio de GnRH y LH. El pico preovulatorio de LH reinicia la meiosis en el ovocito y estimula la ovulación. Este pico ocurre en el estro temprano con duración de 6 a 10 horas. La ovulación ocurre de 24 a 30 horas después del pico preovulatorio de LH (Aréchiga, 1999).

Después de la ovulación ocurre la formación del CL. Dos a cuatro días después de la ovulación los niveles de progesterona se incrementan ( $> 1\text{ng/ml}$ ) indicando el inicio del diestro. La LH incrementa el flujo sanguíneo hacia el CL estimulando la formación y función del CL, junto con otras hormonas (Aréchiga, 1999).

### **2.1.3 DINÁMICA FOLICULAR**

El crecimiento folicular en los bovinos tiene un patrón de oleada. Por cada ciclo estral se presentan de dos a tres oleadas foliculares (Ginther, 2000; Sartori *et al.*, 2004). Cada oleada se caracteriza por la emergencia de un grupo de folículos de 4 mm, el crecimiento de algunos de éstos por pocos días, y la selección de un folículo dominante que continúa creciendo hasta alcanzar el diámetro preovulatorio, mientras los demás sufren atresia (Ginther, 2000).

El crecimiento de los folículos antrales desde 300  $\mu\text{m}$  hasta 3-5 mm toma hasta 30 días. Este crecimiento folicular temprano es considerado independiente de gonadotropinas (Webb *et al.*, 2003). El crecimiento folicular siguiente es rápido con tasas de hasta 2 mm diarios, detectado en folículos dominantes (Mihm *et al.*, 2002; Webb *et al.*, 2003), fase dependiente de gonadotropinas (FSH).

Después de la ovulación, ocurre un aumento peri-ovulatorio de FSH que estimula el crecimiento de varios folículos pequeños (emergencia: 1<sup>o</sup>-3<sup>o</sup> día del ciclo estral) (Mihm *et al.*, 2002). La concentración de FSH llega a su pico cuando el folículo más grande alcanza un diámetro cercano a los 4-5 mm (Ginther, 2000). Cuando la FSH comienza a descender (2-3 días después de la emergencia), el número de folículos disminuyen, siendo pocos los que continúan creciendo y sólo uno de ellos es seleccionado (folículo dominante). Los demás se vuelven estáticos y sufren atresia vía apoptosis (folículos subordinados) (Austin *et al.*, 2001). El folículo dominante aumenta la secreción de estradiol aún cuando la FSH está en concentración decreciente, y continúa su crecimiento hasta alcanzar 12-20 mm (Austin *et al.*, 2001; Mihm *et al.*, 2002). La liberación de estradiol e inhibina ocasiona la disminución en la concentración de FSH junto con factores liberados por los folículos

(Ginther, 2000), pero concentraciones bajas de FSH se requieren para los folículos en crecimiento (Mihm *et al.*, 2002; Ginther, 2000).

El crecimiento del folículo dominante y la alta síntesis de estradiol dura 3-4 días, tiempo en el que el CL madura y la progesterona disminuye la secreción pulsátil de LH. El folículo dominante cambia su dependencia hacia LH o sufre atresia (Mihm *et al.*, 2002). El folículo dominante deja de crecer, pierde su dominancia, y disminuye la secreción de estradiol e inhibina, ocasionando otro aumento transitorio en la secreción de FSH que ocasiona el reclutamiento de una nueva oleada folicular y la selección de otro folículo dominante (Sunderland *et al.*, 1994). Si ocurre la luteólisis cuando el segundo folículo alcanza su dominancia este ovulará, en caso contrario sufrirá atresia y surgirá una nueva oleada (Mihm *et al.*, 2002). Con la luteólisis, desaparece la inhibición sobre GnRH ocasionando un incremento en la frecuencia de pulsos de LH que favorecen el crecimiento y la diferenciación final del folículo dominante, estimulando el pulso preovulatorio de LH, la ovulación y la luteinización (Mihm *et al.*, 2002).

La producción de estradiol es un indicador del estado de los folículos. Los folículos dominantes producen mayor cantidad de estrógenos que los subordinados, además de mostrar mayor expresión de los genes para la aromatasas, 3 $\beta$ -hidroxi-esteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD), y receptores de FSH, y la síntesis de receptores para LH en las células de la granulosa (Bao, 1997). Después de la selección y el incremento en las concentraciones de FSH, el folículo dominante incrementa la secreción de inhibina y activina, y bajan los niveles de folistatina (Austin *et al.*, 2001).

Se ha determinado que existe un sistema intraovárico de componentes de la familia de IGF's. En bovinos se han detectado IGF-I, IGF-II, el receptor para IGF, cuatro proteínas que se unen a los IGF's (IGFBP) y una proteasa específica para IGFBP4 (Webb *et al.*, 2003). El IGF libre estimula la proliferación de las células de la granulosa, la síntesis de estradiol, inhibina y activina, *in vitro*, con efectos dependientes de las concentraciones de FSH (Gutiérrez *et al.*, 1997; Mihm *et al.*, 2002). Cuando el folículo dominante es

seleccionado, los niveles de las IGFBP-2, -3, -4 y -5 se mantienen bajos, con biodisponibilidad alta de IGF-I y -II (Austin *et al.*, 2001; Mihm *et al.*, 2002; Armstrong *et al.*, 2002; Webb *et al.*, 2003). Mihm *et al.* (2000), encontraron que los niveles bajos de IGFBP4 y altos de IGF's son esenciales para la selección del folículo dominante, además de permitir la sobrevivencia en concentraciones bajas de FSH y evitar la presentación de apoptosis.

En folículos preovulatorios, las concentraciones de IGF-I incrementan con la actividad estrogénica, mientras las concentraciones intrafoliculares de IGFBP-2, -4 y -5 se reducen. Incrementos en IGFBP-2 y -5 se han reportado en folículos preovulatorios después del pico de gonadotropinas y antes de la ovulación cuando la progesterona intrafolicular se incrementa mientras que el estradiol y los andrógenos disminuyen (Funston *et al.*, 1996; Mihm *et al.*, 2002; Armstrong *et al.*, 2002).

#### **2.1.4 OVULACIÓN**

Es la liberación del ovocito secundario hacia la cavidad peritoneal, cerca del infundíbulo, por la ruptura de la pared folicular. Cuando la oleada preovulatoria de LH estimula al folículo dominante maduro, se inicia el proceso de luteinización de las células de la granulosa y de la teca interna. La ovulación es una parte integral del proceso de luteinización (Espey y Lipner, 1994). La ovulación ocurre 30 horas después del pico preovulatorio de LH.

Cuando se forma el complejo ligando (LH)-receptor, se produce AMP cíclico (AMPC) como segundo mensajero. La transducción de la señal ocasiona un incremento en la enzima citocromo P450<sub>scc</sub>, que promueve la síntesis de progesterona. La elevación de la concentración de progesterona ocasiona una caída en las enzimas citocromo P450<sub>17α</sub> y P450aromatasa, y de los andrógenos y estrógenos ováricos (Espey y Lipner, 1994). Una vez expresado el RNAm para la enzima P450<sub>scc</sub> el proceso de luteinización y la síntesis de progesterona son irreversibles. La luteinización no depende de la ovulación, ya que si el

foliculo no se rompe no impide que se luteinice (Espey y Lipner, 1994; Richards *et al.*, 1998).

Con el pico de gonadotropinas, la progesterona en el líquido folicular comienza a elevarse, poco tiempo después comienza la elevación de prostaglandinas (PGF<sub>2α</sub> y PGE<sub>2</sub>). Las prostaglandinas estimulan la contracción de la pared folicular y contribuyen a la ruptura del foliculo y a la expulsión del ovocito. Estas contracciones van incrementando conforme se acerca la ovulación (Bearden y Fuquay, 2000).

El pico de gonadotropinas estimula la expresión de genes importantes para la ovulación en las células de la granulosa: receptor de progesterona y prostaglandin-endoperoxido-sintetasa-2 (Richards *et al.*, 1998).

La ovulación involucra cambios en la matriz extracelular por la activación de cascadas proteolíticas, como la de la colagenasa. Las hormonas que activan las vías de protein-cinasa A y C, inducen la expresión de los genes para colagenasa “verdadera”, encargada de degradar al colágeno tipo I. Además en ovarios de ratón y rata, existen dos colagenasas involucradas en la lisis de la membrana basal: colagenasa tipo IV y colagenasa tipo V. En ratas, la LH induce la síntesis de colagenasa tipo V (Richards *et al.*, 1998). Además, la ovulación inducida por LH activa a las calicreinas, que son sintetizadas como proenzimas, y controladas por otras cascadas proteolíticas. Las calicreinas actúan sobre sustratos específicos (cininógenos) para liberar cininas bioactivas como la calidina y la bradicinina. Estas sustancias son responsables de la vasodilatación y el aumento en la permeabilidad vascular ocurrido durante la ovulación (Bhoola *et al.*, 1992; Espey y Lipner, 1994). Momentos previos a la ovulación se presenta el reclutamiento e invasión de células inflamatorias: leucocitos (p.e. neutrófilos) y macrófagos, reguladas por citocinas secretadas por las células inmunes y ováricas (Norman *et al.*, 1994).

En la ovulación ocurre la desintegración y ruptura de un área en la porción apical del foliculo, el estigma (Espey y Lipner, 1994; Richards *et al.*, 1998). Simultáneamente,

ocurre una reorganización y remodelación del folículo y tejido adyacente conforme las células de la granulosa y de la teca se luteinizan (Richards *et al.*, 1998). La capa de células de la granulosa se disocia sólo en la porción apical y finalmente desaparece, mientras que las células de la teca pierden cohesión por el aumento en el líquido folicular que ocasiona un edema local, y por la destrucción de las fibras de colágeno de la membrana basal (Hafez y Hafez, 2002).

Las prostaglandinas estimulan la contracción del ovario y contribuyen a la ruptura del folículo y a la expulsión del ovocito. Estas concentraciones van incrementando conforme se acerca la ovulación. La ovulación puede ocurrir en cualquier parte de la superficie ovárica y en cualquiera de los ovarios (Beraden y Fuquay, 2000).

#### **2.1.5 REGRESIÓN DEL CUERPO LÚTEO (LUTEÓLISIS)**

La luteólisis se presenta en forma funcional y estructural. Primero ocurre una pérdida en la capacidad para sintetizar y secretar progesterona, seguido de una pérdida de las células que forman al CL. En los bovinos la regresión del cuerpo lúteo depende de la presencia del útero (Niswender *et al.*, 1994). La luteólisis es causada por una liberación pulsátil de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  del útero hacia el ovario, por un intercambio de contracorriente entre la vena uterina y la arteria ovárica (Niswender *et al.*, 1994).

La progesterona regula el periodo de vida del CL. La exposición a progesterona durante el diestro temprano y medio controla la liberación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  por parte del endometrio (Schams y Berisha, 2004). En condiciones *in vitro* se ha encontrado que el endometrio es capaz de liberar  $\text{PGF}_{2\alpha}$  después del día 12 del ciclo estral, cuando pierde sensibilidad hacia la progesterona. Esta sensibilidad está relacionada con la regulación de los receptores para estrógenos, oxitocina y progesterona en el endometrio uterino. Así, la ciclicidad en la sensibilidad a progesterona y en la regulación de los receptores para estrógenos y oxitocina en el endometrio, son importantes para la regresión del CL (Schams y Berisha, 2004).

Se postula que el inicio de la luteólisis es debido a la acción de los estrógenos liberados por el folículo que provocan la liberación de oxitocina hipofisiaria y que estimulan la liberación de una pequeña cantidad de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  uterina. Después comienza una retroalimentación positiva entre oxitocina y  $\text{PGF}_{2\alpha}$  provenientes del CL y el útero, respectivamente (Niswender *et al.*, 2000).

Una de las principales acciones de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  es la disminución del flujo sanguíneo hacia el CL, ocasionando la luteólisis debido a una disminución de nutrientes, de sustratos para la esteroidogénesis y del soporte luteotrópico (Acosta *et al.*, 2004; Schams y Berisha, 2004). La disminución en el flujo sanguíneo se debe a que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  provoca degeneración de las células endoteliales en el CL generando una disminución en la densidad capilar (Niswender *et al.*, 2000). En un estudio realizado por Acosta *et al.* (2002) en el que evaluaron los cambios vasculares en el CL después de la aplicación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  encontraron que durante las primeras 0.5 – 2 hrs de la aplicación, el flujo sanguíneo se eleva; disminuye a las 4 hrs al nivel observado al momento de la aplicación y luego comienza a decrecer paulatinamente entre las 8 a 48hrs siguientes. Las concentraciones de progesterona disminuyeron de 4.7 ng/ml (0hrs) a 0.6 ng/ml en 24 hrs.

Se ha involucrado a la Endotelina-I (ET-I) y Angiotensina II (Ang II) como mediadores de los efectos de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en los cambios en el flujo sanguíneo. La ET-I se ha encontrado en el CL de bovinos mostrando concentraciones bajas durante la etapa lútea temprana, y altas durante la luteólisis (Girsh *et al.*, 1996). Estos agentes vasoactivos pueden ocasionar la disminución en el flujo sanguíneo e iniciar la cascada de eventos luteolíticos. La ET-I y la Ang II pueden actuar como agentes vasoconstrictores durante la luteólisis funcional, e incluso induciendo apoptosis durante la luteólisis estructural. (Niswender *et al.*, 2000; Schams y Berisha, 2003).

Los receptores de alta afinidad para  $\text{PGF}_{2\alpha}$  se encuentran en las células lúteas grandes (Fitz *et al.*, 1982). El receptor se encuentra unido a proteína  $G_q$ , por lo que la unión ligando-receptor activa la enzima fosfolipasa C que libera inositol trifosfato (IP3) y

diacilglicerol (DAG). El IP3 induce la liberación de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) por parte del retículo endoplásmico rugoso. Las altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y el DAG (unido a la membrana plasmática) activan a la proteína-quinasa C (PKC) (Berridge e Irvine, 1989). La activación de PKC en las células lúteas grandes ocasiona una modificación en la síntesis de las proteínas para la esteroidogénesis, en la disponibilidad de colesterol y en el mantenimiento de la matriz extracelular (Wiltbank *et al.*, 1991).

La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  provoca la inhibición de la síntesis de progesterona, aunque el mecanismo no es claro. La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  provoca una disminución en el RNAm para el receptor de LH. Sin embargo, en bovinos y ovinos, esta disminución ocurre después de la caída de progesterona. La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  puede interferir en la transducción de la señal de LH evitando la activación de la proteína-quinasa A, ya sea disminuyendo la actividad de la adenilato ciclasa o incrementando la actividad de la fosfodiesterasa, que resulta en la disminución en la concentración intracelular de AMPc (Niswender *et al.*, 2000).

La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  afecta el transporte intracelular de colesterol con lo que disminuye la secreción de progesterona. La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  provoca distorsión en el citoesqueleto, observándose que células lúteas de ovinos, después del tratamiento con  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , poseen menor concentración de tubulina (Murdoch *et al.*, 1996). También el tratamiento con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ocasiona una disminución en la concentración de la proteína StAR (proteína reguladora esteroidogénica aguda), responsable del transporte de colesterol de la membrana mitocondrial externa hacia la interna (citocromo  $\text{P450}_{\text{scc}}$ ), con lo que se disminuye la liberación de progesterona (Pescador, 1996). Este mecanismo de inhibición parece ser el principal para disminuir la síntesis de progesterona (Niswender *et al.*, 2000).

Durante la luteólisis ocurre infiltración de células inflamatorias como linfocitos T y macrófagos. La principal función de los macrófagos es la de fagocitar las células lúteas en degeneración y la degradación de la matriz extracelular (Niswender, 2000). Los macrófagos y linfocitos liberan varias citocinas pro-inflamatorias: interferón gamma ( $\text{IFN}\gamma$ ), interleucina  $1\beta$  ( $\text{IL-1}\beta$ ) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ) (Davis, 1996). Los



tres tipos de citocinas estimulan la liberación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  por parte del CL, además el  $\text{TNF}\alpha$  es capaz de inhibir la secreción de progesterona inducida por LH, *in vitro* (Fairchild *et al.*, 1992). La combinación entre  $\text{IFN}\gamma$  y  $\text{TNF}\alpha$  tiene un efecto altamente citotóxico (Fairchild *et al.*, 1992; Davis *et al.*, 1996). Por tanto, se considera que las citocinas pro-inflamatorias pueden estar involucradas en la luteólisis funcional y estructural, ya que favorecen la inducción de apoptosis en el tejido lúteo (Neuvians *et al.*, 2004).

Durante la luteólisis estructural, el número de células lúteas disminuye a la mitad dentro de las primeras 24 horas después de la aplicación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en ovinos en fase lútea media. Además hay una disminución en el tamaño de las células lúteas grandes. Los cambios provocados en células lúteas grandes y células lúteas pequeñas se hacen evidentes de 24 a 36 horas posteriores a la administración de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Niswender *et al.*, 2000). Sawyer *et al.* (1990), trabajando con células lúteas ovinas encontraron que el número de células con cambios nucleares indicativos de apoptosis (p.e. condensación nuclear y marginación nuclear) aumentó 12 hrs después de la aplicación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

## **2.2 SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO**

### **2.2.1 DIVISIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO**

El sistema nervioso autónomo (SNA) inerva y controla todos los órganos del cuerpo regulando procesos vitales. El SNA está dividido en sistema simpático y parasimpático y en conjunto inervan al músculo liso de todos los órganos, músculo cardíaco, vasos sanguíneos y glándulas, exocrinas y endocrinas. La función principal del SNA es el mantenimiento de la homeostasis en el organismo (Cardinali y Dvorkin, 1999).

El SNA posee dos nervios periféricos: preganglionar, cuyo cuerpo celular está dentro del sistema nervioso central, y posganglionar, cuyo cuerpo neuronal se encuentra en una estructura denominada ganglio (Cardinali y Dvorkin, 1999; Cunningham, 2002).

La comunicación entre las neuronas del SNA está mediada por 2 neurotransmisores principales: acetilcolina (Ach) y noradrenalina (NA). Según el neurotransmisor empleado, las sinapsis se conocen como colinérgicas (Ach) o adrenérgicas (NA) (Cunningham, 2002).

La Ach es el neurotransmisor de la sinapsis neuromuscular del SN somático y de los ganglios autónomos. En el SNA las sinapsis posganglionares parasimpáticas emplean Ach (colinérgicas), mientras que las simpáticas secretan NA (adrenérgicas). Sin embargo, algunas sinapsis posganglionares simpáticas que inervan los vasos sanguíneos del músculo esquelético y las glándulas sudoríparas, emplean Ach como neurotransmisor (Cunningham, 2002).

En el SNA ocurre el fenómeno de co-transmisión, ya que existen neurotransmisores del mismo o diferente tipo en las terminales nerviosas: la Ach coexiste con el VIP (péptido vasoactivo intestinal) en la mayoría de las sinapsis posganglionares parasimpáticas, y el neuropéptido Y con la noradrenalina en las sinapsis posganglionares simpáticas (Cardinali y Dvorkin, 1999). En los ganglios simpáticos la noradrenalina, dependiendo de las neuronas, coexiste con neuropéptido Y, dinorfina, somatostatina o encefalina, mientras que

en las terminales preganglionares se observa la coexistencia de Ach con CGRP (Péptido Relacionado al Gen de la Calcitonina) o sustancia P (Cardinali y Dvorkin, 1999).

### **2.2.1.1 METABOLISMO DE LOS NEUROTRANSMISORES**

#### *Acetilcolina (Ach)*

La síntesis de la Ach se lleva a cabo mediante la acetilación de la colina catalizada por la enzima colina-acetiltransferasa. El catabolismo de esta sustancia se lleva a cabo en el espacio sináptico mediante una reacción de hidrólisis a través de la enzima acetilcolinesterasa (Cardinali y Dvorkin, 1999; Cunningham, 2002).

#### *Noradrenalina (NA)*

##### Síntesis

Las catecolaminas (noradrenalina (NA) y adrenalina (A)) son sintetizadas a partir de la tirosina. Este proceso es llevado a cabo en el SNC, en las neuronas posganglionares simpáticas y en las células cromafines de la médula adrenal (MacHadley, 1988).

La tirosina es transformada en dihidroxifenilalanina (DOPA) por la enzima tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en el proceso de biosíntesis de las catecolaminas. La actividad de esta enzima es regulada mediante retroalimentación negativa a través de la concentración citoplasmática de catecolaminas, por lo que una estimulación crónica genera un incremento en los niveles celulares de la TH. El siguiente paso es la descarboxilación de la DOPA mediante la enzima DOPA-descarboxilasa, liberando la dopamina (DA). Esta última es hidroxilada por la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH), y transformada en NA. Posteriormente la NA es transformada en A mediante la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT), en la médula adrenal (MacHadley, 1988).

##### Catabolismo

La NA y la A son catabolizadas en el exterior de la célula por la enzima catecol-o-metil transferasa (COMT) en normetanefrina y metanefrina, respectivamente. La COMT se localiza en el citosol de las células blanco del sistema simpático, en las cercanías del

receptor autónomo (MacHadley, 1988; Cardinali, 1999; Cunningham, 2002). La enzima mono-amino oxidasa (MAO) se localiza en la superficie de la membrana externa de las mitocondrias y evita la acumulación de catecolaminas en el citoplasma. Debido a la acción secuenciada de ambas enzimas el principal metabolito excretado en orina es el ácido 3-metoxi-5-hidroximandélico o ácido vanilil-mandélico (VMA) (MacHadley, 1988; Cardinali y Dvorkin, 1999).

El mecanismo principal para controlar el efecto de la NA en el espacio sináptico es mediante su recaptación intacta por parte de la neurona presináptica. La NA acumulada en el espacio se une a un receptor  $\alpha$ -adrenérgico en la membrana de la neurona presináptica con lo que se activa la absorción e impide la síntesis. Cuando este mecanismo se satura, inicia la actividad de las enzimas: COMT y MAO (MacHadley, 1988; Cardinali y Dvorkin, 1999).

### 2.2.1.2 RECEPTORES AUTÓNOMOS

#### *Receptores Colinérgicos*

Existen 2 tipos: muscarínicos y nicotínicos. Los receptores muscarínicos se encuentran en las sinapsis posganglionares del músculo liso, corazón y glándulas, así como en el SNC y los ganglios autónomos. Se distinguen 5 tipos, asociados a proteína G (Cardinali y Dvorkin, 1999):

- M1: asociado a una disminución en la conductancia del  $K^+$  (excitatorio) en la corteza cerebral y ganglios autónomos.
- M2 y M4: asociados a un aumento de la conductancia del  $K^+$  (inhibitorio, por fosforilación del canal específico por el AMPc), presente en el corazón y en varios tejidos con neuronas presinápticas del parasimpático.
- M3 y M5: son parecidos al M1, presentes en músculo liso y células glandulares.

Los receptores nicotínicos se localizan en los ganglios simpáticos, SNC y placa muscular. Se asocian con la apertura de canales de  $Na^+$ , lo que genera la despolarización de

las membranas neuronales. Se han identificado 4 subtipos de receptores: Muscular, Ganglionar, Neuronal del SNC y  $\alpha 7$  Neuronal (Cardinali y Dvorkin, 1999).

### *Receptores Adrenérgicos*

Existen dos tipos de receptores adrenérgicos:  $\alpha$  y  $\beta$ . Pertenecen a la superfamilia de los receptores asociados a Proteína G. El efecto desencadenado por la estimulación de cada uno de estos receptores varía según sea la sustancia que se une, por ejemplo, los receptores  $\alpha$  responden de la siguiente manera  $A > NA > \text{isoproterenol}$  (agonista  $\beta$ -adrenérgico), mientras que los receptores  $\beta$ :  $\text{isoproterenol} > A \geq NA$ . En general se puede decir que la estimulación de receptores  $\alpha$  promueve la contracción de la musculatura lisa, mientras que la de los receptores  $\beta$  ocasiona su relajación (MacHadley, 1988).

Las células efectoras (células musculares lisas, cardíacas, y de glándulas) autónomas pueden tener receptores adrenérgicos  $\alpha$  y  $\beta$ , o únicamente  $\beta$ . La contracción de la musculatura lisa, con excepción del músculo liso intestinal, es regulada a través de los receptores adrenérgicos  $\alpha$ , mientras que la relajación, con excepción del músculo cardíaco, es controlada por los receptores adrenérgicos  $\beta$ . En los tejidos donde predominan los receptores adrenérgicos  $\alpha$ , sus efectos enmascaran a los  $\beta$ . Algunos tejidos como los bronquios sólo poseen receptores  $\beta$  en el tejido muscular liso, por lo que siempre se relajan en respuesta a las catecolaminas (McHadley, 1988).

### **2.2.1.3 TIPOS DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS**

#### *Receptores Adrenérgicos $\alpha$*

Estos receptores se subdividen en  $\alpha_1$  (con subtipos: 1A, 1B y 1D), y los  $\alpha_2$  (con subtipos:  $\alpha_2A$ ,  $\alpha_2B$  y  $\alpha_2C$ ). Los  $\alpha_1$  se han localizado en arterias (arteria renal en ratas), y en corazón (Strosberg, 1993). Los receptores  $\alpha_2$  fueron localizados en la porción presináptica, con un efecto autoinhibitorio de la liberación de NA (MacHadley, 1988; Cardinali y Dvorkin, 1999). También se han descrito receptores  $\alpha_2$  en el SNC con localización postsináptica.

### *Receptores Adrenérgicos $\beta$*

Se subdividen en  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ . La principal diferencia entre los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  es la sensibilidad a la A. Los  $\beta_1$  responden a la A circulante o a la liberación neural de NA. El agonista natural de los receptores  $\beta_2$  es la A. La sensibilidad a diversos  $\beta$ -agonistas es:  $\beta_1 = \text{isoproterenol} > \text{NA}$ ,  $\beta_2 = \text{Clenbuterol}$ ,  $\text{NA} \geq \text{isoproterenol}$  y  $\beta_3 = \text{isoproterenol} > \text{NA}$ . Estos receptores difieren en el largo de la cadena de aminoácidos:  $\beta_1$ , 477 aminoácidos,  $\beta_2$ , 413 aminoácidos y  $\beta_3$ , 408 aminoácidos (Strosberg, 1993). La homología de los tres subtipos de receptores  $\beta$ -adrenérgicos entre especies es de 45- 60%, mientras la homología entre especies para cada subtipo es mayor al 70%. A pesar de la alta homología, la secuencia de aminoácidos varía, lo que genera variación en la unión y/o la respuesta al ligando (Mersmann, 2002).

La localización de estos receptores está muy relacionada con los efectos que éstos inducen. Se han encontrado que receptores  $\beta_1$  son post-sinápticos, pero pueden hallarse pre-sinápticos y están localizados en el corazón, en plaquetas y glándulas salivales. Su activación ocasiona incrementos en la fuerza de contracción y en la frecuencia cardiaca, agregación plaquetaria y secreción de amilasa de las glándulas salivales. Si se encuentra en la porción pre-sináptica, al activarse ocasiona un incremento en la liberación de noradrenalina (Norman, 1997).

Los receptores  $\beta_2$ , también son post-sinápticos y están localizados en vasos sanguíneos, bronquios, tracto gastro-intestinal, músculo esquelético, hígado y células cebadas; su activación genera vasodilatación, broncodilatación, disminución de la motilidad y tono gástrico e intestinal, induce relajación de la vesícula y ductos biliares, provoca relajación del miometrio, induce glucogenólisis en hígado, en páncreas induce la liberación de insulina y glucagon. En músculo provoca la glucogenólisis y la producción de lactato, también se le ha asociado con la ganancia de tejido muscular (MacHadley, 1988; NRC, 1994).

Los receptores  $\beta_3$  se han encontrado principalmente en ratas en el tejido adiposo y se ha encontrado RNAm en el músculo esquelético, hígado e ileon. En experimentos recientes se ha encontrado RNAm de este receptor en cerebelo, hipocampo y cuerpo estriado, así mismo se ha reportado en el corazón, estómago, colon e ileon. Estos receptores al ser activados ocasionan lipólisis y termogénesis, y reduce el consumo voluntario e incluso puede tener efectos antidepresivos (Norman, 1997).

#### 2.2.1.4 TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL

##### *Receptores Adrenérgicos $\alpha$*

El mecanismo de acción del receptor  $\alpha_1$  es ocasionando un aumento en la conductancia al  $\text{Ca}^{2+}$  y la activación de la proteína Gq, ocasionando producción de inositol-3P (IP3) y diacil-glicerol (DAG) por lo que su actividad es activar enzimas dependientes de calcio: calpains. Mientras que el mecanismo para el receptor  $\alpha_2$  es la inhibición de la adenilato ciclasa, por lo que reduce el AMPc intracelular, evitando la actividad de enzimas dependientes de este.

##### *Receptores Adrenérgicos $\beta$*

Estos receptores poseen más de 400 aminoácidos en cadena lineal, con 7 sitios hidrofóbicos transmembranales que unen al receptor a la membrana plasmática. Hay 4 porciones (asas) extracelulares y 4 intracelulares. El sitio de unión del ligando está formado por los 7 sitios transmembranales. Mediante fluorescencia se encontró que un antagonista  $\beta_2$  (corazolol) fue introducido 10.9 Å en la porción central hidrofóbica del receptor. El aminoácido más importante es el aspartato localizado en la tercera porción transmembranal, conservado en todos los tipos de receptores adrenérgicos (Strosberg, 1993). Este tipo de receptores se encuentran unidos a proteínas Gs con el sitio de interacción con el receptor en las asas intracelulares (Mersmann, 1998).

Al unirse las catecolaminas al receptor se inician 2 procesos, uno resulta en la activación de la cascada de eventos que generan la respuesta celular, e inician los procesos de desensibilización del receptor (MacHadley, 1988). Para inactivar al receptor el agonista

puede ser degradado, o bien el receptor es inactivado a través una enzima cinasa de receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( *$\beta$ -adrenergic receptor kinase*,  $\beta$ ARK, por sus siglas en inglés) que fosforila sitios específicos localizados en la cuarta asa intracelular. Esta enzima ocasiona un desacoplamiento de la proteína G y el receptor a través de la unión de una molécula llamada  $\beta$ -arrestina (MacHadley, 1988; Mersmann, 1998). La  $\beta$ -arrestina funciona como una proteína adaptadora que promueve la internalización de los receptores mediante pozos cubiertos de clatrina (Norman, 1997).

### **2.2.2 INERVACIÓN OVÁRICA**

Además del control endocrino, el ovario es controlado por el sistema nervioso a través de inervación simpática, parasimpática y sensorial que se originan del SN periférico, con conexiones multisinápticas hacia el SNC (D'Albora *et al.*, 2002). La inervación predominante es la simpática (Aguado *et al.*, 2002). Sin embargo se ha reportado que el nervio vago (SN parasimpático) también participa en el control ovárico (Gerendai *et al.*, 2000).

La distribución de las fibras nerviosas adrenérgicas en el ovario es similar entre especies (roedores, bovinos, primates y humanos), con pequeñas diferencias en localización y densidad (D'Albora *et al.*, 2002; Lara *et al.*, 2002). La inervación ovárica, en la rata, tiene dos fuentes: el Nervio Superior Ovárico (NSO) y el Plexo Ovárico (PO). El NSO alcanza el ovario a través del ligamento suspensorio, ingresa por el ilio y llega hasta el polo superior del ovario (Kotwica *et al.*, 2002; Aguado *et al.*, 2002). Las fibras nerviosas de esta vía inervan a los componentes secretores del ovario (folículos y CL), localizándose en la capa tecal perifolicular, relacionadas a las células de la teca interna (Lara *et al.*, 2002). Las células de la granulosa, las células lúteas y las células de la teca externa no reciben inervación alguna (Aguado *et al.*, 2002). Las fibras del PO son de localización perivascular, y viajan a junto con la arteria ovárica (Lara *et al.*, 2002; Aguado *et al.*, 2002).



Tanto el NSO como el PO, tienen su origen en neuronas posganglionares localizadas en el complejo ganglionar celiaco-mesentérico, y tienen componentes neuronales aferentes en la cadena ganglionar dorsal (Aguado *et al.*, 2002).

La mayoría de las fibras del NSO que llegan al ovario provienen del ganglio celiaco y una pequeña proporción de ellas, de los ganglios paravertebrales (Aguado *et al.*, 2002). Mientras que las fibras del PO, provienen principalmente del plexo celiaco. Ambos ovarios se encuentran comunicados a través de fibras nerviosas que se originan en el ganglio celiaco ipsilateral. El NSO es considerado como regulador del proceso de esteroidogénesis ya que su estímulo genera la liberación de P4 y androstenediona (Aguado *et al.*, 2002).

Existe conexión entre los ovarios y el SNC demostrada mediante ensayos de marcaje viral (virus de la enfermedad de Aujeszki), y por electroestimulación del hipotálamo ventromedial y el área prequiasmática medio-basal. Los ensayos de marcaje viral realizados por Gerendai *et al.* (2000) demostraron que la inervación simpática predomina sobre la parasimpática ya que las fibras nerviosas marcadas se localizan en la cadena ganglionar paravertebral y las astas intermedio-laterales de la médula espinal. Sin embargo, en este mismo estudio se demostró la existencia del control que ejerce el nervio vago (parasimpático), ya que áreas relacionadas con éste (núcleo vagal, área postrema, locus coeruleus, hipotálamo dorsal) fueron marcadas por el virus (Aguado *et al.*, 2002).

#### **2.2.2.1 INERVACIÓN INTRÍNSECA DEL OVARIO**

El ovario posee un sistema de neuronas intrínsecas que ha sido identificado en varias especies: ratas, primates y humanos. En primates y ratas se ha demostrado una red de neuronas, la mayor parte adrenérgicas (Dees *et al.*, 1995; D'Albora *et al.*, 2002). Estas especies poseen cúmulos neuronales, principalmente en el mesovario e hilio, mientras que en la corteza y en la médula se encuentran neuronas aisladas. Algunas neuronas se encuentran en el tejido intersticial que rodea a los folículos ováricos, con procesos asociados a los vasos sanguíneos o la pared folicular (D'Albora *et al.*, 2002).

En algunos estudios con ratas, se ha encontrado que este sistema de innervación intrínseco aparece el primer día de vida (48–72 horas después del nacimiento) (Malamed *et al.*, 1992; D'Albora *et al.*, 2002) por lo que estas neuronas aparecen en el ovario antes que la innervación ovárica y antes que los ovarios respondan a las gonadotropinas (D'Albora *et al.*, 2002).

Únicamente el 20% de las neuronas del sistema de innervación intrínseco del ovario son adrenérgicas, y se han encontrado asociadas a neuronas que producen otro neurotransmisor, como el neuropéptido Y (NPY) (D'Albora *et al.*, 2000).

### **2.2.2.2 NEUROTROFINAS (FACTORES DE CRECIMIENTO)**

Al realizar un trasplante ectópico de un ovario, éste vuelve a innervarse en 28 días post-trasplante (Lara *et al.*, 2002), lo que indica que existen sustancias que favorecen la reinervación a partir de nervios extrínsecos. Estas sustancias han sido identificadas como neurotrofinas, factores de crecimiento y diferenciación en tejido nervioso y otros tejidos no-nerviosos (páncreas, timo, corazón, adenohipófisis) (Dissen *et al.*, 2002). El Factor de Crecimiento Neural (FCN), el más importante de las neurotrofinas, está relacionado con la innervación ovárica y facilita el crecimiento antral folicular, junto con la innervación simpática del ovario (Dissen *et al.*, 2002). Cuando se inhibe al FCN en etapa postnatal temprana, en ratas, se ocasiona una disminución en el diámetro folicular, el retraso del inicio de la pubertad y se altera la ciclicidad (Dissen *et al.*, 2001).

### **2.2.2.3 ORIGEN DE LAS CATECOLAMINAS EN EL OVARIO**

Las catecolaminas que llegan al ovario pueden tener varios orígenes: neuronal, a partir del PO o el NSO; circulación general, provenientes de la médula adrenal, y las producidas en el ovario por la innervación intrínseca (Mayerhofer *et al.*, 1999; Aguado *et al.*, 2002).

Se han encontrado catecolaminas en el tejido ovárico y en el líquido folicular en rata y cerdo (Aguado *et al.*, 2002). En cerdos, la concentración de NA en folículos grandes es

menor que en los pequeños, pero sucede un incremento en los preovulatorios (Lara *et al.*, 2002).

En el líquido folicular, en humanos y primates, se han encontrado concentraciones altas de DA. En estudios realizados por Mayerhofer *et al.* (1998), encontraron que los ovocitos poseen la enzima capaz de transformar a la DA en NA (la DBH), además de contar con el transportador de membrana para la DA. Por tanto, los ovocitos son capaces de sintetizar NA, misma que ejerce su efecto sobre las células de granulosa (Mayerhofer *et al.*, 1999).

En el estudio realizado por Ferruz, *et al.* (1991), *in vitro*, se encontró que en el ovario la menor liberación de NA ocurría en el diestro, seguida de un incremento durante el proestro y el estro, con una disminución durante el metaestro. Además, encontraron que la liberación de NA cambia de manera opuesta al número de receptores beta-adrenérgicos presentes en el tejido.

#### **2.2.2.4 RECEPTORES ADRENÉRGICOS EN EL OVARIO**

Para que las catecolaminas puedan actuar sobre el ovario se requieren estructuras que lleven a cabo la transducción de la señal: receptores adrenérgicos. Estos receptores han sido encontrados en las membranas celulares del ovario de ratas prepúberes y adultas. En ratas prepúberes los receptores adrenérgicos encontrados en las células de la granulosa e intersticiales fueron  $\beta_2$  casi en un 100% (Jordan *et al.*, 1981). El número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos varía según la etapa del ciclo estral, siendo bajo durante el anestro; el número aumenta en el proestro, alcanzando los niveles más altos durante el proestro tardío, con una caída rápida previa al pico preovulatorio de gonadotropinas. Los niveles se mantienen bajos, y hay un incremento alcanzando el máximo durante el diestro (Aguado *et al.*, 1982). Las células de la granulosa y las lúteas poseen receptores adrenérgicos, aún cuando no son inervadas directamente. El número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la membrana plasmática está regulado por las catecolaminas que llegan vía inervación ovárica (Mayerhofer *et al.*, 1999; Aguado *et al.*, 2002).

En bovinos se han encontrado receptores  $\beta_1$ - y  $\beta_2$ -adrenérgicos presentes en tejido lúteo ovárico, considerándose las cantidades más altas durante la mitad de la fase lútea (Pesta *et al.*, 1994). Sin embargo, al igual que en ratas, la cantidad de receptores varía con la etapa del ciclo estral. Payne *et al.* (1991), encontraron que en ovinos, el CL joven posee una mezcla de receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , mientras que uno tardío los que predominan son los  $\beta_2$ .

#### **2.2.2.5 EFECTOS INDUCIDOS POR LOS RECEPTORES BETA ADRENÉRGICOS EN OVARIO**

Se ha demostrado que la estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos ocasiona un incremento en la liberación de hormonas esteroides en diversas especies (Wheeler *et al.*, 1988; Kotwica *et al.*, 1991; Aguado *et al.*, 2002). En experimentos realizados con CL, *in vivo* e *in vitro*, se ha encontrado que la aplicación de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos ocasiona un incremento en la liberación de progesterona (Wheeler *et al.*, 1988; Kotwica *et al.*, 1991) y oxitocina (Kotwica *et al.*, 1994), de manera dependiente de la dosis empleada. La liberación basal de progesterona puede estar influenciada por una estimulación constante de receptores  $\beta$  en el CL (Kotwica *et al.*, 2002). En el experimento realizado por Miszkiel y Kotwica (2001), con CL bovinos, encontraron que la dobutamina (agonista  $\beta_1$ ) y salbutamol (agonista  $\beta_2$ ) incrementaban la liberación de progesterona, mientras que el segundo además incrementaba la liberación de oxitocina.

Un posible mecanismo a través del cual la NA o los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos provocan incrementos en la liberación de progesterona, es su acción sobre las enzimas esteroidogénicas. En sistemas *in vitro* adicionados con 25-hidroxicolesterol + NA, la producción de pregnenolona y progesterona es mayor que cuando se adiciona sólo el 25-hidroxicolesterol, por lo que la NA podría actuar sobre la enzima P450<sub>scc</sub> (Misziel y Kotwica, 2001). También se ha encontrado que la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos es capaz de incrementar la liberación de progesterona por un efecto sobre la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, que transforma a la pregnenolona en progesterona (Misziel y Kotwica, 2001; Kotwica *et al.*, 2002).

La estimulación eléctrica del NSO, originó la liberación de progesterona en un estudio *in vitro* con ovarios de rata en diestro (Aguado *et al.*, 2002). No existe evidencia que los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos o la estimulación nerviosa del ovario ocasionen una alteración en la concentración de estradiol, sin embargo si se secciona el NSO durante el proestro, en ratas, provoca una disminución en los niveles de progesterona (respecto a los niveles previos a la sección) y estradiol, en la vena ovárica (Aguado *et al.*, 2002).

La inervación adrenérgica en el ovario puede afectar el desarrollo folicular (Dissen *et al.*, 2002; Aguado *et al.*, 2002), ya que estimulan la formación de receptores a las gonadotropinas y por tanto la respuesta a éstas. En un estudio realizado por Mayerhofer *et al.* (1997), encontraron que la exposición *in vitro* de ovarios de ratas neonatales, a isoproterenol (agonista  $\beta$ -adrenérgico) y VIP (péptido vasoactivo intestinal, localizado en los nervios sensitivos y autónomos), incrementaron el RNA mensajero (RNAm) para receptores de FSH y para la enzima P450aromatasa.

La sección del NSO en etapa neonatal en ratas, ocasiona una disminución en el número de ovocitos en el ovario denervado, se retrasa la apertura vaginal y se modifican los niveles circulantes de FSH, hormona del crecimiento y prolactina, con un incremento en los niveles circulantes de estradiol (Aguado *et al.*, 2002).

La información existente muestra que la innervación ovárica es importante en la regulación de la función y desarrollo de las estructuras ováricas. Sin embargo no existe evidencia del efecto que la inervación ovárica tiene sobre el ciclo estral en bovinos, la mayoría de los estudios son realizados en sistemas *in vitro* sobre tejidos obtenidos post-mortem, por lo que los resultados obtenidos no pueden ser transpolados directamente a animales vivos. Además son pocos los estudios que muestran el efecto que un  $\beta$ -agonista tiene sobre las estructuras ováricas y el ciclo estral en bovinos, ya que la mayoría de estudios son realizados en roedores.

## 2.3 COMPUESTOS AGONISTAS BETA-ADRENÉRGICOS (AβA)

### 2.3.1 FARMACOCINÉTICA

Los fármacos AβA pertenecen a la familia de las fenetanolaminas que poseen una estructura común: anillo aromático, un grupo hidroxilo unido al carbono β, un nitrógeno alifático y una cadena R (Fig. 1) (Smith, 1998).

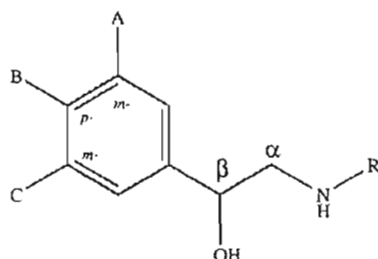


Fig 1. Estructura General de los Compuestos AβA.

La actividad biológica de los AβA depende de la afinidad por el receptor β-adrenérgico (rβA) y de su composición química, características que afectan la adsorción, distribución, metabolismo y eliminación de los compuestos (Smith, 1998).

#### Características Químicas

- *Anillo Aromático:* Es esencial para la actividad biológica de los AβA. En esta porción se realizan las sustituciones con grupos hidroxilo, halógenos, aminas, grupos hidroximetilos, ciano-grupos, o combinaciones de estos. Estas sustituciones afectan el metabolismo de los AβA y su afinidad para unirse al receptor (Smith, 1998). En el caso del clenbuterol la sustitución es por un compuesto halogenado que contiene cloro, lo que evita la degradación rápida y le confiere características lipofílicas (Smith, 1998).
- *Grupo Amino:* En la sangre y los tejidos con pH de 7.4, este grupo se encuentra ionizado. El compuesto no ionizado posee actividad biológica. Esta característica le confiere constantes de disociación de 8.5-10, que provocan que el AβA no se dirija hacia el tejido adiposo a menos que existan regiones dentro de la molécula que sean lipofílicas e interactúen con la grasa. Las bases puras de los AβA son lipofílicas (Smith, 1998).

- *Grupo Beta-Hidroxilo*: El carbono  $\beta$  determina la presentación de estereoisómeros levógiros y dextrógiros. A nivel de receptor, para que el A $\beta$ A tenga actividad biológica debe presentar una conformación levógira (clenbuterol, ractopamina, zilpaterol). Este grupo le confiere especificidad por el receptor (Smith, 1998).

### 2.3.1.1 VIDA MEDIA

Los compuestos A $\beta$ A tienen una vida media variable. En becerros, el clenbuterol posee una vida plasmática media de 18 horas (Meyer *et al.*, 1991). En vacas la vida media es de 18 horas durante los primeros 3 días, y entre el día 3 y 7 alcanza hasta 55 horas (Stoffel y Meyer, 1993). En leche la vida media reportada es de 16 horas, con concentraciones menores a 0.05 ng/ml en el día 5 (Stoffel y Meyer, 1993). Para el cimaterol, la vida media en novillos fue de 1 hora (Byrem *et al.*, 1992). Los A $\beta$ A son fármacos que pueden ser detectados en sangre rápidamente después de su administración oral y su excreción a pesar de ser rápida permite que ocurra acumulación del compuesto en tratamientos crónicos.

#### *Absorción*

Los A $\beta$ A se absorben rápidamente a partir del tracto gastrointestinal, aunque no se han reportado sitios específicos (Smith, 1998). El pH del tracto gastrointestinal influye la absorción, un pH ácido (abomaso) favorece la ionización del compuesto, mientras que un pH neutro (duodeno, yeyuno e ileon) disminuye la ionización y favorece la absorción pasiva a través de la mucosa intestinal. Los niveles plasmáticos más altos se alcanzan 1 y 3 horas después de la administración oral (Smith, 1998; Sumano *et al.*, 2002). En becerros tratados con clenbuterol (5 $\mu$ g/kg, bid), éste se detectó en sangre entre 20 minutos y 1 hora después de la aplicación y 2 a 7 horas después la concentración plasmática alcanzó 0.5 ng/ml. Además se demostró el efecto acumulativo del clenbuterol, para el día 21 de tratamiento la concentración plasmática fue de 1.1 ng/ml (Meyer *et al.*, 1991; Sumano *et al.*, 2002). Resultados similares han sido reportados en vacas en lactación donde la concentración plasmática de clenbuterol (dosis 5 $\mu$ g/kg, bid) alcanzó 5 ng/ml entre los días 5 y 7 del tratamiento (Stoffel y Meyer, 1993).

En el caso del salbutamol, las concentraciones plasmáticas máximas alcanzadas en ganado bovino 3 a 4 horas después de la administración oral (dosis 78  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), fueron de 4.8 y 4 ng/ml en los días 1 y 10 del experimento, respectivamente (Pou *et al.*, 1992). Con zilpaterol las concentraciones plasmáticas se incrementan rápidamente en los primeros 2 días y las concentraciones máximas se alcanzan entre los 10 y 30 días de tratamiento (Birkelo, 2003).

### *Excreción*

Los compuestos A $\beta$ A se eliminan dentro de las 48 horas siguientes a la administración (Smith, 1998). La vía principal de eliminación es la urinaria (Smith, 1998). Sin embargo, en estudios realizados en ratas tratadas con terbutaline, y en perros tratados con salmeterol, se encontró que la principal vía de eliminación es la biliar (Manchee *et al.*, 1993). En becerros, el 50% del clenbuterol se excretó por orina y el 2% en heces (Smith, 1998). En novillos, la excreción del cimaterol alcanzó un 90% a las 3 horas de la aplicación, sin embargo sólo un 20% del cimaterol fue recuperado en la orina (Byrem *et al.*, 1992).

En un estudio realizado con clenbuterol (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , bid) en vacas, se encontró que se elimina a través de leche, alcanzando una concentración máxima entre el día 5 y 7 después del inicio del experimento, con niveles promedio de 12.5 ng/ml (rango: 5.5-22.5 ng/ml) (Stoffel y Meyer, 1993).

A pesar de que los A $\beta$ A comparten la estructura básica, la absorción, la excreción y por tanto la vida media difieren entre compuestos debido a las propiedades químicas particulares de cada uno.

### **2.3.2 MECANISMO DE ACCIÓN**

Los A $\beta$ A son moléculas que se unen a los r $\beta$ A, receptores unidos a proteína Gs. Al formarse el complejo ligando-receptor, la subunidad  $\alpha$  de la proteína G activa a la enzima adenilato-ciclasa para formar monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Este mensajero,



se une a la subunidad reguladora de la proteína cinasa A (PKA) que al activarse fosforila proteínas intracelulares. Una de estas proteínas es la lipasa sensible a hormona (LSH) encargada del catabolismo del tejido adiposo. Otras proteínas se inactivan, como la acetil-CoA carboxilasa, encargada de sintetizar ácidos grasos de cadena larga. El AMPc activa la transcripción de genes que poseen elementos de respuesta a este mensajero, a través de la fosforilación de la proteína ligadora del elemento de respuesta a AMPc (Mersmann, 1998).

Para evitar la activación indefinida del  $r\beta A$ , éste debe ser inactivado. Una vez unido el  $A\beta A$  a su receptor, éste último puede ser fosforilado a través de la enzima cinasa de  $r\beta A$  ( $\beta ARK$ , por sus siglas en inglés) en sitios localizados en la 4ª asa intracelular. Esta enzima provoca la unión de una  $\beta$ -arrestina, la cual evita la activación de la proteína Gs (Strosberg, 1993; Mersmann, 1998). Otra forma de desensibilización es a través de la PKA. Esta enzima ocasiona una regulación a la baja del RNAm del receptor ( $r\beta A_1$  y  $r\beta A_2$ ) (Strosberg, 1993; Mersmann, 1998). También se ha reportado que existe en la región carboxi-terminal del  $r\beta A$  un sitio de fosforilación por la enzima tirosina cinasa (Strosberg, 1993). La inactivación de los receptores es necesaria para evitar una respuesta indefinida, puede ser la causa de la variación en las respuestas presentadas en tratamientos crónicos.

### **2.3.3 EFECTOS EN TEJIDO MUSCULAR**

El tratamiento con compuestos  $A\beta A$  provoca hipertrofia muscular, pero cada músculo responde de acuerdo a la proporción de fibras musculares que posee (Mersmann, 1998; Beermann, 2002). La hipertrofia muscular es más evidente en las fibras musculares tipo II (contracción rápida, o mixtas glicolíticas oxidativas) comparada con la ocurrida en las fibras tipo I (contracción lenta, oxidativas) (NRC, 1994). En corderos tratados con cimaterol (10 ppm) se encontró que a las 12 semanas la proporción de fibras musculares tipo I fue menor que las del tipo II (Beermann *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1988).

La ganancia de masa muscular puede ser explicada por un incremento en la síntesis proteica, o por una disminución en la proteólisis. En estudios realizados mediante una infusión arterial cerrada con cimaterol (5 $\mu$ g de cimaterol/minuto) en novillos, encontraron

que la ganancia de proteína fue 65% mayor en el miembro tratado con cimaterol que en el contralateral. El primero incorporó mayor cantidad de aminoácidos circulantes (Byrem *et al.*, 1998). En el estudio realizado por O'Connor *et al.* (1991) en ovinos alimentados con cimaterol (10 ppm), observaron incrementos musculares de 25-30% a las 3 semanas de tratamiento, con aumento de 24.8% en la concentración de RNA, en el mismo periodo. Koohmaraie *et al.* (1991), encontraron un aumento en la concentración de RNAm para  $\alpha$ -actina en ovinos tratados con L644,969 (4ppm). Se han reportado incrementos en el RNA y proteína muscular de 30-35% a las 7-12 semanas en ovinos tratados con cimaterol, sin cambios en la concentración de DNA muscular (Beermann *et al.*, 1987). Esto indica que la hipertrofia muscular no ocurre por proliferación e incorporación de las células satélite hacia la fibra muscular (Beermann, 2002).

La urea plasmática disminuye posterior a la administración crónica de cimaterol, indicando incremento en la síntesis y el depósito de proteína y disminución en la oxidación de aminoácidos. La degradación muscular de proteína puede reducirse o no estar afectada cuando se administra un compuesto  $A\beta A$  (Beermann, 2002). Se ha reportado una disminución del 27% en la degradación proteica y un incremento en la actividad de la calpastatina (enzima encargada de bloquear la acción de las enzimas dependientes de calcio, calpainas) (Koohmaraie *et al.*, 1991). Se presenta una disminución en la actividad de enzimas proteolíticas y/o un incremento en la concentración de factores inhibidores de proteasas (Mersmann, 1998).

#### **2.3.4 EFECTOS EN EL TEJIDO ADIPOSEO**

En el adiposito, los  $A\beta A$  activan el catabolismo de lípidos a través de la activación de la lipasa sensible a hormona, por la PKA, que degrada triacilglicéridos en glicerol y ácidos grasos libres (AGL). Además, los  $A\beta A$  inhiben la síntesis de ácidos grasos y su esterificación en triacilglicéridos. El aumento en el catabolismo y disminución en el anabolismo ocasionan una baja deposición de tejido graso (Mersmann, 2002; Birkelo, 2003).

Existe evidencia del incremento en los niveles sanguíneos de AGL posterior a la aplicación de clenbuterol, cimaterol o ractopamina, en bovinos, ovinos y cerdos, indicativo de un mecanismo lipolítico agudo (Dunshea, 1993; Mersmann, 2002). Sin embargo este efecto se pierde a los 8 días del inicio del tratamiento con ractopamina, en cerdos (Dunshea, 1993). O'Connor *et al.* (1991) encontraron que el efecto lipolítico agudo (primeras 2 horas) no es el principal mecanismo por el cual los A $\beta$ A provocan la reducción en el tejido adiposo, sino es el mecanismo anti-lipogénico. En bovinos tratados con clenbuterol no se observaron cambios en la tasa de degradación de tejido adiposo (Schiavetta *et al.*, 1990). El diámetro de las células presentes en el tejido adiposo subcutáneo, intramuscular (Miller *et al.*, 1988) y perirrenal (Schiavetta *et al.*, 1990) disminuyó después del tratamiento de bovinos con clenbuterol. En bovinos los A $\beta$ A provocan una disminución en la deposición de grasa a través de una lipólisis aguda y de una disminución en la lipogénesis en tratamientos crónicos, aunque este último parece ser más importante. Los efectos agudos de los A $\beta$ A parecen estar relacionados con la lipólisis, mientras que los efectos crónicos están asociados a inhibición de la lipogénesis (O'Connor *et al.*, 1991).

Los cambios tanto en el tejido muscular como en el tejido adiposo han mostrado ser transitorios, ya que en tratamientos crónicos (3 a 4 semanas) no muestran diferencias entre los animales control y tratados (Birkelo, 2003).

### **2.3.5 EFECTOS ENDOCRINOS Y METABÓLICOS**

Debido a sus efectos de repartición de nutrientes, los A $\beta$ A afectan la concentración de diversas hormonas y metabolitos involucrados en el desarrollo muscular y adiposo.

La administración aguda de compuestos A $\beta$ A en ovinos y bovinos incrementan los niveles plasmáticos de insulina, glucosa y AGL (Beermann *et al.*, 1987; O'Connor *et al.*, 1988; Zimmerli y Blum, 1989; Chikhou *et al.*, 1991, Gojmerac *et al.*, 2000). El incremento agudo de los niveles de insulina y de glucosa en forma paralela parece indicar una disminución transitoria en la sensibilidad de los tejidos hacia la insulina (O'Connor *et al.*, 1991). La hormona de crecimiento (ST) disminuye con la administración aguda de

compuestos A $\beta$ A (Zimmerli y Blum, 1989; Chikhou *et al.*, 1991). Las concentraciones de IGF-I no se alteraron con la administración aguda de un A $\beta$ A (Chikhou *et al.*, 1991). Al parecer el efecto agudo de los A $\beta$ A es regulado por sus características simpático-miméticas, favoreciendo la liberación de metabolitos destinados a la formación de energía.

En tratamientos crónicos la insulina y la glucosa regresan a niveles basales (Zimmerli y Blum, 1989; Mersmann, 2002). Más aún los niveles de insulina pueden ser menores comparados con los previos al tratamiento (Beermann *et al.*, 1987; O'Connor *et al.*, 1991). Esta disminución crónica puede deberse a un aumento en la sensibilidad de los tejidos hacia la insulina (O'Connor *et al.*, 1991). En el experimento de Beermann *et al.* (1987) la disminución en la insulina fue explicada debido al periodo de retiro de alimento previo al muestreo. Los niveles plasmáticos de ST se elevaron a las 6 semanas de la aplicación de un A $\beta$ A pero a las 12 semanas no hubo diferencia con respecto a los controles (Beermann *et al.*, 1987). Zimmerli y Blum (1989) encontraron incrementos en la ST a los 14 y 28 días de tratamiento con un A $\beta$ A, alcanzando niveles similares a los animales control. En animales en crecimiento (ovinos y bovinos), los niveles de IGF-I no muestran alteración con la administración crónica de A $\beta$ A (6 semanas) (Zimmerli y Blum, 1989; O'Connor *et al.*, 1991). En los estudios de Beermann *et al.* (1987) y Chikhou *et al.* (1991) encontraron que la disminución de los niveles de IGF-I se presenta paralelamente a la disminución de insulina. En general los efectos crónicos de los A $\beta$ A se atenúan conforme el tiempo de exposición aumenta.

Los niveles plasmáticos de cortisol, prolactina, tiroxina (T<sub>4</sub>) y triyodotironina (T<sub>3</sub>) no muestran variación durante tratamientos agudos o crónicos (O'Connor *et al.*, 1991). Pero en el experimento realizado por Beermann *et al.* (1987) reportaron que los niveles de T<sub>4</sub> y T<sub>3</sub> aumentaron después de la administración crónica de cimaterol. Sin embargo la variación puede deberse a la variedad de diseño de experimentos y a la edad de los animales, ya que algunos experimentos usan animales en crecimiento.

Zimmerli y Blum (1989) encontraron que en becerros la administración de compuestos A $\beta$ A (P-5369 y T-3660) incrementó la frecuencia cardíaca y respiratoria, además, ocasionó tremor muscular, incrementando el consumo de oxígeno en el primer día del experimento. La frecuencia cardíaca y el tremor muscular no fueron diferentes que los controles después de 2 semanas de tratamiento.

Uno de los efectos indirectos de la administración de A $\beta$ A es el incremento en el flujo sanguíneo hacia ciertas partes del cuerpo. Esto es evidente en el músculo, donde el incremento en el flujo sanguíneo lleva una mayor cantidad de nutrientes, y por tanto más sustratos para la síntesis proteica. Además, el incremento del flujo hacia el tejido adiposo permite que los AGL sean removidos e incrementa la degradación de este tejido (Mersmann, 2002).

Existe información acerca de que el consumo diario disminuye en animales tratados con A $\beta$ A al inicio de los experimentos, pero al final no se encuentran diferencias con los animales control (NRC, 1994).

En resumen, los efectos sobre hormonas metabólicas y metabolitos ocurren de manera aguda, y en tratamientos crónicos regresan a niveles basales o bien no difieren de los animales control. Esto puede estar explicado por una disminución en la sensibilidad de los receptores hacia el compuesto A $\beta$ A empleado (Mersmann, 1998).

### **2.3.6 VARIACIÓN EN LA RESPUESTA A LOS A $\beta$ A**

Los r $\beta$ A se localizan en la mayoría de los tejidos y células del organismo. Sin embargo existen variaciones entre especies con respecto a la proporción del tipo de r $\beta$ A que posee cada tejido. Los efectos tisulares mostrados por los A $\beta$ A dependen de la unión con su receptor, por lo que la variación en los receptores ocasiona diversidad en las respuestas entre especies (Mersmann, 1998). En tejido muscular y adiposo de bovinos y ovinos predominan los receptores  $\beta_2$  (Mersmann, 1998; Birkelo, 2003), contrario a lo reportado para roedores donde el principal r $\beta$ A en tejido adiposo es el  $\beta_3$  (Mersmann, 2002). Así

tenemos que la respuesta a los tratamientos con A $\beta$ A según la especie, son: ovinos  $\geq$  bovinos  $\geq$  pavos  $>$  cerdos  $>$  pollo de engorda (Mersmann, 1998). Adicionalmente existe variación dentro de la especie, por ejemplo, las aves que están cerca de su máximo potencial y por tanto no responden de igual manera que los ovinos que no han estado bajo selección tan intensiva (Mersmann, 2002). La respuesta a los A $\beta$ A es afectada por tipo y dosis de A $\beta$ A, edad, sexo, raza, y dieta (Mersmann, 1998). La respuesta a los A $\beta$ A está afectada por factores ambientales. En animales en crecimiento la respuesta es menor que en los próximos al peso de mercado, esto puede deberse a una disminución en la sensibilidad a los A $\beta$ A o bien a que existe un número menor de receptores en el tejido muscular (Bell *et al.*, 1998).

La respuesta a los compuestos A $\beta$ A depende de la naturaleza del compuesto y de la dosis empleada. En cerdos alimentados con ractopamina en la dieta, se encontró que para observar un efecto muscular fue necesaria una dosis de 1.5 mg/kg de peso, mientras que para afectar la cantidad de grasa corporal, en la canal, fueron necesarios cerca de 10 mg/kg de peso de ractopamina (Mersmann, 2002). Los efectos de la aplicación de A $\beta$ A se ven influenciados por la cantidad de proteína y de energía de la dieta. El incremento en la deposición muscular requiere un aumento en el aporte de aminoácidos esenciales. En cerdos, la retención de nitrógeno aumenta cuando se incluye un 18% de proteína en la dieta, y disminuye cuando la dieta contiene 12% de proteína cruda, si se compara con la retención en una dieta de 14% de proteína cruda (NRC, 1994).

### **2.3.7 USOS DE LOS A $\beta$ A EN LA PRODUCCIÓN ANIMAL**

Por todos los efectos revisados anteriormente los A $\beta$ A han sido empleados en la producción animal con la finalidad de incrementar el peso de los animales a través de la ganancia de tejido muscular con una menor proporción de grasa. Los compuestos A $\beta$ A para los que existe más información son el clenbuterol, cimaterol, ractopamina e isoproterenol.

En varios estudios realizados para evaluar la calidad en canales de animales tratados con A $\beta$ A se ha encontrado que, en todos, el recubrimiento de grasa disminuye mientras la cantidad de músculo aumenta junto con el peso de la canal (O'Connor *et al.*, 1991; Chikhou *et al.*, 1993). Sin embargo la calidad de la carne, en cuanto a marmoleo y suavidad, disminuyen (Geesink *et al.*, 1993; Plascencia *et al.*, 1999; Birkelo, 2003).

En un estudio realizado por Plascencia *et al.* (1999) con novillos alimentados con zilpaterol encontraron que no influyó el consumo voluntario, pero aumentó la ganancia diaria de peso y mejoró la eficiencia alimenticia. Además, el zilpaterol no afectó la acumulación de grasa y el marmoleo, pero incrementó la cantidad de cortes primarios con (1.7 %) y sin hueso (2.9 %).

En general los A $\beta$ A son empleados como fármacos promotores de crecimiento en la engorda de animales, principalmente bovinos, por sus efectos en la repartición de nutrientes y el aumento de la eficiencia de su uso.

En animales tratados con A $\beta$ A se ha encontrado que estos compuestos inducen la formación de quistes foliculares en ratones (Illera *et al.*, 2003). En cerdas, Biolatti *et al.* (1994) encontraron que el tratamiento con clenbuterol ocasionó la formación de quistes foliculares pequeños de entre 3 y 5 mm y la ausencia de cuerpos lúteos funcionales. Además se redujo el peso del útero y el grosor de la pared uterina en animales tratados. En terneras tratadas con clenbuterol se encontraron ovarios microquísticos con altas concentraciones uterinas de estrógeno y progesterona (Re *et al.*, 1991). En todos estos estudios se ha encontrado que los patrones de las hormonas reproductivas se encuentran alterados, por lo que se supone que puedan afectar la dinámica folicular y por tanto la duración del ciclo estral.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo durante los meses de mayo a julio de 2004, en una explotación comercial de ganado lechero, ubicada en el municipio de Pedro Escobedo, Querétaro, México. Dicha región posee un clima templado semiseco.

#### Animales y Alimentación

Se emplearon 30 vaquillas de raza Holstein-Friesian entre 11 y 12 meses de edad, vacías y con ciclos estrales normales. Los animales fueron alojados en un corral por cada grupo e identificados mediante crayón para facilitar el manejo y la observación continúa. Las vaquillas recibieron una dieta integral constituida por ensilado de maíz, ensilado de ryegrass y concentrado. La dieta integral contenía 48.77% de materia seca, 6.53 Mcal/kg de energía neta de mantenimiento, 4.59 Mcal/kg de energía neta de ganancia, 14% de proteína cruda, 29.1% de fibra detergente ácida, 43.9% de fibra detergente neutra y 3.8% de grasa. Las vaquillas fueron alimentadas 3 veces al día: 0800 horas (20% de la ración total), 1200 horas (50%) y 1700 horas (30%).

Las vaquillas fueron separadas aleatoriamente en 2 grupos. El grupo tratado (ZIL) recibió una mezcla de 0.500 kg de pasta de germen de maíz adicionada con clorhidrato de zilpaterol (Zilmax<sup>®</sup> al 4.8 %, Intervet México) a una dosis de 52.5mg de clorhidrato de zilpaterol equivalente a 1.1g de Zilmax<sup>®</sup> (dosis = 0.15mg/kg de peso), estimando un peso promedio de los animales para el periodo del estudio de 350 Kg. El grupo control recibió 0.500 kg de pasta de germen de maíz. La mezcla de pasta de germen de maíz y zilpaterol fue elaborada en una mezcladora de microingredientes (Davis, 2.0 hp, U.S.A.) con un tiempo de mezclado de 15 minutos, siguiendo las recomendaciones de etiqueta del producto (“tiempo de mezclado no menor a 8 minutos”, Intervet México). Dicha mezcla fue ofrecida diariamente por 32 días entre las 0700 horas y las 0800 horas, antes de que se repartiera la dieta integral.



### Evaluación del Peso, Condición y Composición Corporal

El peso de las vaquillas fue estimado a través de la medición de perímetro torácico (Hoffman *et al.*, 1997). La condición corporal se midió de acuerdo a la escala descrita por Ferguson, *et al.* (1994) (1=emaciada, 5=obesa). La composición corporal se estimó midiendo la profundidad del músculo largo dorsal (a nivel de la primera vértebra lumbar) y de la grasa dorsal (a la altura del último espacio intercostal) (Crews *et al.*, 2002; Moorby *et al.*, 2002), utilizando un equipo de ultrasonido SONOVET 600 (Universal Medical Systems, Inc, NY) con un transductor sectorial de 5 Mhz.

### Análisis Hormonales

Las concentraciones séricas de progesterona e insulina fueron determinadas mediante RIA de fase sólida. Para la medición de progesterona se empleó un estuche comercial (Coat-A-Count® Progesterone, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA., U.S.A.) con una sensibilidad de 0.02 ng/ml y coeficiente de variación intra-ensayo de 8.97 %. En el caso de la medición de insulina se empleó un estuche comercial (Coat-A-Count® Insulin, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA., U.S.A.) con una sensibilidad de 0.052 ng/ml y coeficiente de variación intra-ensayo de 14.52 %.

La medición de las concentraciones séricas del Factor de Crecimiento parecido a la Insulina-I (IGF-I) se realizó a través de un ensayo radioinmunométrico sin extracción (IRMA) con un estuche comercial (DSL-2800 ACTIVE® Non-Extraction IGF-I Coated-Tube IRMA Kit, DSL Inc., Webster, Texas, U.S.A.). La sensibilidad del ensayo fue de 2.06 ng/ml, con un coeficiente de variación intra-ensayo de 5.3%.

La cuantificación de LH se realizó mediante RIA heterólogo de fase líquida, según la técnica descrita por Perera *et al.*, 2004. La sensibilidad de la prueba fue de 0.10 ng/ml, con coeficiente de variación intra-ensayo de 7.13 %.

Los análisis de las muestras se realizaron en el Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Reproducción de la FMVZ-UNAM.

## Fertilidad

Se registró el número de inseminaciones en las vaquillas que quedaron gestantes después del retiro de la suplementación. Las vaquillas fueron inseminadas por el técnico del rancho de acuerdo a los parámetros de altura, peso y edad establecidos. Las vaquillas que mostraban celo durante la noche eran inseminadas a las 0700 horas del día siguiente, mientras que las que lo hacían durante el día fueron inseminadas a las 5 p.m.

### **3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL**

#### Experimento 1

En este estudio se emplearon 20 vaquillas divididas en 2 grupos: ZIL1 (n=10) y Control 1 (n=10). Las vaquillas fueron sincronizadas mediante un esquema de 2 aplicaciones de D-cloprostenol, análogo de prostaglandina  $F_2\alpha$  (Prosolvin<sup>®</sup>, Intervet, D-cloprostenol 0.075mg, 2 ml/animal) con un intervalo de 13 días entre inyecciones. Los animales fueron suplementados durante 32 días con la mezcla de pasta de germen de maíz (Control 1) y zilpaterol (ZIL1), comenzando el día de la segunda aplicación del D-cloprostenol. Después de la segunda aplicación se detectaron celos (3 veces al día: 0700 horas, 1200 horas y 1700 horas, durante 1 hora) para conocer el día de inicio del ciclo (día 0=día del estro). La condición y composición corporal fue evaluada 3 días antes del inicio de la suplementación y al finalizar ésta.

#### *Ultrasonografía de Ovarios*

Para dar un seguimiento preciso de la dinámica folicular se llevaron a cabo evaluaciones ultrasonográficas de los ovarios, que fueron registradas en mapas ováricos para su posterior análisis. Las evaluaciones se llevaron a cabo cada tercer día (lunes, miércoles, viernes) en ambos grupos, iniciando el día posterior al inicio de la suplementación (día -1) y finalizando el día 34 (día final del experimento I), abarcando cuando menos un ciclo estral. El equipo de ultrasonido empleado fue un SONOVET 600 con un transductor lineal de 7.5 Mhz.

### *Muestras Sanguíneas*

Se tomaron muestras sanguíneas para la determinación de los niveles séricos de progesterona, insulina e IGF-I. Las muestras se obtuvieron de la vena coccígea en tubos Vacutainer de 9.5 mL, con gel activador y separador del coágulo. Dichos muestreos comenzaron el día de la primera aplicación del D-cloprostenol (día -15), el día posterior al inicio de la suplementación, y cada 2 días siguiendo el calendario de las evaluaciones ultrasonográficas, más el sábado (4 muestreos por semana) hasta finalizar el estudio (Figura 1). Las muestras fueron tomadas de 1 a 2 horas después del segundo ofrecimiento del alimento (1200 horas). La insulina y el IGF-I se midieron una vez por semana durante el periodo de suplementación y un día después del retiro de esta. La progesterona se midió de las muestras tomadas cada tercer día, pero para comparar las concentraciones entre grupos se tomaron las muestras correspondientes al primer ciclo estral con un cuerpo lúteo de duración normal.

Las muestras fueron colocadas en refrigeración y transportadas al laboratorio. Posteriormente se centrifugaban a 4 °C por 15 minutos a 2500 G (Beckman Centrifuge GS-15R, Beckman, Inc). Una vez separado el coágulo, se cosechaba el suero colocándolo en tubos de ensaye de plástico de 5 mL, que fueron identificados y congelados (-20 °C) para su conservación y posterior análisis.

### Experimento 2

Se emplearon 10 vaquillas divididas en 2 grupos: ZIL2 (n=5) y Control 2 (n=5). Las vaquillas fueron sincronizadas con 4 aplicaciones de D-cloprostenol con un intervalo de 11 días. Los animales del grupo ZIL2 fueron suplementados con zilpaterol por 24 días en una mezcla de pasta de germen de maíz. La condición y composición corporal se evaluó el día anterior al inicio de la suplementación y nuevamente al final del experimento.

### *Ultrasonografía de Ovarios*

Para conocer el diámetro del folículo preovulatorio se realizaron evaluaciones ultrasonográficas transrectales el día 9 del ciclo estral, dos días después de la última aplicación de D-cloprostenol.

### *Muestras Sanguíneas*

En el día 7 del ciclo estral se realizó la cuarta aplicación de D-cloprostenol. Del día 7 al 9 se tomaron muestras sanguíneas en tubos Vacutainer de 7.5 ml con EDTA, para caracterizar la caída de las concentraciones plasmáticas de progesterona. A partir de la manifestación de celo se tomaron muestras sanguíneas a intervalos de 2 horas por un periodo de 10 horas para caracterizar el pico preovulatorio de LH. Las muestras fueron tomadas en tubos Vacutainer de 5mL con EDTA y centrifugadas (Beckman Centrifuge GS-15R, Beckman, Inc.). El plasma obtenido se colocó en tubos de ensaye de plástico de 5mL para su congelación (-20 °C) y análisis posterior.

## **3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó una prueba T de Student para la comparación de medias para muestras independientes para las variables: edad, peso inicial, grasa dorsal inicial, grasa dorsal final, cambio en grasa dorsal, profundidad muscular, duración del ciclo estral, diámetro del folículo ovulatorio y duración del diestro. El análisis del cambio en el peso corporal (ganancia diaria de peso) y peso corporal final se realizó con un análisis de covarianza (ANCOVA), usando al peso inicial como covariable. Se realizó una prueba de T de Student para medias pareadas para analizar el cambio en la grasa dorsal (grasa dorsal inicial vs. grasa dorsal final). Para el número de oleadas foliculares y el número de inseminaciones se empleó la prueba de Chi-cuadrada ( $\chi^2$ ). La condición corporal entre grupos, periodo entre la aplicación de D-cloprostenol al estro y el periodo del estro al pico preovulatorio de LH se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney para comparación de muestras independientes.

Las concentraciones hormonales se analizaron por ANOVA para mediciones repetidas, en un modelo que incluyó como variables independientes al tratamiento, el animal anidado dentro del tratamiento, el tiempo y la interacción entre tratamiento y tiempo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 EXPERIMENTO I. Efecto del Zilpaterol sobre el Ciclo Estral

#### *Duración del Estro y Dinámica Folicular*

La duración del ciclo estral fue de 21 días para ambos grupos (Cuadro 1). La duración del diestro ( $p>0.05$ ) y el diámetro del folículo ovulatorio ( $p>0.05$ ) no se afectaron por el tratamiento (Cuadro 1). Los animales presentaron 2 ó 3 oleadas de desarrollo folicular. Nueve animales presentaron 2 oleadas (ZIL1,  $n = 5$  y control 1,  $n = 4$ ) y 10 animales 3 oleadas (ZIL1,  $n=5$  y control 1,  $n=5$ ) sin diferencia entre grupos ( $p>0.05$ ) (Cuadro 2).

#### *Concentraciones Séricas de Progesterona*

Las concentraciones séricas de progesterona a lo largo del ciclo estral (Figura 2) fueron similares entre animales tratados y controles ( $p>0.05$ ). La producción total de progesterona (área bajo la curva) durante el diestro no difirió entre grupos ( $p>0.05$ ) (Cuadro 1).

#### *Concentraciones Séricas de Insulina*

El día siguiente del inicio de la suplementación con zilpaterol los animales tratados mostraron concentraciones séricas de insulina superiores ( $p<0.05$ ) a los animales control. En los días siguientes se observó una reducción en las concentraciones de insulina en los animales tratados ( $p<0.05$ ) que se mantuvo durante el tratamiento con zilpaterol (Figura 3).

#### *Concentraciones Séricas de IGF-I*

Las concentraciones séricas del Factor de Crecimiento parecido a la Insulina (IGF-I) fueron similares ( $p>0.05$ ) entre animales tratados y controles durante el periodo de la suplementación y 24 horas después de su retiro (día 32) (Figura 4).

## 4.2 EXPERIMENTO II. Efecto del Zilpaterol en la Fase Folicular del Ciclo Estral.

Debido a que 2 de las 10 vaquillas no respondieron adecuadamente al tratamiento de sincronización, no fueron incluidas dentro de los resultados finales.

### *Progesterona*

Las concentraciones plasmáticas de progesterona el día 7 del ciclo estral fueron similares entre grupos ( $p > 0.05$ , Figura 5). Veinticuatro horas después de la aplicación de D-cloprostenol las concentraciones de progesterona disminuyeron en ambos grupos sin diferir entre ellos (ZIL=  $0.6 \pm 0.1$  ng/ml vs. control=  $0.6 \pm 0.1$  ng/ml,  $p > 0.05$ ).

### *Pico Preovulatorio de LH*

El tiempo transcurrido entre la aplicación del D-cloprostenol y la presentación del estro fue menor ( $p = 0.07$ ) para los animales tratados que para los controles (Zilpaterol, mediana=40.50 horas y control, mediana=52 horas). Dos de las 4 vaquillas tratados con zilpaterol mostraron celo dentro de las siguientes 36 horas posteriores a la aplicación del D-cloprostenol. El análisis para determinar el tiempo transcurrido entre la aplicación de D-cloprostenol y el pico de LH no pudo realizarse ya que en el grupo tratado las vaquillas que presentaron celo antes de las 48 horas tuvieron concentraciones de LH decrecientes indicando que el pico preovulatorio de LH había ocurrido y su tiempo exacto no fue determinado. El diámetro del folículo preovulatorio 48 horas después de la aplicación de D-cloprostenol fue similar ( $p > 0.1$ ) entre animales tratados y controles (Cuadro 2).

Las concentraciones plasmáticas de LH encontradas desde la presentación del estro hasta 12 horas después fueron similares ( $p > 0.05$ ) entre los animales tratados y controles.

## 4.3 Fertilidad

Todas las vaquillas fueron inseminadas dentro de los 15 días posteriores al retiro de la suplementación. El 73% de las vaquillas tratadas con zilpaterol y el 47 % de las vaquillas control quedaron gestantes al primer servicio, aunque no se encontró diferencia estadística ( $p > 0.05$ ). En el experimento 2, 6 de las 8 vaquillas fueron inseminadas el día 12

horas después del mostrar estro. Del grupo tratado 3 de 4 vaquillas quedaron gestantes en la primera inseminación, mientras que en el grupo control fueron 2 de 4 vaquillas ( $p>0.05$ ).

#### 4.4 Evaluación del Peso, Condición y Composición Corporal

Los resultados obtenidos en las variables corporales se muestran en los cuadros 3 y 4. El peso corporal al inicio del experimento fue similar ( $p>0.05$ ) entre grupos. Los animales tratados tuvieron mayor peso al final del experimento ( $p<0.05$ ) que los controles. Asimismo, la ganancia diaria de peso fue mayor ( $p<0.05$ ) en el grupo tratado (Cuadro 3). El zilpaterol ocasionó una reducción del 26% ( $p<0.05$ ) en la grasa dorsal y al final del experimento el grupo tratado tuvo menos ( $p<0.05$ ) grasa dorsal que el control. En los animales control la grasa dorsal no sufrió cambios ( $p>0.05$ ) entre el inicio y el final del experimento. La profundidad muscular al final del experimento fue diferente entre grupos, ya que el grupo tratado mostró mayor ( $p<0.05$ ) profundidad del músculo largo dorsal que el control (Cuadro 4). La condición corporal (CC) al final del experimento fue mejor en los animales tratados que en los controles, 3.0 vs. 2.5, respectivamente ( $p<0.05$ ).



## 5. DISCUSIÓN

El zilpaterol adelantó la presentación del estro y el pico preovulatorio de LH durante la fase folicular del ciclo estral. El tratamiento no afectó la fertilidad de las vaquillas. La duración del ciclo estral, la fase lútea y la concentración de progesterona durante el diestro no fueron afectadas por el zilpaterol.

En este estudio, el estro se presentó anticipadamente en las vaquillas tratadas con zilpaterol. Más aún, dos de las 4 vaquillas tratadas con zilpaterol mostraron celo antes de 48 horas y antes del comienzo del muestreo intensivo para caracterizar el pico preovulatorio del LH. Por tanto el pico preovulatorio de LH también se adelantó, y aunque no contamos con la hora exacta en la que ocurrió, en los animales en los que fue posible medirlo ocurrió 4 horas después del celo. Lo anterior nos indica que únicamente se está adelantando el estro probablemente debido a un efecto del zilpaterol sobre el desarrollo folicular final o la reducción del folículo ovulatorio.

No tenemos conocimiento de experimentos realizados con algún compuesto  $A\beta A$  en el que se evalúe el tiempo de presentación del estro y del pico preovulatorio de LH después de la luteólisis inducida con un análogo de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  en bovinos, y si esto tiene alguna relación con la fertilidad. Sin embargo, en estudios realizados con ratas a las que se les aplicó fenoterol (compuesto  $A\beta_2A$  específico) por vía intra-cerebro-ventricular, se indujo la ovulación y se elevaron los niveles sanguíneos de LH, cuando fue aplicado en el periodo crítico durante el proestro previo al pico preovulatorio de LH (Al-Hammood *et al.*, 1985). En otro estudio realizado en cultivos celulares de hipófisis de cerdas ovariectomizadas, se encontró que los  $A\beta A$  son capaces de estimular la secreción de LH, pero sólo en las cerdas tratadas previamente con estradiol o progesterona (Siawrys *et al.*, 2002). Además se ha reportado el incremento de receptores para IGF-I en células de la granulosa de ratas, *in vitro* (Spicer y Echterkamp, 1995). Sin embargo, en ratas tratadas con clenbuterol, éste bloqueó la ovulación ya que no se encontraron cuerpos lúteos funcionales durante el periodo de tratamiento, situación que se revirtió 20 días después del retiro del  $A\beta A$  (Illera *et al.*, 2003). En este estudio una de las vaquillas presentaba un

cuerpo hemorrágico observado a través de ultrasonografía 48 horas después de la aplicación de D-cloprostenol. Aún y cuando el zilpaterol parece adelantar el pico preovulatorio de LH y por tanto la ovulación, el hecho del bajo número de observaciones implica la necesidad de caracterizar mejor este fenómeno, incluyendo la variabilidad de la respuesta para posteriormente dilucidar el mecanismo involucrado.

A pesar de que los animales tratados mostraron celo en menor tiempo después de la aplicación de D-cloprostenol, la luteólisis funcional inducida por este compuesto fue similar entre ambos grupos. Incluso las vaquillas tratadas en las que se adelantó el estro mostraron concentraciones plasmáticas de progesterona correspondientes a un diestro normal (pre-D-Cloprostenol, 5.65 y 3.28 ng/ml) y 24 horas después a una luteólisis funcional adecuada (post-D-cloprostenol, 0.90 y 0.50 ng/ml). En estudios realizados con CL bovinos se ha encontrado que los A $\beta$ A son capaces de inducir un incremento en la liberación de oxitocina lútea (Skarsynski y Kotwica, 1993), más aún se ha encontrado que esta liberación está mediada por receptores  $\beta_2$  en las células lúteas grandes (Miszkiel y Kotwica, 2001). En cerdas tratadas con clenbuterol por 21 días, no se encontró alteración de la luteólisis hacia el final del ciclo, ya que los niveles de progesterona fueron menores en animales tratados que en los controles pero no resultaron significativos (Gojmerac *et al.*, 2000) Los A $\beta$ A podrían estar acelerando la luteólisis a través del incremento directo de la oxitocina lútea y acelerando la ovulación por la estimulación sobre la secreción de LH.

El zilpaterol no afectó la duración del ciclo estral ni el número de oleadas foliculares. Estos resultados contrastan con los encontrados en cerdas (Biolatti *et al.*, 1994) y en ratas (Illera *et al.*, 2003) tratadas con clenbuterol en las que la administración crónica (48 días y 45 días, respectivamente) afectó la dinámica folicular, ocasionando la formación de quistes foliculares, y por tanto alterando la ciclicidad en las hembras tratadas. Sin embargo en cerdas tratadas con clenbuterol por 21 días (Gojmerac *et al.*, 2000), no se observó ninguna de las lesiones o alteraciones reportadas en los estudios anteriores. La variación en la respuesta a los compuestos A $\beta$ A puede ser debida a su afinidad por receptores  $\beta_1$  o  $\beta_2$ , por su vida media o por el tiempo de exposición al tratamiento, razón

por la cual puede explicarse como el zilpaterol no ocasionó ninguna alteración del ciclo estral, ya que es un compuesto  $A\beta_2A$  específico.

A pesar del incremento en la síntesis y liberación de progesterona reportado para los  $A\beta A$  en estudios *in vivo* e *in vitro* en ovinos (Wheeler *et al.*, 1988) y bovinos (Skarzynski y Kotwica, 1993; Miszkiel y Kotwica, 2001), en el presente estudio las concentraciones séricas de progesterona en los animales tratados con zilpaterol fueron ligeramente mayores durante el diestro aunque estadísticamente no difirieron. La longitud del ciclo estral y del diestro fueron similares lo que indica que la vida media del CL no se ve afectada por el tratamiento. Se ha reportado que el efecto sobre la esteroidogénesis se obtiene al estimular receptores tanto  $\beta_1$  como  $\beta_2$ , lo que se demostró en CL bovinos *in vitro* (Miszkiel y Kotwica, 2001). Además se ha reportado que la producción de progesterona es dosis dependiente, ya que a mayor cantidad de  $A\beta A$  que se aplique se genera una respuesta mayor (Kotwica, 2002). Por lo que en este estudio las concentraciones observadas pueden deberse a que la cantidad de zilpaterol administrada no fue capaz de estimular una mayor liberación de progesterona y a que es un compuesto específico de receptores adrenérgicos  $\beta_2$  por lo que el estímulo directo pudo no ser suficiente para generar una respuesta mayor en la producción de progesterona. Alternativamente, es posible que no se haya detectado diferencia debido al bajo número de animales en el estudio.

Los efectos del zilpaterol sobre las principales variables corporales fueron los demostrados con anterioridad para el zilapterol y otros  $A\beta A$ . El zilpaterol mejoró la ganancia diaria de peso en un 30% similar al 27% reportado por Plascencia *et al.* (1999) en novillos tratados con zilpaterol y superior al 20% reportado por Chikhou *et al.* (1993) en becerros tratados con cimaterol. Aún cuando no se había reportado una disminución del tejido adiposo en animales tratados con zilpaterol (Plascencia *et al.*, 1999; Garza, 2002), en nuestro estudio se observó una disminución del 26% de la grasa dorsal en las vaquillas tratadas, lo que concuerda con lo encontrado por Chikhou *et al.* (1993) en becerros tratados con cimaterol. El aumento en 16% de la profundidad del músculo largo dorsal mostrado por los animales tratados es menor al 28% reportado por Schiavetta *et al.* (1990) en novillos tratados con clenbuterol y similar a lo encontrado por Miller *et al.* (1988) en vaquillas.

Todos los resultados encontrados en este estudio corresponden a lo reportado para los compuestos A $\beta$ A cuando son empleados como promotores de crecimiento, demostrando sus efectos de repartición de nutrientes (Dunshea, 1993; NRC, 1994; Mersmann, 1998; Beermann, 2002; Birkelo, 2003).

Los compuestos A $\beta$ A además de ocasionar diferencias en peso y composición corporal en los animales tratados, también modifican las concentraciones sanguíneas de algunas hormonas metabólicas, como la insulina. Las concentraciones plasmáticas de esta hormona se elevaron de manera aguda en los animales tratados, comparadas con los controles. El incremento agudo en las concentraciones de insulina ha sido reportado en ovinos tratados con cimaterol (O'Connor *et al.*, 1991) donde las concentraciones plasmáticas de insulina fueron superiores en los animales tratados durante las primeras 12 horas. Asimismo en novillos tratados con cimaterol el incremento agudo en las concentraciones de insulina fue de 600% dentro de las primeras 8 horas de tratamiento (Chikhou *et al.*, 1991). El efecto agudo mostrado por el zilpaterol en las concentraciones séricas de insulina en este estudio fue similar al reportado para el cimaterol y otros A $\beta$ A. Se ha encontrado que los A $\beta$ A son capaces de estimular directamente a las células  $\beta$  pancreáticas para liberar insulina (Philipson, 2002) por lo que el incremento agudo en los tratamientos con A $\beta$ A puede ser debido, en parte, a esta estimulación. También los A $\beta$ A son capaces de inducir glucogenólisis muscular y hepática junto con una lipólisis de manera aguda, eventos que pueden originar un incremento en las concentraciones sanguíneas de insulina (Chikhou *et al.*, 1991; Mersmann, 1998).

La suplementación crónica con zilpaterol ocasionó que los niveles de insulina en los animales tratados fueran inferiores a los de los animales control. En los estudios realizados en ovinos tratados con cimaterol por 3 a 6 semanas (Beermann *et al.*, 1987) o 6 a 12 semanas (O'Connor *et al.*, 1991), los niveles de insulina encontrados en los animales tratados fueron entre 30% y 50% menores que los encontrados en animales control. Sin embargo en el estudio realizado por Zimmerli y Blum (1989) con becerros en crecimiento tratados con 2 compuestos A $\beta$ A (P-5369 y T-3660) de forma crónica, observaron que a los

28 días las concentraciones plasmáticas de insulina fueron similares entre animales tratados y controles. Los efectos del tratamiento crónico con zilpaterol sobre las concentraciones séricas de insulina pueden deberse a una desensibilización de los receptores  $\beta$  adrenérgicos pancreáticos, fenómeno reportado en otros tejidos tratados de manera crónica con A $\beta$ A (Mersmann, 1998). Además, en ratas, se ha reportado un incremento en la sensibilidad hacia la insulina en el tejido muscular y adiposo en tratamientos crónicos con A $\beta$ A (O'Connor *et al.*, 1991). Sin embargo, aunque ambos mecanismos podrían disminuir las concentraciones sanguíneas de insulina, no se conoce con exactitud cual es el que ocurre en animales con tratamientos crónicos de A $\beta$ A.

Contrariamente a lo encontrado para insulina, el zilpaterol no afectó las concentraciones séricas de IGF-I entre grupos. Esta observación es similar a la reportada por O'Connor *et al.* (1991) en ovinos tratados con cimaterol, donde no se afectaron las concentraciones de IGF-I de manera aguda o crónica. En otros estudios han encontrado que en tratamientos agudos los niveles de IGF-I no se alteran con A $\beta$ A (Chikhou *et al.*, 1991), pero el tratamiento prolongado ocasionó una disminución en los niveles de IGF-I (Beermann *et al.*, 1987; Chikhou *et al.*, 1991). En estos estudios se observó que la caída en las concentraciones de IGF-I era paralela a la caída en las concentraciones de insulina. Sin embargo en el presente estudio esta tendencia no se observó.

## 5.1 CONCLUSIÓN

En conclusión, el zilpaterol parece adelantar la presentación del estro y la ovulación en las vaquillas tratadas sin tener efectos sobre la fertilidad, la duración del ciclo estral o la dinámica folicular. Pero si muestra los efectos esperados de los compuestos A $\beta$ A mejorando la ganancia diaria de peso, el peso final y la composición de la canal.

## 6. LITERATURA CITADA

1. Acosta TJ, Yoshizawa N, Othani M and Miyamoto A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  injection in the cow. *Biology of Reproduction* 2002; 66(3): 651-658.
2. Aguado LI, Petrovic SL and Ojeda SR. Ovarian  $\beta$ -adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology* 1982; 110: 1124-1132.
3. Aguado LI. Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microscopy Research and Technique* 2002; 59: 462-473.
4. Al-Hamood MH, Gilmore DP and Wilson CA. Evidence for a stimulatory  $\beta$ -adrenergic component in the release of the ovulatory LH surge in pro-oestrous rats. *Journal of Endocrinology* 1985; 106: 143-151.
5. Aréchiga FC, Galina CS, Hernández-Cerón J, Porras AI, Rangel LE, Romo S, Saharrea A, Valencia J y Zarco LA. Mejoramiento Animal Reproducción Bovinos. México D.F. México: *División Sistema de Universidad Abierta*, 1999.
6. Austin EJ, Mihm M, Evans ACO, Knight PG, Ireland JLH, Ireland JJ and Roche JF. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biology of Reproduction* 2001; 64(3): 839-848.
7. Bao B, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Salfen BE and Youngquist RS. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biology of Reproduction* 1997; 56: 1158-1168.
8. Bearden HJ and Fuquay JW. Applied Animal Reproduction. Fifth Edition. New Jersey, U.S.A.: *Prentice Hall*, 2000.
9. Beermann DH, Butler WR, Hogue DE, Fishell VK, Dalrymple RH, Ricks CA and Scanes CG. Cimaterol-induced muscle hypertrophy and altered endocrine status in lambs. *Journal of Animal Science* 1987; 65: 1514-1524.
10. Beermann DH. Beta-adrenergic receptor agonist modulation of skeletal muscle growth. *Journal of Animal Science* 2002; 80(E. Suppl. 1): E18-E23.
11. Bell AW, Bauman DE, Beermann DH and Harrel RJ. Nutrition, development and efficacy of growth modifiers in livestock species. *Journal of Nutrition* 1998; 128: 360S-363S.

12. Berridge MJ and Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989; 341(6239): 197-205.
13. Bhoola KD, Figueroa CD and Worthy K. Biorregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacological Reviews* 1992; 44(1): 1-80.
14. Biolatti B, Castagnaro M, Bollo E, Appino S and Re G. Genital lesions following long-term administration of clenbuterol in female pigs. *Veterinary Pathology* 1994; 31: 82-92.
15. Birkelo CP. Pharmaceuticals, direct-fed microbials, and enzymes for enhancing growth and feed efficiency of beef. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 2003; 19: 599-624.
16. Byrem TM, Beerman DH and Robinson TF. The beta-agonist cimaterol directly enhances chronic protein accretion in skeletal muscle. *Journal of Animal Science* 1998; 76: 988-998.
17. Byrem TM, Robinson TF, Boisclair YR, Bell AW, Schwark WS and Beermann DH. Analysis and pharmacokinetics of cimaterol in growing Holstein steers. *Journal of Animal Science* 1992; 70: 3812-3819.
18. Cardinali DP y Dvorkin M. Sistema Nervioso Autónomo. En: Tresguerres, JA, Aguilar E, Cachoteiro MV, Loizaga PG, Juliá VL, Martínez VJ, *et al.* editores. Fisiología Humana. Segunda Edición. Madrid, España: *Interamericana – Mc Graw-Hill*, 1999: 142-154.
19. Chikhou FH, Moloney AP, Allen P, Quirke JF, Austin FH and Roche JF. Long-term effects of cimaterol in Friesian steers: I. Growth, feed efficiency, and selected traits. *Journal of Animal Science* 1993; 71: 906-913.
20. Chikhou FH, Moloney AP, Austin FH, Roche JF and Enright WJ. Effects of cimaterol administration on plasma concentrations of various hormones and metabolites in Friesian steers. *Domestic Animal Endocrinology* 1991; 8(4): 471-480.
21. Crews DH, Shannon NH, Crews RE and Kemp RA. Weaning, yearling and preharvest ultrasound measures of fat and muscle area in steers, bulls and heifers. *Journal of Animal Science* 2002; 80: 2817-2824.
22. Cunningham JG. El sistema nervioso autónomo y la médula adrenal. En: Cunningham JG. Fisiología Veterinaria. Tercera Edición. Madrid, España: *Saunders-Elsevier España*, 2003: 80-86.
23. D'Albora H, Anesetti G, Lombide P, Dees WL and Ojeda SR. Intrinsic neurons in the mammalian ovary. *Microscopy Research and Technique* 2002; 59: 484-489.

24. Davis JS, May JV and Keel BA. Mechanisms of hormone and growth factor action in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 1996; 45: 1351-1380.
25. Dees WL, Hiney JK, Schulte TD, Mayerhofer A, Danilchik M, Dissen GA and Ojeda SR. The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors. *Endocrinology* 1995; 136: 5760-5768.
26. Dissen GA, Romero C, Paredes A and Ojeda SR. Neurotrophic control of ovarian development. *Microscopy Research and Technique* 2002; 59: 509-515.
27. Dunshea FR. Effect of metabolism modifiers on lipid metabolism in the pig. *Journal of Animal Science* 1993; 71: 1966-1977.
28. Espey L and Lipner H. Ovulation. In: Knobil E and Neill J. *The Physiology of Reproduction*. Vol. 1. Second Edition. New York: *Raven Press Ltd.*, 1994: 744-763.
29. Fairchild-Benyo DL and Pate JL. Tumor necrosis factor  $\alpha$  alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. *Endocrinology* 1992; 130: 854-860.
30. Ferguson JD, Galligan DT and Thomsen N. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 1994; 77: 2625-2703.
31. Ferruz J, Barria A, Galleguillos X and Lara HE. Release of norepinephrine from the rat ovary: local modulation of gonadotrophins. *Biology of Reproduction* 1991; 45(4): 592-597.
32. Fitz TA, Mock EJ, Mayan MH and Niswender GD. *Biology of Reproduction* 1982; 27: 703-711.
33. Funston RN, Seidel GE, Klindt J and Roberts AJ. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins in bovine serum and follicular fluid before and after the preovulatory surge of luteinizing hormone. *Biology of Reproduction* 1996; 60: 72-77.
34. Garza FJD. Antecedentes y desarrollo técnico del Zilmax® en México. Memorias del 1er. Simposium Internacional sobre  $\beta$ -Agonistas y su Uso en Medicina Veterinaria; 2002 julio 29 y 30; Ciudad Universitaria. México D.F. *FMVZ-UNAM*, 2002: 66-72.
35. Geesink GH, Smulders FJM, Van Laack HL, Van der Kolk JH, Wensing Th. and Breukink HJ. Effects on meat quality of the use of clenbuterol in veal calves. *Journal of Animal Science* 1993; 71: 1161-1170.



36. Gerendai I, Toth IE, Boldogkoi Z, Medveczky I and Halasz B. CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *Journal of the Autonomic Nervous System* 2000; 80: 40-45.
37. Ginther OJ. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science* 2000; 60-61: 61-79.
38. Girsh E, Wang W, Mamluk R, Arditi F, Friedman A, Milvae RA and Meidan R. Regulation of endothelin-1 in the bovine corpus luteum: elevation by prostaglandin F2 alpha. *Endocrinology* 1996; 137: 5191-5196.
39. Gojmerac T, Mandic B, Lojkic M and Bilandzic N. Acute and subacute metabolic and endocrine effects of clenbuterol in female pigs. *Veterinary Research Communications* 2000; 24: 179-187.
40. Gutiérrez CG, Campbell BK, Armstrong DG and Webb R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) production by bovine granulosa cells in vitro and peripheral IGF-I measurement in cattle serum: an evaluation of IGFBP extraction protocols. *Journal of Endocrinology* 1997; 153: 231-240.
41. Hafez ESE y Hafez B. Foliculogénesis, maduración del óvulo y ovulación. En: Hafez ESE y Hafez B. Reproducción en Inseminación Artificial en Animales. Séptima Edición. México, D.F. México: Mc. Graw-Hill Interamericana, 2000: 70-83.
42. Hoffman PC. Optimum body size of Holstein replacement heifers. *Journal of Animal Science* 1997; 75: 836-845.
43. Illera JC, Silván G, Martínez-Mateos MM, Conley AJ, Corbin, J, Blass A, *et al.* Effect of long-term exposure to combinations of growth promoters in Long Evans rats. Part 2: ovarian morphology. *Analytica Chimica Acta* 2003; 483: 233-240.
44. Jordan AW. Changes in ovarian beta adrenergic receptors during the estrus cycle of the rat. *Biology of Reproduction* 1981; 24: 245-248.
45. Koochmaraie M, Shackelford SD, Muggli-Cockett NE and Stone RT. Effect of the  $\beta$ -adrenergic agonist L844,969 on muscle growth, endogenous proteinase activities, and postmortem proteolysis in wether lambs. *Journal of Animal Science* 1991; 69: 4823-4835.
46. Kotwica J, Bogacki M and Rekawiecki R. Neural regulation of the bovine corpus luteum. *Domestic Animal Endocrinology* 2002; 23: 299-308.

47. Kotwica J, Skarzynski D, Jaroszewski J and Kotwica G. Effect of norepinephrine on the release of progesterone and ovarian oxytocin in cattle. *Animal Reproduction Science* 1991; 26: 179-191.
48. Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, Guimaraes MA, Rosa E Silva AAM and Ramírez VD. Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microscopy Research and Technique* 2002; 59: 495-502.
49. MacHAdley, M. Endocrinology. Second Edition. Englewood Cliffs, New Jersey: *Prentice Hall*, 1988.
50. Malamed S, Gibney JA and Ojeda SR. Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat. *Cell Tissue Research* 1992; 270: 87-93
51. Manchee GR, Barrow S, Kulkarni S, Palmer E, Oxford J, Colthup PV, Maconochie JG and Tarbit MH. Disposition of salmeterol xifonate in laboratory animals and humans. *Drug Metabolic Disposition* 1993; 21: 1022-1028.
52. Mayerhofer A and Fritz S. Ovarian acetylcholine and muscarinic receptors: hints of a novel intrinsic ovarian regulatory system. *Microscopy Research and Technique* 2002; 59: 503-508.
53. Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME and Ojeda SR. A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly follicles in the rat ovary. *Endocrinology* 1997; 38(8): 3320-3329.
54. Mayerhofer A, Frungieril MB, Bulling A and Fritz S. Sources and function of neuronal signalling molecules in the gonads. *Medicina (Buenos Aires)* 1999; 59: 542-545.
55. Mersmann HJ. Beta-adrenergic receptor modulation of adipocyte metabolism and growth. *Journal of Animal Science* 2002; 80(E. Suppl. 1): E24-E29.
56. Mersmann HJ. Overview of the effects of  $\beta$ -adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *Journal of Animal Science* 1998; 76(1): 160-172.
57. Meyer HD and Rinke LM. The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *Journal of Animals Science* 1991; 69: 4538-4544.
58. Mihm M, Crowe MA, Knight PG and Austin EJ. Follicle wave growth in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 2002; 37: 191-200.

59. Miller MF, Garcia DK, Coleman ME, Ekeren PA, Lunt DK, Wagner KA, Procknor M, Welsh TH and Smith SB. Adipose tissue, longissimus muscle and anterior pituitary growth and function in clenbuterol-fed heifers. *Journal of Animal Science* 1988; 66: 12-20.
60. Miszkiel G and Kotwica J. Mechanism of action of noradrenaline on secretion of progesterone and oxytocin by the bovine corpus luteum *in vitro*. *Acta Veterinaria Hungarica* 2001; 49(1): 39-51.
61. Moorby JM, Dewhurst RJ, Evans RT and Fisher WJ. Effects of level of concentrate feeding during the second gestation of Holstein-Friesian dairy cows. 2. Nitrogen balance and plasma metabolites. *Journal of Dairy Science* 2002; 85: 178-189.
62. Murdoch WJ. Microtubular dynamics in granulosa cells of periovulatory follicles and granulosa-derived (large) lutein cells of sheep: relationships to the steroidogenic folliculoluteal shift and functional luteolysis. *Biology of Reproduction* 1996; 54: 1135-1140.
63. National Research Council - Board on Agriculture. Metabolic Modifiers: Effects on the Nutrient Requirements of Food Producing Animals. Washington, D.C.: *National Academy Press*, 1994.
64. Neuvians TP, Schams D, Berisha B and Pfaffl MW. Involvement of proinflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -induced luteolysis in bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction* 2004; 70: 473-482.
65. Nicholas B, Scougall RK, Armstrong DG and Webb R. Changes in insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) isoforms during bovine follicular development. *Reproduction* 2002; 124: 439-446.
66. Niswender G and Nett T. Corpus luteum and its control in infraprimates species. In: Knobil E and Neill J. *The Physiology of Reproduction*. Vol. 1. Second Edition. New York: *Raven Press Ltd.*, 1994: 744-763.
67. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK and McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews* 2000; 80(1): 1-29.
68. Norman RJ and Brannstrom M. White cells and the ovary-incidental invaders or essential effectors? *Journal of Endocrinology* 1994; 140: 333-336.
69. Norman, A and Litwack, G. *Hormones*. Second Edition. Washington, D.C.: *Academic Press*, 1997.

70. O'Connor RM, Butler WR, Finnerty KD, Hogue DE and Beermann DH. Acute and chronic hormone and metabolite changes in lambs fed the beta-agonist, cimaterol. *Domestic Animal Endocrinology* 1991; 8(4): 537-548.
71. Payne, J. and Cooke, R. Effect of adrenalin and propanolol on progesterone and oxytocin secretion in vivo during caprine estrus cycle. *Theriogenology* 1996; 49: 837-844.
72. Perera-Marín G, Murcia C, Rojas S, Hernández-Cerón J and González-Padilla E. Pattern of circulating luteinizing hormone isoforms during the estrous and luteal phases in Holstein heifers. *Animal Reproduction Science* 2004; 1-17. *In press*.
73. Pescador N, Soumano K, Stocco DM, Price DA and Murphy BD. Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea. *Biology of Reproduction* 1996; 55: 485-491.
74. Pesta, M.; Muszynka, A.; Kucharski, J; Superata, J. and Kotwica, J. Beta-adrenergic receptors in corpora lutea from different stages of estrus cycle in conscious and slaughtered cattle. *Biology of Reproduction* 1994; 50: 215-221.
75. Philipson LH. Nonrespiratory effects:  $\beta$ -agonists and metabolism. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2002; 110: S313-S317.
76. Plascencia A, Torrentera N and Zinn RA. Influence of the  $\beta$ -agonist, zilpaterol, on growth performance and carcass characteristics of feedlot steers. *Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science* 1999; 50: 331-334.
77. Pou K, Adam A, Lamothe P, Gravel P, Messier J, Gravel A and Ong H. Serum and urinary levels of salbutamol after chronic oral administration in a calf. *Canadian Veterinary Journal* 1992; 33: 467-468.
78. Re G, Badino P, Corradi A, Dacasto M, Cantoni AM, Di Carlo F and Girardi C. Illegal use of growth promoting agents and alterations in bovine female reproductive system. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1991; 87: 423-425.
79. Richards JS, Russell DL, Robker RL, Dajee M and Alliston TN. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1998; 145: 47-54.
80. Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM and Wiltbank MC. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science* 2004; 87: 905-920.

81. Sawyer HR, Niswender KD, Braden TD and Niswender GD. Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF<sub>2α</sub>. *Domestic Animal Endocrinology* 1990; 7: 229-238.
82. Schams D and Berisha B. Regulation of corpus luteum function in cattle – an overview. *Reproduction in Domestic Animals* 2004; 39: 241-251.
83. Schiavetta AM, Miller MF, Lunt DK, Davis SK and Smith SB. Adipose tissue cellularity and muscle growth in young steers fed the β-adrenergic agonist clenbuterol for 50 days and after 78 days of withdrawal. *Journal of Animal Science* 1990; 68: 3614-3623.
84. Siawrys G, Bogacka I, Okrasa S, Kaminski T and Przala J. The effect of stimulators and blockers of adrenergic receptors on LH secretion and cyclic nucleotide (cAMP and cGMP) production by porcine pituitary in vitro. *Animal Reproduction Science* 2002; 69: 73-89.
85. Skarsynski D and Kotwica J. Mechanism of noradrenaline influence on the secretion of ovarian oxytocin and progesterone in conscious cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 1993; 97: 419-424.
86. Smith DJ. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of β-adrenergic agonists in livestock. *Journal of Animal Science* 1998; 76: 173-194.
87. Spicer LJ and Echtenkamp SE. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology* 1995; 12(3): 223-245.
88. Stoffel B and Meyer HHD. Effects of the β-adrenergic agonist clenbuterol in cows: lipid metabolism, milk production, pharmacokinetics, and residues. *Journal of Animal Science* 1993; 71: 1875-1881.
89. Strosberg AD. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Science* 1993; 2: 1198-1209.
90. Sumano H, Ocampo L y Gutiérrez L. Clenbuterol y otros β-agonistas, ¿una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública? *Veterinaria México* 2002; 33(2): 137-159.
91. Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF and Ireland JJ. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 1994; 101(3): 547-555.

92. Webb R, Gutiérrez CG, Gong JG and Campbell BK. Dynamics and aetiology of ovarian follicular cysts in post-partum dairy cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 1998; 33: 285-288.
93. Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutiérrez CG, Garverick HA and Armstrong DG. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction Supplement* 2003; 61: 71-90.
94. Wheeler, A; Lean, J and Walker, M. Peripheral progesterone concentrations in the luteal-phase ewe: effects of a  $\beta$ -adrenergic receptor antagonist and two  $\beta_2$ -adrenergic agonists. *Journal of Endocrinology* (1988); 116: 137-142.
95. Wiltbank MC, Diskin MG and Niswender GD. Differential sections of second messenger systems in the corpus luteum. *Journal of Reproduction and Fertility* 1991; 43, Suppl: 56-75.
96. Zimmerli UV and Blum JW. Acute and longterm metabolic, endocrine, respiratory, cardiac and skeletal muscle activity changes in response to perorally administered  $\beta$ -adrenoceptor agonist in calves. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 1990; 63: 157-172.

## **APÉNDICES Y ANEXOS**

**Cuadro 1.** Efecto de la Administración de Clorhidrato de Zilpaterol por 32 días (dosis 0.15 mg/kg P.V.) sobre la Duración del Ciclo Estral, del Diestro, Diámetro del Folículo Ovulatorio y Área Bajo la Curva de Progesterona en Vaquillas Holstein-Friesian (media  $\pm$  error estándar).

	<b>Zilpaterol (n = 10)</b>	<b>Control (n = 10)</b>	<b>Sig. (<math>\alpha</math>)</b>
<b>Ciclo Estral (Días)</b>	21.2 $\pm$ 0.8	21.1 $\pm$ 0.9	p=0.936
<b>Diestro (Días)</b>	16.1 $\pm$ 0.7	14.5 $\pm$ 0.9	p=0.195
<b>Diámetro del Folículo Ovulatorio (mm)</b>	17.3 $\pm$ 0.3	16.8 $\pm$ 0.3	p=0.183
<b>Progesterona, Área bajo la curva (ng/ml)</b>	46.9 $\pm$ 2.9	38.6 $\pm$ 4.6	p=0.138

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**



**Cuadro 2.** Intervalo entre la Aplicación de D-Cloprostenol y el Estro, Intervalo del Estro al Pico Preovulatorio de LH y Diámetro del Folículo Preovulatorio en Vaquillas Holstein-Friesian en Fase Folicular, tratadas o no con Clorhidrato de Zilpaterol durante 24 días con una dosis de 0.15 mg/kg P.V.

	<b>Zilpaterol (n=4)</b>	<b>Control (n=4)</b>	<b>Sig. (<math>\alpha</math>)</b>
<b>D-cloprostenol al Estro (hr)</b>	40.50	52	p<0.1
<b>D-cloporstenol al pico de LH (hr)</b>	54*	56.5	p>0.1*
<b>Diámetro Folículo Preovulatorio (mm)</b>	16	14	p>0.1

\* En este caso la n=2, ya que el resto de las vaquillas del grupo zilpaterol presentaron celo antes del inicio del muestreo para LH.

**Cuadro 3.** Efecto de la Administración de Clorhidrato de Zilpaterol (0.15 mg/kg P.V.) sobre el Peso Corporal y la Ganancia Diaria de Peso en Vaquillas Holstein-Friesian (media  $\pm$  error estándar)

	<b>Zilpaterol (n = 15)</b>	<b>Control (n = 15)</b>	<b>Sig. (<math>\alpha</math>)</b>
<b>Peso Inicio (Kg)</b>	352.7 $\pm$ 8.6	344.2 $\pm$ 8.4	p=0.48
<b>Peso Final (Kg)</b>	397.5 $\pm$ 9.0	376.6 $\pm$ 7.3	p=0.03
<b>Ganancia de Peso (Kg)</b>	44.8 $\pm$ 4.9	32.4 $\pm$ 3.7	p=0.03
<b>Ganancia Diaria de Peso (Kg)</b>	1.6 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.1	p=0.02

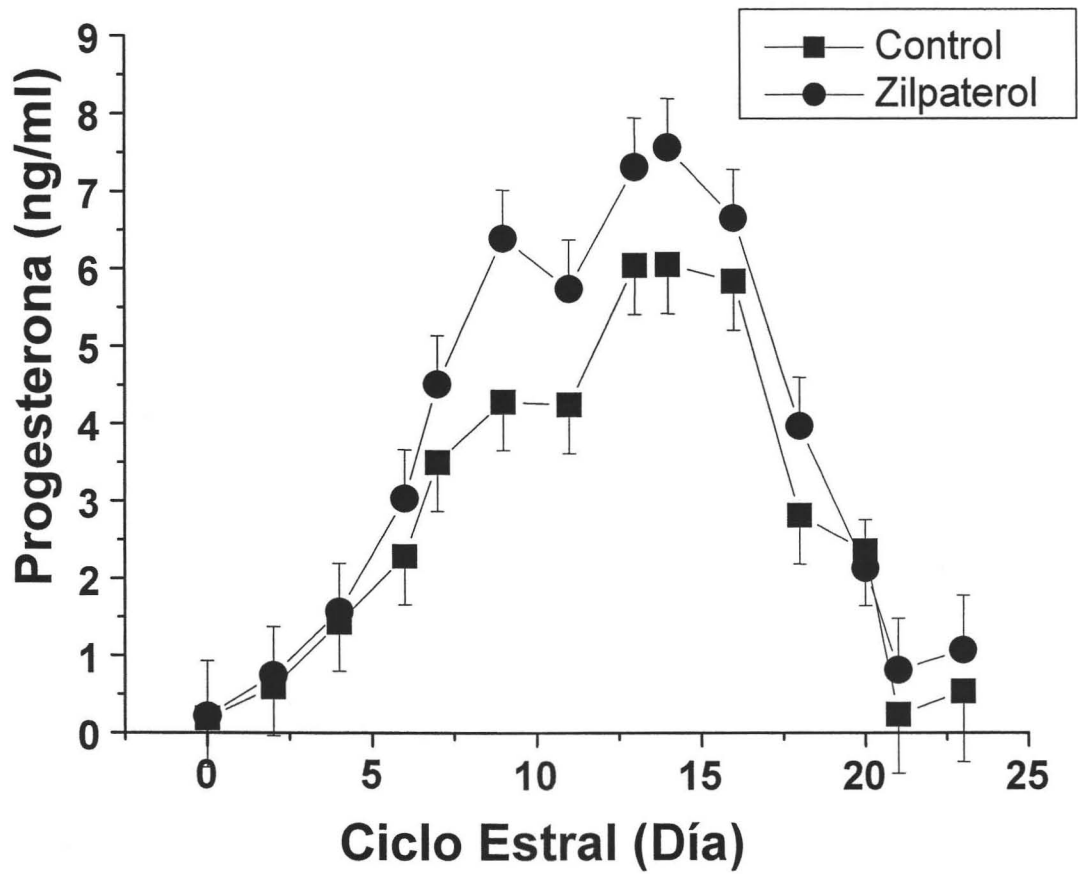
**Cuadro 4.** Efecto de la Administración de Clorhidrato de Zilpaterol (0.15 mg/kg P.V.) en Grasa Dorsal y Profundidad del Músculo Largo Dorsal en Vaquillas Holstein-Friesian (media  $\pm$  error estándar).

	<b>Zilpaterol (n = 15)</b>	<b>Control (n = 15)</b>	<b>Sig (<math>\alpha</math>)</b>
<b>Grasa Dorsal Inicial (mm)</b>	6.9 $\pm$ 0.3	5.8 $\pm$ 0.2	p=0.002
<b>Grasa Dorsal Final (mm)</b>	5.1 $\pm$ 0.2	6.1 $\pm$ 0.3	p=0.008
<b>Cambio en Grasa Dorsal (mm)</b>	-1.8 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.3	p<0.001
<b>Profundidad Muscular (mm)</b>	53.3 $\pm$ 1.6	45.8 $\pm$ 1.2	p=0.001

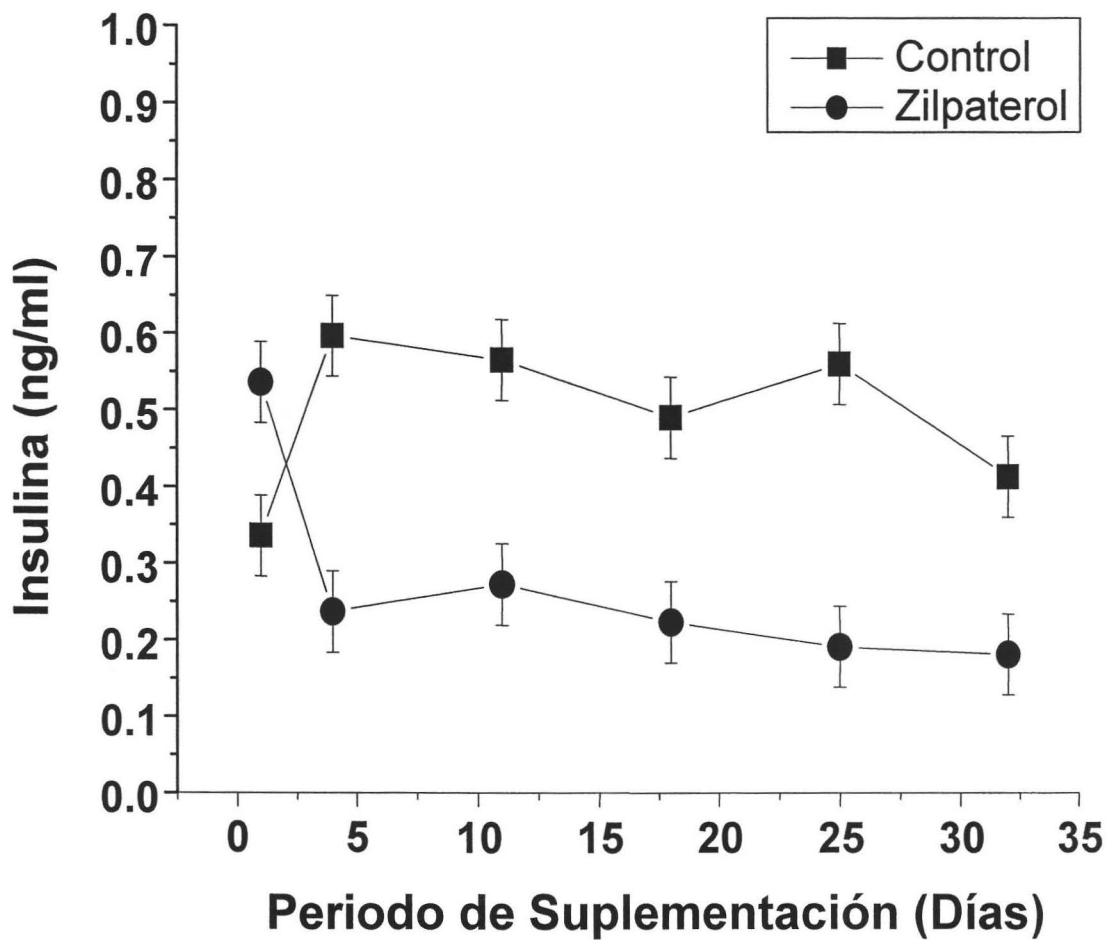
**Figura 1.** Diseño del Experimento 1



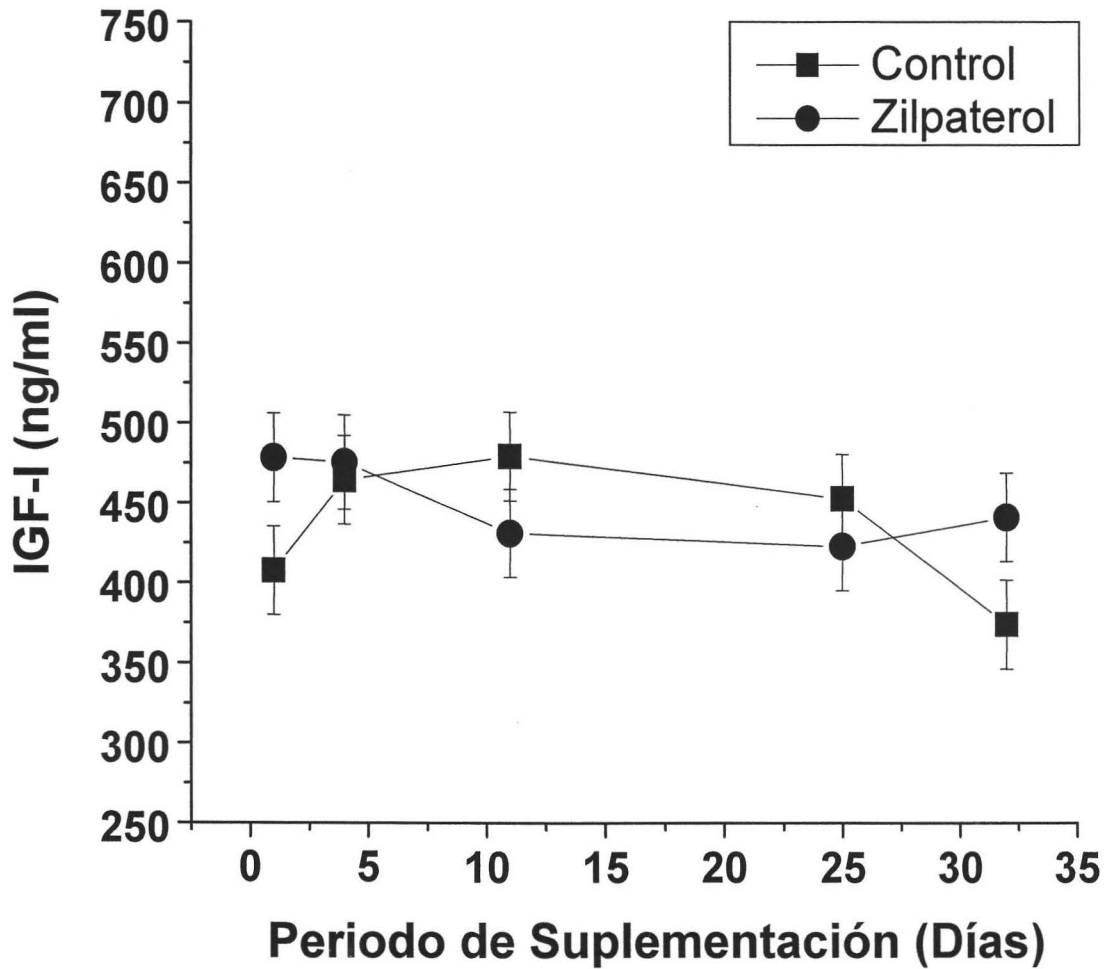
**Figura 2.** Concentraciones séricas promedio de Progesterona durante el ciclo estral de vaquillas Holstein tratadas (●) o no (■) con 0.15 mg/kg P.V. de Clorhidrato de Zilpaterol (Zilmax<sup>®</sup>, Intervet)



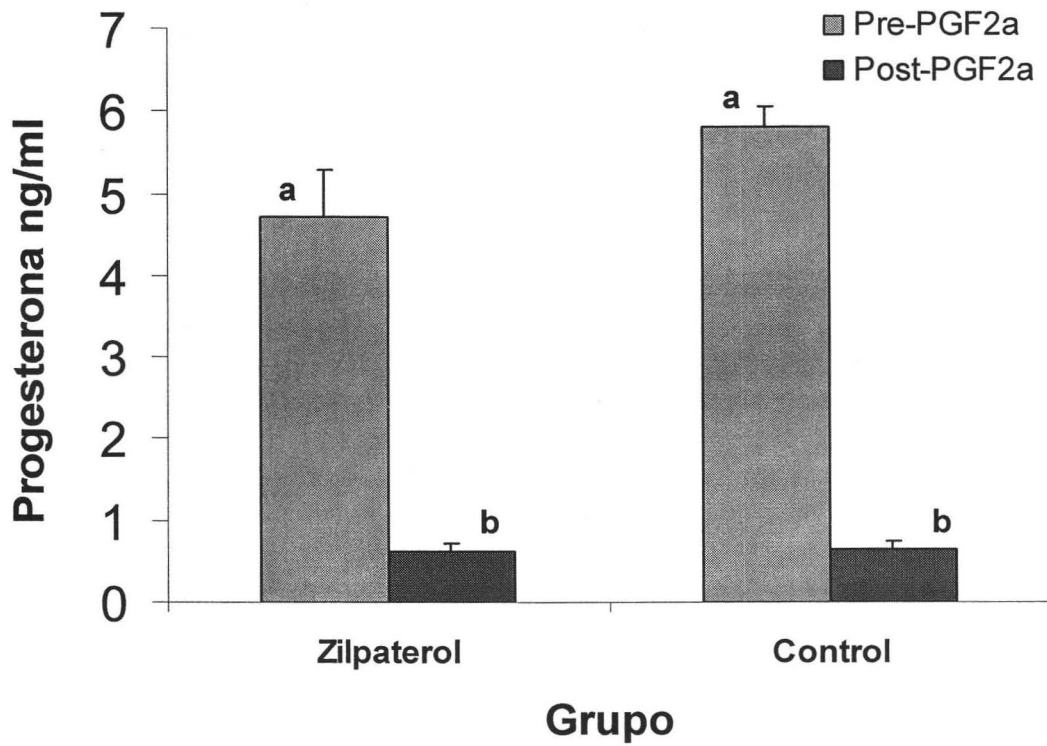
**Figura 3.** Concentraciones séricas promedio de Insulina en vaquillas Holstein tratadas (●) o no (■) con Clorhidrato de Zilpaterol (Zilmax<sup>®</sup>, Intervet) a una dosis de 0.15 mg/kg P.V.



**Figura 4.** Concentraciones séricas promedio de IGF-I en vaquillas Holstein tratadas (●) o no (■) con Clorhidrato de Zilpaterol (Zilmax<sup>®</sup>, Intervet) a una dosis de 0.15 mg/kg P.V.



**Figura 5.** Concentraciones de progesterona en el día 7 del ciclo estral y 24 horas después de la aplicación de D-cloprostenol en vaquillas Holstein tratadas o no con clorhidrato de zilpaterol (Zilmax<sup>®</sup>, Intervet) por 24 días a una dosis de 0.15mg/kg P.V.



Literales distintas denotan diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ )