

Efecto del- β 2-agonista adrenérgico (β 2-aa), en la fisiología del *Bos taurus* X *Bos indicus*

Effect of- β 2-adrenergic agonist (β 2-aa), in the physiology of *Bos taurus* X *Bos indicus*

DOI: 10.34188/bjaerv4n2-010

Recebimento dos originais: 04/01//2021

Aceitação para publicação: 31/03/2021

Ricardo E. Caicedo Rivas

Doctorado En Fisiología Y Endocrinología Comparada
Por La Universidad De Gifu-Japón, Facultad De Agricultura- Rengo Daigaku
Labora: Benemérita Universidad Autónoma De Puebla
Facultad De Ciencias Biológicas/ Area De Morfofisiología Animal/
Profesor Investigador Titular
Dirección: Boulevard Valsequillo Y Ave. San Claudio S/N
Ciudad Universitaria, Edificio Bio-1, Facultad De Ciencias
Biológicas, Laboratorio De Endocrinología De La Reproducción
Y Malacología, No. 347, Colonia San Manuel, C.P 72570, Puebla,
México
E-mail: Ricaido@yahoo.com

Mariana Paz-Calderón Nieto

Licenciatura En Biología Por La Benemérita Universidad Autónoma De Puebla, Facultad De
Ciencias Biológicas, Actualmente Cursa La Maestría En Biología Productiva En El Centro De
Investigaciones De Biología Aplicada, Instituto
Politécnico Nacional-Ipn, Tlaxcala, México
Labora: Complejo Regional Mixteca, (Izucar De Matamoros),
Benemérita Universidad Autónoma De Puebla/Profesora De
Biología
Dirección: Carretera Federal A Izucar De Matamoros S/N, Puebla, México
E-mail: Morella.Paz.Mp@gmail.com

Mariana Estrada Poblano

Estudiante De Tesis En La Licenciatura De Biología.
Escuela De Biología, Facultad De Ciencias Biológicas
Estudiante Pasante: De La Licenciatura En Biología, Facultad De Ciencias
Biológicas, Boulevard Valsequillo Y Ave. San Claudio S/N
Ciudad Universitaria, Edificio Bio-1, Facultad De Ciencias
Biológicas, Laboratorio De Endocrinología De La Reproducción
Y Malacología, No. 347, Colonia San Manuel, C.P 72570, Puebla,
México
E-mail: marianaestrada.p@hotmail.com

RESUMEN

El incremento de la población humana en las últimas décadas ha traído como consecuencia la demanda de alimentos, principalmente productos proteicos de origen animal como: ovino, caprino,

porcino, camélido, bufalino, equino, así como de la fuente más importante, es decir, los productos procedentes de bovinos. Los grandes avances en el mejoramiento genético y en la calidad nutricional de los animales, no han sido suficientes para producir productos proteicos de alta calidad nutricional; además, los cambios climáticos globales y las enfermedades (zoonosis), también han contribuido a esta disminución de productos alimenticios, permitiendo que las industrias desarrollen productos químicos (fármacos-anabólicos) que alteran la condición corporal de los animales, sin tomar en cuenta el metabolismo (anabolismo y catabolismo) o sea la degradación de los mismos por parte de los órganos involucrados. El objetivo de este estudio fue determinar, por una parte, las concentraciones del β_2 -agonista-adrenérgico (clenbuterol=Clb) en animales bovinos destinados al sacrificio para consumo humano, y por otro lado detectar, las alteraciones de componentes fisiológicos por efectos del clenbuterol; para esto se determinó el perfil metabólico, con 14 parámetros metabólicos diferentes (kit-Bio-System, USA), y se midieron las concentraciones de hormonas: 17β -Estradiol (E_2) y progesterona (P_4) (kit diagnóstico, USA) las concentraciones de clenbuterol se detectaron en suero (kit RIDASCREEN, clenbuterol- Fast-R-Biopharm, AG, Darmstadt, Germany). Los resultados demostraron que los valores de Clb detectados en animales bovinos fue del orden de 125.0-783.8 ng/ml, (según la literatura-FAO,1993, la concentración de 125 ng/ml es el límite máximo residuo=MRL); mientras que las concentraciones de $17\beta_2$ -Estradiol fluctuaron entre 152.1 ± 8.9 - 1152.3 ± 89.7 pg/ml, y los niveles de progesterona oscilaron entre 248.5 ± 12.5 a 852.4 ± 90.2 pg/ml, ambas hormonas esteroideas se detectaron en hembras tratadas con Clb, sin pasar por un periodo de cuarentena; estos bovinos hembras se mantuvieron en un periodo de anestro por más de 120.6 ± 6.3 a 150.8 ± 8.9 días, hasta ser enviados al matadero. Los datos obtenidos indican que probablemente el Clb puede afectar la funcionalidad de los órganos reproductores de la hembra y posiblemente en machos. Las dosis dadas a los animales fueron 10 veces mayores a la estipulada por el *Codex Alimentarios* de la FAO, ($0.8\mu\text{g}/\text{kg}$ dos veces al día), sin embargo, esto no está bien dilucidado, los datos muestran que los animales que van al rastro no pasan por un período de cuarentena cuando son alimentados con Clb, convirtiéndose su producto en nocivo para el consumo humano, esto hasta cierto punto puede explicar el índice de intoxicaciones que se presentaron en 17 estados de 32 estados del país. Por otro lado, se diagnosticaron animales con fasciolosis (*Fasciola hepática*), los mismos que fueron sometidos a la alimentación con Clb por más de 90 días; los datos encontrados en este estudio sanguíneo, a través de la medición de enzimas hepáticas como: Gamma glutamil-transferasa (γGT), Alanina amino- transferasa (ALT/GPT) y Aspartato amino-transferasa (AST/GOT), estos valores enzimáticos resultaron más elevados en animales con fasciolosis sin tratamiento, que en animales control (sin parásito y sin Clb), y en bovinos con *F.h* y Clb. Se demuestra que este β_2 -agonista-adrenergico, Clb enmascara la enfermedad, ya que los animales no mostraron síntomas ni cambios morfológicos externos, pero sí internos, principalmente en la morfología hepática principalmente, producto de la enfermedad, mientras que lo contrario ocurre en los animales no tratados con Clb. Con este estudio demostramos que el uso del Clb produce profundas alteraciones en las actividades metabólicas de los animales sometidos a este aditivo alimenticio, principalmente en las estructuras hepáticas y que las alteraciones hormonales principalmente de hormonas esteroideas ocurren por los cambios celulares a nivel del ovario y testículos, de igual manera ocurren en la médula adrenal. Sin embargo, aún faltan más estudios para esclarecer el efecto de este β_2 -agonista-adrenérgico (clenbuterol-Clb) en la fisiología de los bovinos alimentado con este fármaco.

Palabras claves: Aditivo alimenticio. Perfil metabólico. Enzimas hepáticas. Hormonas esteroideas.

ABSTRACT

The increase in the human population in recent decades has resulted in the demand for food, mainly protein products of animal origin such as: sheep, goats, pigs, camelids, buffaloes, horses, as well as the most important source, that is, products from bovines. The great advances in genetic

improvement and in the nutritional quality of animals have not been sufficient to produce protein products of high nutritional quality; In addition, global climate changes and diseases (zoonoses) have also contributed to this decrease in food products, allowing industries to develop chemical products (anabolic drugs) that alter the body condition of animals, without taking metabolism into account. (anabolism and catabolism) that is, their degradation by the organs involved. The objective of this study was to determine, on the one hand, the concentrations of the β 2-adrenergic agonist (clenbuterol = Clb) in bovine animals destined for slaughter for human consumption, and on the other hand, to detect alterations of physiological components due to the effects of clenbuterol. ; For this, the metabolic profile was determined, with 14 different metabolic parameters (kit-Bio-System, USA), and the concentrations of hormones were measured: 17β -Estradiol (E2) and progesterone (P4) (diagnostic kit, USA) concentrations of clenbuterol were detected in serum (RIDASCREEN kit, clenbuterol-Fast-R-Biopharm, AG, Darmstadt, Germany). The results showed that the Clb values detected in bovine animals was of the order of 125.0-783.8 ng / ml, (according to the literature-FAO, 1993, the concentration of 125 ng / ml is the maximum residual limit = MRL); While 17β 2-Estradiol concentrations fluctuated between 152.1 ± 8.9 - 1152.3 ± 89.7 pg / ml, and progesterone levels ranged between 248.5 ± 12.5 to 852.4 ± 90.2 pg / ml, both steroid hormones were detected in females treated with Clb, without going through a quarantine period; These female bovines were kept in an anestrous period for more than 120.6 ± 6.3 to 150.8 ± 8.9 days, until they were sent to the slaughterhouse. The data obtained indicate that Clb can probably affect the functionality of the reproductive organs of females and possibly males. The doses given to the animals were 10 times higher than that stipulated by the FAO Food Codex, ($0.8\mu\text{g} / \text{kg}$, twice a day), however, this is not well elucidated, the data show that the animals that go to the trace do not go through a quarantine period when they are fed with Clb, making their product harmful for human consumption, this to some extent can explain the rate of poisonings that occurred in 17 states of 32 states of the country. On the other hand, animals with fasciolosis (*Fasciola hepatica*) were diagnosed, the same that were subjected to feeding with Clb for more than 90 days; the data found in this blood study, through the measurement of liver enzymes such as: Gamma glutamyl-transferase (γ GT), Alanine amino-transferase (ALT / GPT) and Aspartate amino-transferase (AST / GOT), these enzymatic values were higher in animals with fasciolosis without treatment, than in control animals (without parasite and without Clb), and in bovines with Fh and Clb. It is shown that this β 2-adrenergic-agonist, Clb masks the disease, since the animals did not show symptoms or external morphological changes, but they did show internal, mainly in the liver morphology, mainly due to the disease, while the opposite occurs in the animals not treated with Clb. With this study we show that the use of Clb produces profound alterations in the metabolic activities of animals subjected to this food additive, mainly in the liver structures and that hormonal alterations, mainly steroid hormones, occur due to cellular changes in the ovary and testes. , in the same way they occur in the adrenal medulla. However, more studies are still needed to clarify the effect of this β 2-adrenergic-agonist (clenbuterol-Clb) on the physiology of cattle fed this drug.

Keywords: *Food additive. Metabolic profile. Liver enzymes. Steroid hormones.*

1 INTRODUCCIÓN

La utilización de β 2-agonistas principalmente el clenbuterol (Clb), está produciendo un incremento en las intoxicaciones en humanos y animales, principalmente por el uso desmedido de este componente utilizado como promotor del crecimiento muscular (Sumano *et al.*, 2002, Caicedo *et al.*, 2009). Por otro lado, también se han desarrollado otros componentes que mejoran la calidad

corporal de los animales como: antibióticos, prebióticos, enzimas, antimicrobianos, modificadores del sistema inmunitario, modificadores metabólicos o agentes anabolizantes.

En los últimos años, se ha incrementado el uso de los β_2 -agonista-adrenérgicos (β_2 AA) en animales de importancia económica en México; el uso excesivo de estos fármacos como el clenbuterol (Clb) han tenido y siguen teniendo un impacto muy significativo a nivel humano y animal. Su utilización se debe a que aumenta la producción de carne a corto plazo, ya que retienen compuestos nitrogenados, incrementando la condición corporal (Smith, 1998). Estos fármacos β_2 -AA son además agentes químicos que actúan específicamente a nivel de los receptores adrenérgicos celulares, metabolizando los nutrientes y la energía, incrementan el metabolismo de las proteínas y de grasas, modifican la permeabilidad de la membrana celular, aumento de la lipólisis, y la glucogenólisis (Meyer y Rinke, 1991), que traen consigo un incremento en la formación de masa muscular, y esto se debe a que el grupo OH que poseen otros β_2 -AA, es sustituido por un halógeno como en el caso del clenbuterol, este halógeno presente es el cloro-Cl, el mismo evita la biotransformación por las enzimas COMT (catecol-O-metil-transferasa) a nivel tisular y se hace lenta la biotransformación hepática (Courtheyn *et al.*, 1996), este ión cloro en el clenbuterol, lo hace más liposoluble que sus análogos (zilpaterol, salbutamol y ractopamina) y como resultado tiende a difundirse más profundamente en los tejidos y la grasa animal (Martin 1971, Ruffolo, 1991, Waldeck y Widmark, 1995).

La aplicación de β_2 -AA a mamíferos, amplifica la ganancia de peso, esto posiblemente se deba al aumento de la cantidad de ARNt (ácido ribonucleico de transferencia) para varias proteínas del músculo esquelético, en este caso, después del tratamiento con β_2 -AA se incrementa el ARNm para la miosina de cadena ligera (Smith *et al.*, 1998), el ARNm de la α -actina (Helferich *et al.*, 1990) y el inhibidor de la proteasa calpaina-calpastina (Higgins *et al.*, 1988). Los β_2 -AA, pueden incrementar el flujo sanguíneo en ciertas regiones del cuerpo, el mismo permite el proceso de hipertrofia del músculo esquelético al contener mayores cantidades de sustrato y fuentes de energía para la síntesis de proteína.

Teóricamente la utilización de estas sustancias presenta una serie de ventajas relacionadas, no solo con la mejora de la productividad, sino también de la calidad de la carne, puesto que las carnes procedentes de animales tratados con β_2 -agonistas Adrenérgico-clenbuterol, presentan un mayor porcentaje de tejido magro (Beermann, 1993; Waldeck y Widmark 1995 y Mersmann, 1998). Sin embargo, el aumento del uso de β_2 -AA, está relacionado con el incremento de intoxicaciones en humanos, según Kuri, *et al* (2007), estas intoxicaciones a nivel nacional se han incrementado, de 133 casos de intoxicados en 2002, a 1663 en 2009 y 323 en los años 2015-16 (**figura I**), tan solo en el Estado de Jalisco en el año 2009 hubo 1243 casos humanos de intoxicaciones reportadas. En otras

partes del país también hay incidencias de intoxicaciones, de hecho, se han reportado 17 estados de 32 (más del 50% de los estados presentaron intoxicaciones en humanos), con problemas por el clenbuterol y esto representa un problema de salud pública a nivel nacional. En bovinos el clenbuterol (Clb) es considerado como un promotor del rendimiento productivo, por otro lado, no se tiene documentado los efectos de una sobredosis de Clb en esta especie, o la administración por un largo periodo de tiempo, más de lo estipulado de 90 días máximo, pero, posiblemente los efectos no deben ser diferente a lo anterior solo que probablemente cambiara en su magnitud; es de pensar que ha dosis promotora de crecimiento muscular o de la producción o superiores, el problema más bien es su uso ilegal del Clb en el país, y la misma se dirigirá a los riesgos de saber que dosis superiores a las permitidas, representan para el consumidor un peligro de consumir carne contaminada con un producto sintético. Se puede añadir que el Clb ha sido autorizado en la Unión Europea y en los Estados Unidos de Norteamérica, solo para su uso terapéutico en bovinos, equinos y mascotas como broncodilatador y problemas de parto prematuro en estas especies (Kuiper *et al.*, 1998). Considerando como dosis terapéutica (DT) 0.8 µg/kg del peso corporal del animal, dos veces por día. La duración máxima del tratamiento en ganado no lactante permitido es de 10 días por vía oral o intravenosa, en bovinos puede emplearse además por vía intramuscular. El uso ilegal del clenbuterol (dosis anabólicas) y análogos en el ganado es toda dosis que supere la dosis terapéutica (Sauer *et al.*, 1995). Para esclarecer este problema, el objetivo de este estudio fue determinar los cambios fisiológicos en la medición del perfil metabólico y de hormonas esteroideas si son alteradas con uso del β₂-agonistas-adrenérgico (Clb) en bovinos.

2 MATERIAL Y METODOS

ANIMALES

Se utilizaron 650 bovinos (*Bos taurus* X *Bos indicus*) de diferentes zonas geográficas procedentes de rastros municipales y de fincas privadas. Todas las fincas en estudio fueron georeferenciadas con un GPS. Los animales tenían una edad que fluctuaba entre 18 meses a 42 meses de edad, con una condición corporal de 4 y 5, las hembras seleccionadas eran de descarte y muchas eran animales procedentes de fincas lecheras.

DIAGNÓSTICO DE FASCIOLA HEPATICA-FH

Únicamente el diagnóstico se realizó por estudios copro-parasitario, mediante la técnica de sedimentación y confirmado por detección a nivel del parénquima hepático de cada animal sacrificado

TOMA DE MUESTRAS

Se emplearon tubos de ensayo al vacío, el primer tubo sin anticoagulante, para obtener el suero sanguíneo para la determinación de las concentraciones de Clb, del perfil metabólico y perfil hormonal de esteroides principalmente (progesterona- P_4 y $17\beta_2$ -estradiol- E_2) y otro tubo con EDTA, para la realización de frotis sanguíneos y así determinar la biometría hemática (el recuento diferencial de leucocitos y medición de hemoglobina). La sangre sin EDTA fue centrifugada a 2,500 rpm/10min, el suero obtenido se separó en tubos eppendorf y fueron congelados a -20°C para su posterior análisis de metabolitos sanguíneos (se utilizaron kit-Bio-System-USA), se midieron 14 metabolitos tales como: 1) macrominerales: calcio, fosforo; 2) enzimas como: las transaminasas : Alanina amino-transferasa (ALT/GPT) y aspartato amino-transferasa (AST/GOT), Fosfatasa alcalina, Gamma-glutamil transferasa (γ GT), lactato deshidrogenasa (L-DH); 3) metabolitos: albumina, Bilirrubina directa y total, colesterol total, Glucosa, Proteínas totales y Urea/BUN; las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro (Spectronic 20). Para la determinación del clenbuterol (se utilizó el kit RIDASCREEN, Clenbuterol Fast (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany), para medir las concentraciones de esteroides: progesterona (P_4) y $17\beta_2$ -estradiol (E_2), se utilizaron los Kits de Diagnóstico, USA. Para la medición de estos tres parámetros Clb P_4 y E_2 , se utilizó la técnica de inmunodiagnóstico de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el programa estadístico Stat-2 (Olivares, 1994), y para determinar la significancia entre promedios se utilizó Duncan New múltiple range test. Se graficaron con el programa Cricket graph (Macintosh).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo de investigación, se obtuvieron datos significativos que demuestran la eficacia que tiene este β_2 - agonista-adrenérgico (Clb) en producir cambios metabólicos (**tabla 1**), donde se muestran los valores de varios metabolitos detectados en suero en relación al sexo y con base a tener fasciolosis los animales; además, se detectaron niveles de clenbuterol con valor de 125.0 –783.8 ng/kg (figura 2), donde se realizado un muestreo aleatorio en un rastro municipal y se tomó como referencia la concentración detectada en animales tratados con Clb (FAO/WHO, 1993) y que pueden ser consumida la carne, sin embargo, desde el animal No.6 hasta el 17 fueron bovinos que tuvieron concentraciones más elevadas que las permitida (**figura 2**) y que sus productos cárnicos fueron consumidos; estos valores de los animales 6 al 17, no coinciden con los valores aceptados por la FAO/WHO (1992), que es de un máximo 125ng/kg, para ser consumidas, mientras,

que en la figura 3 se muestran las concentraciones de Clb en machos y hembras con diferentes características fisiológicas en relación a animales controles, quienes no tienen ninguna traza de Clb; en el grupo dos de este gráfico muestran que las concentraciones de los animales tratados con Clb y puesto en cuarentena mostraron valores 58.2 ± 2.6 ng/kg en machos y en hembras de 167.4 ± 10.4 ng/kg, la cuarentena es para excretar el exceso de Clb, por lo tanto, los valores no son tan elevados, pero si son significativos con respecto al control ($p < 0.01$); así mismo, en el grupo tres, los animales tratados con Clb y con *Fasciola hepatica* mostraron valores elevados en comparación con los permitidos, valores en machos fue de 182.1 ± 19.4 ng/kg y en hembras de 284.2 ± 20.2 ng/kg, ambos sobrepasan los valores permitidos por la FAO/WHO (1992 y 1993), en el grupo cuatro animales tratados con Clb y sin ningún tipo de afectación por *Fasciola hepatica* y sin ningún tipo de cuarentena mostraron valores muy significativos ($p < 0.01$), en machos de 974.5 ng/kg y en hembras de 485.4 ng/kg, ambos con concentraciones no permitidas para su consumo (**figura 3**), sin embargo, fueron consumidas; estos datos determinan que el Clb enmascara la parasitosis por *Fasciola hepatica* en bovinos.

Por otro lado, al detectarse las concentraciones de hormonas esteroideas en hembras, los valores de estradiol (E_2) obtenido fluctuaron entre 152.1 ± 8.9 – 1152.3 ± 89.7 pg/ml, y valores de progesterona (P_4) oscilaron entre 248.5 ± 12.5 a 852.4 ± 89.6 pg/ml, (**figura 4**), fueron obtenidos de hembras con anestro post parto muy prolongados de uno a dos partos, valores comprendidos entre 120.6 ± 6.3 a 150.8 ± 8.9 días, lo cual nos indica que hay un problema hormonal posiblemente inducido por el clenbuterol (Caicedo *et al.*, 2010). Al realizar la biopsia de los ovarios se detecto una gran cantidad de folículos atrésicos en ambos ovarios, y se detecto concentraciones de Clb en estos ovarios, (estos valores no se muestran en este estudio).

En cuanto al perfil metabólico (**Tabla 1**) se obtuvieron concentraciones de transaminasas: como: AST/GOT (aspartato amino-transferencia) con relación a machos clínicamente sanos y cuyo valor fue de 533.9 ± 0.26 UI, en comparación en machos con Clb cuyo valor fue de 264.7 ± 0.22 , en machos con *Fasciola hepatica* se detectó valores de 751.9 ± 0.23 UI y valores de animales con Clb+*Fh* con valores de 499.5 ± 0.2 UI, como se observa los valores fluctúan entre grupos de tratamiento se puede manifestar que el Clb minimiza las concentraciones de AST/GOT en machos, mientras que hembras de los grupos tratadas con Clb y Clb+*Fh* muestran valores muy similares a hembras clínicamente sanas, a diferencias de las hembras con *Fh* cuyo incremento es significativo ($p < 0.01$), con respecto a hembras clínicamente sanas y los otros dos grupos: Clb y Clb+*Fh*, (**Tabla 1**); estos valores coinciden con Caicedo *et al.*, (2009 y 2010), demuestra que los daños producidos por la *Fasciola hepatica* son muy significativos a diferencia del Clb que lo que produce es una probable reparación tisular con una inhibición de la actividad hepática y destrucción de hepatocitos.

La segunda transaminasa detectada en suero sanguíneo fue la Alanina aminotransferasa (ALT/GPT), en machos clínicamente sanos su valor obtenido fue de 345.5 ± 0.6 UI este grupo mostro valores no muy similares en lo referente a machos tratados con Clb, cuyo valor fue de 277.9 ± 0.5 y con Clb+Fh y cuyo valor obtenido fue de 316.7 ± 0.5 , en comparación con machos con *Fasciola hepatica* su valor obtenido fue de 559.7 ± 0.5 UI, se detectó concentraciones elevadas con respecto a los demás grupos de machos tratados con Clb y en machos sanos, estos valores obtenido pueden demostrar que posiblemente el Clb enmascara los daños producidos por la *Fasciola hepatica*. En el grupo de las hembras podemos adicionar que los números obtenidos son diferentes, pero la información que se da es la misma obtenida en machos, el cual determina que el Clb inhibe el daño hepático producido por Fh.

En tanto que otra enzima específica para detectar daños hepáticos como es la Gamma Glutamyl-transferasa (γ GT), se obtienen valores más bajo en animales machos tratados con Clb 16.7 ± 0.3 UI mientras que en machos con Clb +Fh el valor obtenido fue de 26.9 ± 0.29 UI, este valor obtenido es casi similar a machos clínicamente sanos (26.5 ± 0.3 UI), mientras que machos con *Fasciola hepatica*, los valores obtenido son el doble, esto fue de 53.3 ± 0.3 UI, a los machos clínicamente sanos, estos valores son significativos ($p < 0.05$), (**figura 5**), en cambio en hembras los datos obtenidos, son también muy similar obtenido en machos, demostrándose que el Clb tanto en machos como en hembras enmascara los daños producidos por *Fasciola hepatica* en bovinos, estos resultados concuerdan con Caicedo *et al.*, (2009 y 2010). Por otro lado, las alteraciones enzimáticas detectadas se deben en gran parte también a los daños que Produce la *Fasciola hepatica*.

En cuanto a los metabolitos determinados el colesterol no mostró cambios significativos en ninguno de los dos grupos, solo en hembras con Clb y *Fasciola hepatica*, cuyo valor disminuyo significativamente ($p < 0.05$), con relación a hembras clínicamente sanas (212.5 ± 0.23 y 105.8 ± 0.25 mg/dL, respectivamente); en cuanto a la glucosa en machos clínicamente sanos los valores se incrementaron en machos tratados con Clb y machos con Clb y Fh, si se compara con machos clínicamente sanos el aumento fue significativo ($p < 0.05$), en hembras el aumento fue casi similar que en machos (**Tabal 1**), los grupos de tratamiento que aumentaron de forma significativa en este grupo de hembras fueron los animales tratados también con Clb y Clb + Fh., en cuanto a macrominerales: en el calcio, los cambio detectados fueron mas en machos en animales con *Fasciola hepatica* y el machos con Clb y Fh, en cuanto al fosforo no hubo detección de cambios de valores significativos.

La bilirrubina al igual que en la detección de proteínas totales no fluctuó significativamente en ningún grupo tratado, en cambio la Urea/Bun hubo cambios significativos ($p < 0.05$) en machos y en hembras tratados con: Clb; *Fasciola hepatica*; y Clb +Fh, demostrándose que el Clb es un

componente químico que obtiene nitrógenos para sintetizar aminoácidos y a su vez formar moléculas de aminoácidos y finalmente producir proteínas e incrementar la masa muscular de los animales tratados (Helferich *et al.*, 1990, Mersmann, 1998). Esto también puede indicar que el Clb afecta la actividad metabólica hepática de los animales que son alimentados con este β_2 -agonista-adrenérgico, debido quizás a él halógeno de ión cloro (Cl). (Courtheyn *et al.*, 1996). Por otro lado, si comparamos los resultados con los animales que no son alimentados con este β_2 -agonista-adrenérgico, podría indicar que el Clb por poseer dos halógenos en su estructura química, el mismo permite que, este ión cloro (Cl), retarde la actividad metabólica del Clb, por ello su efecto es mucho más prolongado que otros agonistas β_2 -AA y su excreción total también es más retardada (Martin 1971, Ruffolo, 1991, Waldeck y Widmark, 1995).

Además, no está muy bien dilucidado el efecto que tiene el Clb en las actividades fisiológicas del sistema reproductor en hembras y machos, sin embargo, en este estudio se demuestra que los bovinos con una alta ingesta de Clb, su actividad reproductiva se ve muy comprometida por las altas concentraciones de P_4 y E_2 presente, por tal motivo la actividad reproductiva disminuye, (Caicedo *et al.*, 2009 y 2010). Se puede también considerar que los β_2 -AA, estimulan a la glándula suprarrenal para producir glucocorticoides (dexametasona y betametasona); el efecto del clenbuterol a nivel de esta glándula aún no está bien claro. Es muy probable que en hembras el Clb estimule la producción de esteroides (P_4 y E_2), a nivel de los ovarios como progesterona y estradiol, principalmente y en machos incremente los niveles de andrógenos como la testosterona (T), sin embargo, se desconoce el daño probable que puede producir el clenbuterol en los órganos reproductivos, debido a que en ellos se producen estos esteroides, no obstante, también hay que considerar el efecto del Clb a nivel de la glándula suprarrenal, en incrementar posiblemente los glucocorticoides y mineralcorticoides, trayendo consigo el aumento en la producción de los esteroides (estrógenos y progestanos) y otros componentes hormonales en este órgano, (Caicedo *et al.*, 2010).

Con base a esto podemos también considerar que el clenbuterol produce un incremento de la actividad del sistema nervioso, que conduce a la pérdida del apetito, lo cual puede ser debido a la sensación de malestar del animal o a la actividad glucogenolítica y lipolítica, bloqueando los centros del apetito mediante señales de sobrecarga procedentes de los receptores quimiostáticos (Caicedo *et al.*, 2010). Al ser capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, es posible que la reducción del consumo de alimentos pueda ser atribuida a un exceso de la estimulación β_2 -adrenérgica (clenbuterol u otro β -agonista) a nivel del sistema nervioso central.

Los efectos promotores del crecimiento ejercidos por el Clb son fuertemente mediatizados por la estimulación directa de los receptores β_2 adrenérgicos (β_2 -AR) (Helferich *et al.*, 1990, Ni *et al.*, 2010) localizados en el tejido muscular y también, indirectamente por las variaciones de las

concentraciones plasmáticas de hormonas catabólicas o anabólicas (Higgins *et al.*, 1988), como puede ser el caso de los glucocorticoides, la hormona del crecimiento (GH) o la insulina. Si las hormonas pueden alterar la respuesta del tejido adiposo frente a las catecolaminas endógenas, también pueden afectar a la respuesta de la musculatura esquelética frente a los agonistas β_2 exógenos, (Sumano *et al.*, 2002). El estudio comprueba que el Clb, por lo tanto, modifica la composición de los animales de la canal, puesto que en animales tratados con β_2 -agonistas, se observa un aumento en el depósito de proteína (15%) y una disminución en la de grasa (18%) (Lueso y Gómez, 1990). El crecimiento muscular, como respuesta al tratamiento con β_2 -agonistas-adrenérgico, es una hipertrofia del tejido muscular esquelético estriado, lo que se demuestra por los estudios realizados por Beermann *et al.*, (1986) en ratas y por Martin *et al.*, (1990) en vacas. Los efectos de los β_2 -agonistas sobre el sistema endocrino, son debidos en gran parte a la liberación de otras hormonas (Caicedo *et al.*, 2009). Una de ellas podría ser las acciones de las catecolaminas que podría inhibir la secreción de insulina, el aumento de glucagón y el estímulo de la liberación de hormona adrenocorticotropa (ACTH), somatotropa (STH) y gonadotropinas como: FSH y LH, (Beermann *et al.*, 1987). Sin embargo, existe una sorprendente falta de información sobre los efectos del clenbuterol en la glándula suprarrenal, que es aún más sorprendente si pensamos que existen receptores β_2 -adrenérgicos en esta glándula, y que la médula adrenal es uno de los tejidos que sintetizan y secretan las catecolaminas naturales y que la glándula adrenal sintetiza y secreta los glucocorticoides y por último, que la implicación directa de esta glándula en los mecanismos de adaptación del organismo al estrés tanto a corto como a largo plazo.

Los efectos de los β_2 -agonistas-adrenérgicos en el metabolismo de las grasas son muy difíciles de definir, sin embargo, actúan indirectamente en la deposición de grasa, al aumentar la velocidad metabólica y el gasto energético de los animales tratados y al dispararse con la termogénesis, parte de la energía ingerida, evita la formación de grasa y por otra parte el efecto directo está en aumento de los niveles de AMP cíclico en el tejido adiposo, el ATP se transforma en AMP cíclico que activa a ciertas proteínas como las proteínas quinasas que por fosforilación estimulan a una lipasa intracelular que transforman los triglicéridos en ácidos grasos y glicerol. Este mecanismo aumenta la lipólisis y disminuye la lipogénesis, igualmente este mecanismo dependerá de la especie animal en que estemos tratando, es por ello, que el aumento de la concentración administrada y el tiempo en que los animales son sometidos a este β_2 -agonista, juega un papel muy importante en el efecto a corto y mediano plazo, para la administración de este. (Higgins *et al.*, 1988; Sumano *et al.*, 2002)

4 CONCLUSIONES

En base a los estudios previos y los datos que se han obtenido en este estudio se concluye lo siguiente: La administración de clenbuterol, a dosis anabolizante de cinco a diez veces la concentración terapéutica, causa una alteración de la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal-gonadal-hepático en bovinos, y que en algunos casos puede ser reversible, después de un periodo de retirada o cuarentena y en otros no. Un hecho muy importante es que la asociación de clenbuterol con otros componentes hormonales, provoca un efecto promotor del crecimiento más visible y mantenido, ya que se ha comprobado que a las 24 horas de la retirada del clenbuterol el efecto promotor del crecimiento disminuye, el fármaco mantiene la ganancia de peso incluso 25 días después de la retirada del tratamiento y, además, la retención de los β_2 -agonistas, en varios tejidos hace que sea muy difícil su eliminación de dichos órganos, el cual, aún no se ha podido determinar. Las alteraciones encontradas en la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal-gonadal-hepático, hace sospechar que, tras la utilización de promotores del crecimiento, como el clenbuterol, el bienestar animal y la salud del animal, pueden estar seriamente comprometidos. Además, la asociación de otros compuestos que, en teoría, no presentan carácter anabolizante como son los glucocorticoides de síntesis (dexametasona-betametasona), no sólo incrementa el efecto promotor del β_2 -agonista-adrenérgico, sino que impiden su detección o cuantificación en los órganos y tejidos que se utilizan para detectar tratamientos fraudulentos con estas sustancias, mientras que el efecto promotor del β_2 -agonista sigue activo. Concluimos que sería interesante estudiar el efecto de este componente bajo mejores condiciones y recursos, en utilizar técnicas mucho más sensibles y susceptibles del diagnóstico de este β_2 -agonista-adrenérgico (clenbuterol-Clb), como también detectar sus posibles metabolitos, además la importancia en la activación de otros compuestos (Glucocorticoides) que interactúan promoviendo la productividad del animal. El efecto del Clb es muy marcado en la fisiología hepática, alterando determinadas enzimas y metabolitos tales como: GGT, ALT/GPT, AST/GOT, glucosa, colesterol, bilirrubina y urea/BUN. Finalmente se ha detectado en este estudio que el Clb enmascara los efectos fisiológicos de la parasitosis producida por *Fasciola hepatica* en animales *Bos taurus* y *Bos indicus*.

AGRADECIMIENTO

Este estudio fue patrocinado por la Vicerrectoría de Investigación y estudio de postgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, bajo el Proyecto con clave No. CARR-NAT-08-1. Agradecemos al Dr. Eduardo Monjaraz Guzmán por su colaboración y asesoría en las pruebas inmunodiagnósticas de ELISA. Manifestamos que no hay ningún conflicto de interés de esta investigación

LITERATURA

Beermann, D.H., Bittler, W.R., Hogue DE., Fishell V.K., Dalrymple R, H., Ricks C.A., and Scanes CG. 1986. Toxicity of Clenbuterol, beta adrenergic in animals. *J. Animal Sci.* 65:1514-1524.

Beermann D.H, W.R. Butler, D.E. Hogue, V.K. Fishell, R.H. Dalrymple, C.A. Ricks and C.G. Scanes. 1987. Cimaterol-induced muscle hypertrophy and altered endocrine status in lambs. *J. Anim. Sci.* 65:1514-1524.

Beermann, D.H.1993. Beta-adrenergic agonist and growth. In: M.P. Shreibman, C.G. Scanes, and P.K.T. Pang (ed.) *The endocrinology of growth, Development, and Metabolism in Vertebrates*, pp 345-366. Academic Press, San Diego, C.A.

Caicedo R. R.E., Torres Beltrán A., Hernández, Zepeda J.S., Reséndiz Martínez R., Pérez y Terrón. R. y Cabrera Bautista E. 2009. Effects of beta agonist in the diagnosis of fasciolosis in animal ruminant *Bos indicus* X *Bos taurus*, in the State of Puebla, Mexico. In *International Symposium on sustainable Improvement of animal production and health*. FAO/IAEA, Viena, Austria, Vol1: 183-187.

Caicedo R. R.E., Torres Beltrán A., Martínez Badillo, S.V., Paz Calderón Nieto M., Ramírez Peñaloza M.P., Hernández, Zepeda J.S., Reséndiz Martínez R., Cabrera Bautista E., y Silvia Gómez S.E. 2010. Efectos de los beta-agonistas (clenbuterol), en las actividades fisio hepáticas y reproductivas en rumiantes, En: *XI Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogénéticos*. Joao Pessoa- Paraiba-Brasil, pp. 460-465.

Courtheyn D., Merman's R., Schilt R., y Boenke A. 1996. Beta-agonists in animal feed. II. Optimization of the extraction. *Food Additives Contam.* 13:493-509.

FAO/WHO. 1992. Expert committee on food additives. Residues of some veterinary drugs in animals and food: Monographs prepared by the Four Meeting of the Join FAO/WHO Expert Committee on Food. Geneva Switzerland. Geneva, Switzerland Foods Agriculture Organization. FAO: 614-621.

FAO/WHO. 1993. Expert committee on food additives. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Fortieth report of the Joint World Health Organization. WHO-Technical-Reports-Series. New York: WHO: 832-862.

Helferich W.G, Jump D.B., Anderson D.B., Skjaerlund M.D., Merkel R.A., Bergen W.G. 1990. Skeletal muscle α -actin synthesis is increased pretranslational in pig fed the phenetholamine ractopamina. *Endocrinology*; 126:3096-3100.

Higgins J.A., Lassett Y.V., Bardsley R.G, Buttery P.J.1988. The relation between dietary restriction or clenbuterol treatment on muscle growth and calpain proteinase (EC3.4.22.17) and calpastain activities in lamb. *Br. J. Nutr*; 60:645-652.

Kuiper H. A., Noordam, M. Y., van Doore-Flipsen, M. M. H., Schilt, R. & Roos, A. H. 1998. Illegal Use of β -Adrenergic Agonists: European Community. *J. Anim. Sci.* 76:195-207.

Kuri M.P.; Parres, FJA.; Aguilar V.K. and Mújica V.Y. 2007. Intoxicación por Clenbuterol (segunda y última parte). *Boletín del Centro Nacional de Vigilancia epidemiológica y Control de enfermedades de la secretaría de Salud.* 10-13.

Lueso Sordo, M.J. and Gómez Berzal, M.A. 1990. *Mundo Ganadero* 7: 12-16.

Mersmann, H.J. 1998. Overview of the effect of beta-adrenergic receptor agonist on animal growth including mechanism of action. *J. Anim. Sci.* 221:502-508.

Meyer, H.H.D. y Rinke, M.L. 1991. The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *J. Anim. Sci.* 69:4538-4544.

Maltin, C.A., Delday, M.I., Hay, S.M. Innes, G.M. and Williams, P.E.V. 1990. Effect of beta-adrenergic in beef. *Brit. J. Nutr.* 63: 535-545.

Martin L.E, Hobson JC, Page JA, Harrison AC. 1971. Metabolic studies of Salbutamol-3H: a new bronchodilator in rat, rabbit, dog, and man. *Eur J Pharmacol*; 14: 183-199.

Ni Y, Zhang Q, Kokot S. 2010. Analysis of the interactions of mixtures of two beta-agonists steroids with bovine serum albumin: a fluorescence spectroscopy and chemometrics investigation. *Analyst.*; 135(8):2059-68.

Olivares Sáenz, E. 1994. Paquete de diseños experimentales. FAUANI. Versión 2.5. Facultad de Agronomía. UANL. Martín. NL.

Sauer M. J., Ickett, R. J. H., Limer, S. & Dixon, S. N. 1995. Distribution and elimination of clenbuterol in tissues and fluids of calves following prolonged oral administration at a growth-promoting dose. *J. Vet.Pharmacol. Therap.* 18:81-86.1995

Smith DJ. 1998. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of beta-adrenergic agonists in livestock. *J. Anim. Sci*; 76:173-194.

Smith S.B., Gracia D.K., Anderson D.B., 1989. Elevation of a specific mRNA in longissimus muscle of steer fed ractopamina. *J. Anim. Sci.*; 76:3495-3520.

Ruffolo RE. 1991. Chirality in α and β -adrenoceptor agonists and antagonists. *Tetrahedron*; 47:9953-9980.

Sumano, L.; Ocampo C., Gutiérrez O. 2002. ¿Clenbuterol y otras betas agonistas, Una opción para la producción pecuaria o un Riesgo para la salud humana? *Vet. Mex*; 33 (2), 137-159.

Waldeck B, Widmark E. 1995. Steric aspects of agonism and antagonism at β -adrenoreceptors: experiments with the enantiomers of clenbuterol. *Pharmacol Toxicol*; 56:221-227.

Figura 1. Se muestra el número de intoxicaciones en humanos producidas por el consumo de carne contaminada con clenbuterol, ocurridas en México durante los años 2002-2016, el incremento desde el año 2005 al 2009 fue significativos, ($p < 0.05$). mientras que desde el 2010 los casos de intoxicaciones humanas disminuyeron, aunque en el año 2019 hubo casos esporádicos en la zona norte del país

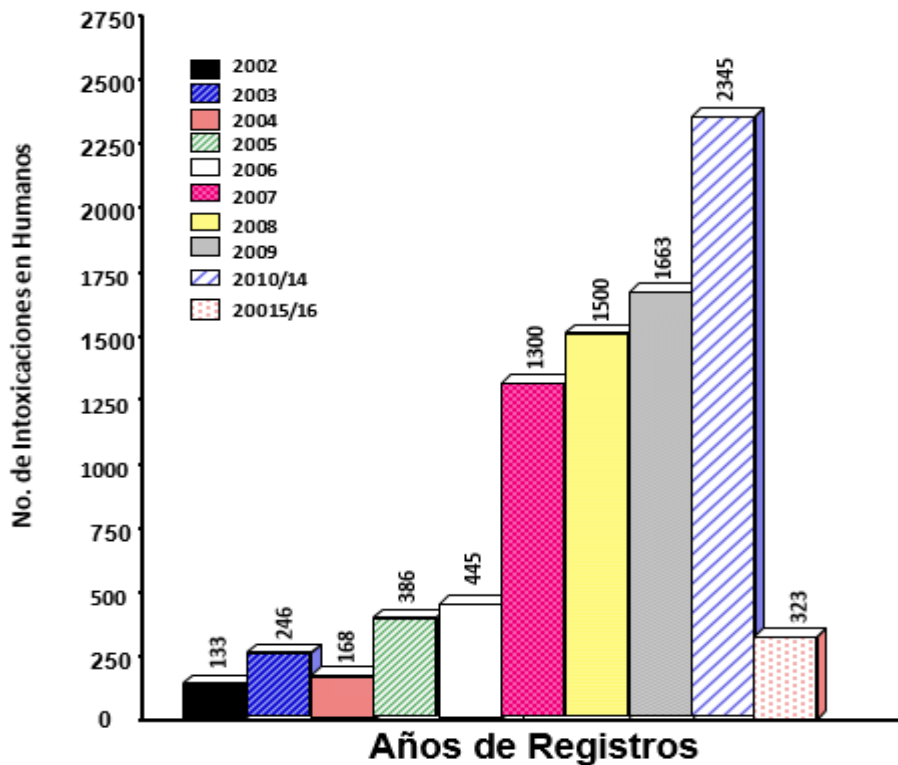


Figura 2: Se muestra los valores de Clb, de animales muestreados aleatoriamente en un rastro municipal; la línea roja indica el valor máximo de Clb permitido para consumo humano que es de < 125.0 ng/ml, se detecta que desde el animal No. 6 (Flecha) se detectaron bovinos con valores muy elevados con respecto a los permitidos según *Codex alimentario*. (FAO/WHO, 1992 y 1993). Estos animales fueron consumidos.

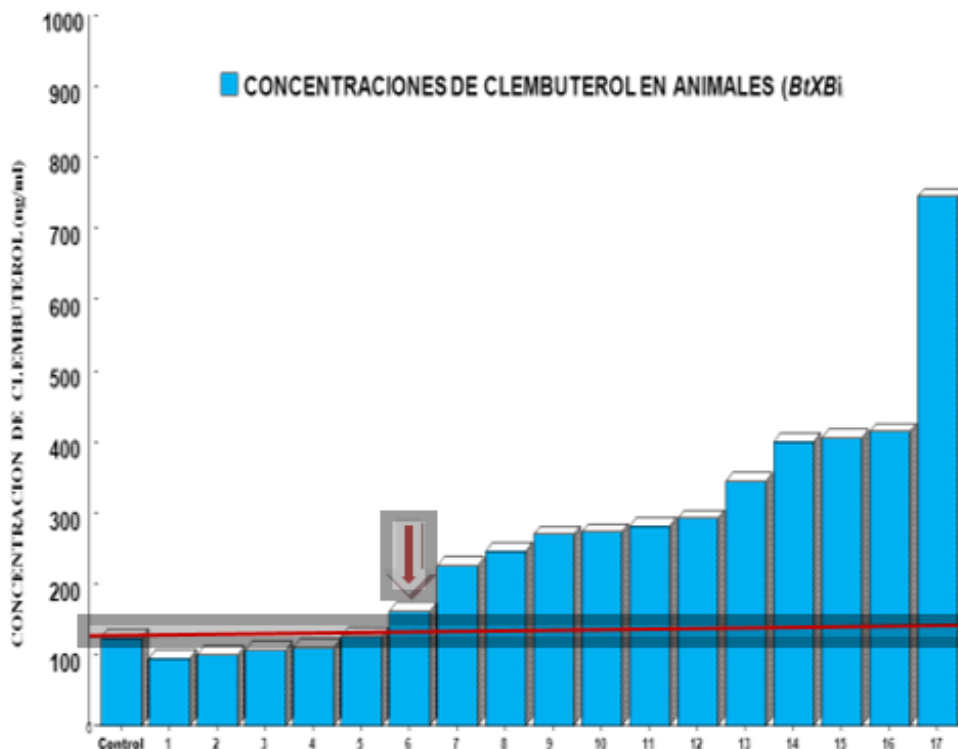


Figura 3: Concentraciones de clenbuterol en diferentes grupos de animales, a) control: se consideran animales clínicamente sanos, sin uso de clenbuterol y sin afecciones parasitarias; b) animales sin parasitosis (fasciolosis), sometidos a una alimentación con clenbuterol (Clb) y llevados a cuarentena durante 20 días, c) animales con fasciolosis (F.h) y alimentados con clenbuterol (Clb) y sometidos a cuarentena durante 20 días d) animales sin fasciolosis y sometidos al clenbuterol (Clb) y sacrificados sin ningún periodo de cuarentena.

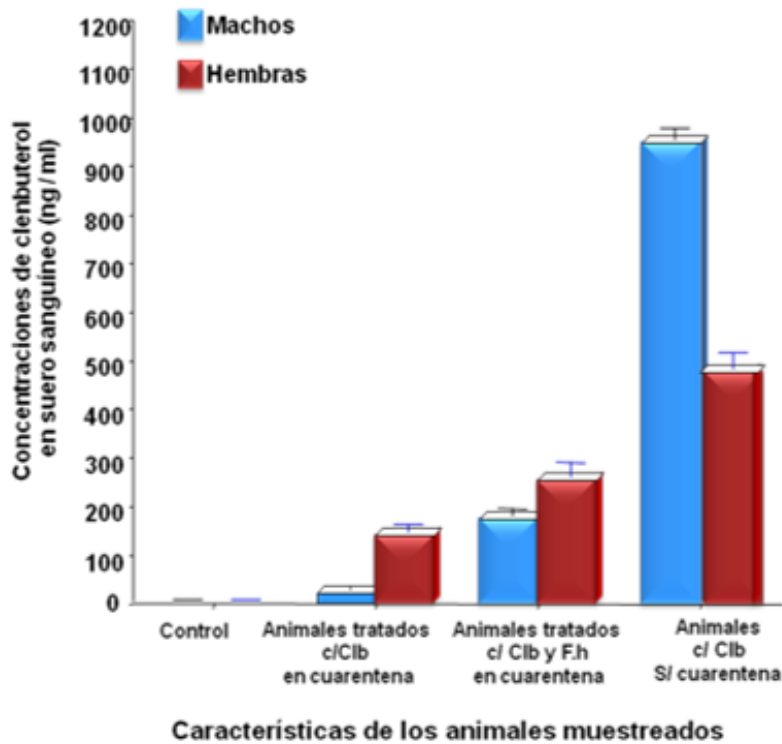


Figura 4: Concentraciones de clenbuterol y de hormonas esteroideas P₄ y E₂, a) control animales sin Clb y sin ningún tipo de afecciones, b) Concentraciones de clenbuterol (Clb) en hembras tratadas y llevadas a un período de cuarentena, c) hembras tratadas con clenbuterol (Clb) y *Fasciola hepatica* (F.h) y d) hembras tratadas con Clb y no fueron sometidas a cuarentena, en este grupo los niveles de hormonas esteroideas y de clenbuterol son muy elevados en comparación con los otros tratamientos.

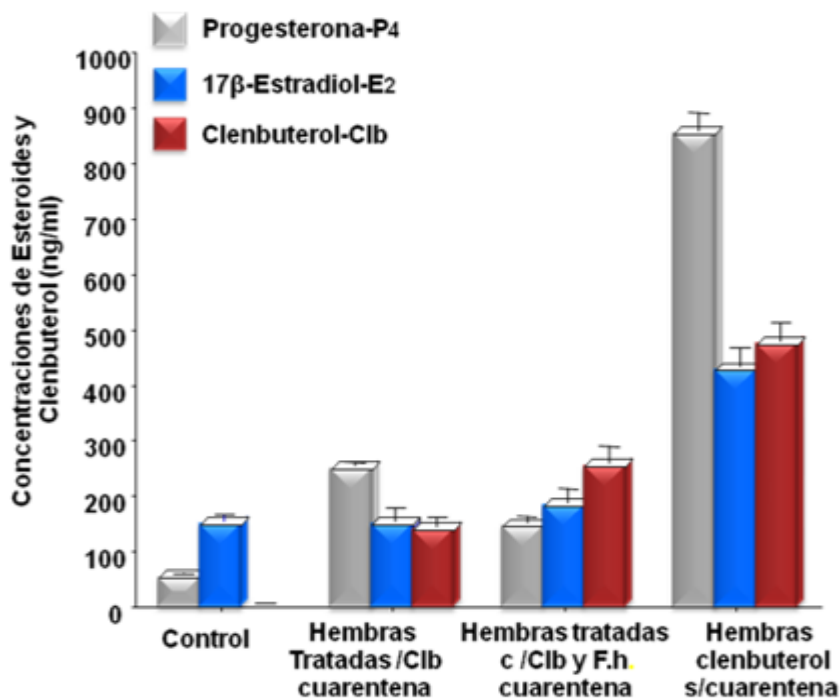


Figura 5: Valores enzimáticos hepáticos de animales clínicamente sanos en comparación con animales con fasciolosis alimentados con clenbuterol, los animales con fasciolosis muestran un nivel muy elevado de enzimas (γ GT, ALT/GPT y AST/GOT) el aumento es significativo ($p < 0.05$). En los animales con clenbuterol el comportamiento enzimático es casi similar al de los animales clínicamente sanos. Los animales clínicamente sanos (control) muestran valores muy similares a los animales tratados con clenbuterol y *Fh*.

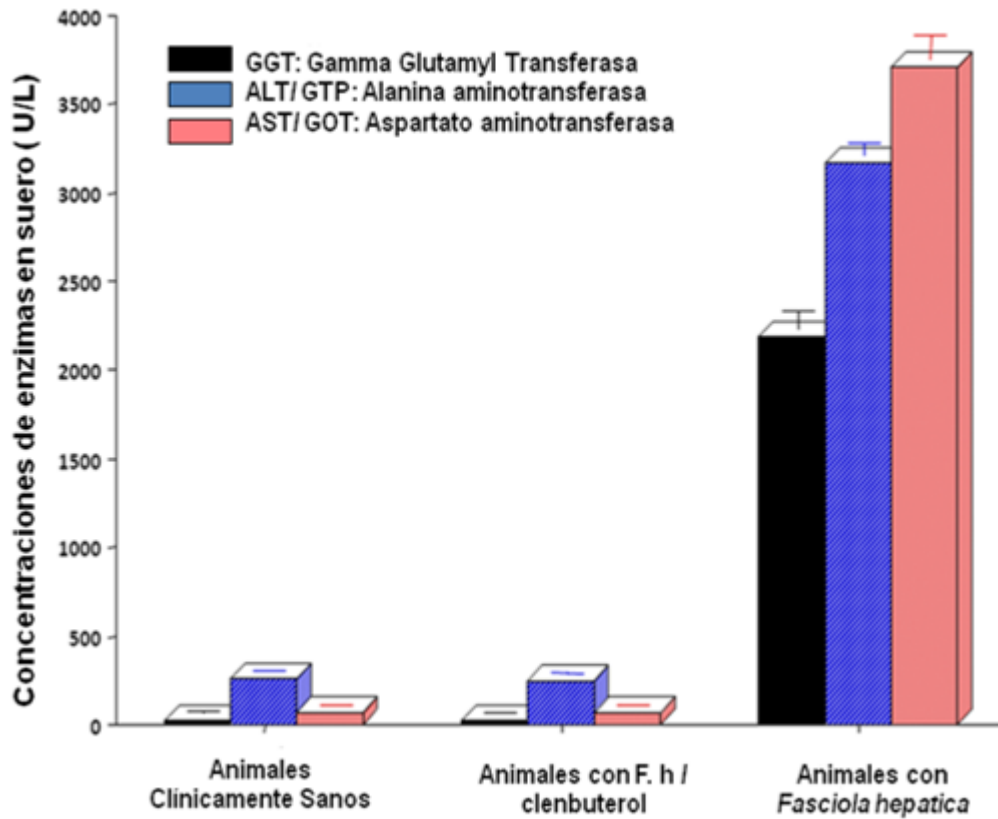


Tabla I: Perfil metabólico de bovinos macho y hembras, bajo diferentes afecciones natural o adquiridas (fasciolosis: *Fasciola hepática*) e inducida (clembuterol), en comparación con el control (animales clínicamente sanos).

| METABOLITOS | SEXO | | | | | | | |
|---------------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------------------|--|-----------------------------|-------------------|-----------------------------------|--|
| | MACHOS | | | | HEMBRAS | | | |
| | Clínicamente Sanos (CS - M) | Clenbuterol (Clb) | <i>F. hepática</i> (<i>F.h</i>) | Clenbuterol + <i>F. h</i> (Clb - <i>F. h</i>) | Clínicamente Sanos (CS - H) | Clenbuterol (Clb) | <i>F. hepática</i> (<i>F.h</i>) | Clenbuterol <i>F. h</i> (Clb - <i>F. h</i>) |
| AST/GOT (U/L) | 533.9 ± 0.26 | 264.7 ± 0.22** | 751.9 ± 0.23** | 499.6 ± 0.2 | 434.5 ± 0.65 | 395.6 ± 0.59 | 680.4 ± 0.65 ** | 436.6 ± 0.62 |
| ALT/GPT (U/L) | 345.5 ± 0.60 | 277.9 ± 0.50* | 559.7 ± 0.50** | 316.7 ± 0.50 | 333.9 ± 0.91 | 450.2 ± 0.90 | 533.2 ± 0.92 ** | 340.8 ± 0.95 |
| GGT (U/L) | 26.5 ± 0.30 | 16.7 ± 0.32* | 53.3 ± 0.28* | 26.9 ± 0.29 | 23.9 ± 0.78 | 28.8 ± 0.79 | 37.9 ± 0.78* | 24.8 ± 0.57 |
| Colesterol (mg/dL) | 264.5 ± 0.33 | 207.8 ± 0.48 | 212.8 ± 0.34 | 223.4 ± 0.22 | 212.5 ± 0.23 | 198.9 ± 0.26 | 189.2 ± 0.24 | 105.8 ± 0.25* |
| Glucosa (mg/dL) | 115.8 ± 0.31 | 195.4 ± 0.34* | 134.8 ± 0.32 | 197.6 ± 0.28* | 111.5 ± 0.34 | 192.4 ± 0.10** | 110.9 ± 0.23 | 199.9 ± 0.2** |
| Calcio (mg/dL) | 11.0 ± 0.36 | 9.0 ± 0.35* | 8.8 ± 0.40* | 12.4 ± 0.33* | 11.04 ± 0.03 | 12.4 ± 0.01 | 11.3 ± 0.02 | 13.9 ± 0.03 |
| Fosforo (mg/dL) | 5.2 ± 0.001 | 5.6 ± 0.002 | 5.3 ± 0.001 | 5.9 ± 0.005 | 5.2 ± 0.01 | 5.9 ± 0.03 | 6.8 ± 0.02 | 5.6 ± 0.02 |
| Bilirrubina (mg/dL) | 0.2 ± 0.002 | 0.5 ± 0.005* | 0.3 ± 0.001 | 0.24 ± 0.001 | 0.2 ± 0.002 | 0.1 ± 0.0019 | 0.3 ± 0.0016 | 0.1 ± 0.0018 |
| Proteínas totales (mg/dL) | 47.8 ± 0.03 | 47.9 ± 0.03 | 46.4 ± 0.02 | 48.7 ± 0.002 | 45.3 ± 0.65 | 45.6 ± 0.70 | 54.8 ± 0.66* | 46.5 ± 0.67 |
| Urea/BUN (mg/dL) | 30.4 ± 0.23 | 95.8 ± 0.28** | 77.4 ± 0.28** | 125.8 ± 0.25** | 29.3 ± 0.23 | 90.1 ± 0.19** | 80.2 ± 0.18** | 100.2 ± 0.20 ** |
| Albumina (mg/dL) | 6.4 ± 0.26 | 5.3 ± 0.23 | 6.34 ± 0.29 | 5.5 ± 0.28 | 5.3 ± 0.13 | 7.6 ± 0.10* | 4.3 ± 0.12* | 6.0 ± 0.12 |

AST/GOT= Aspartato aminotransferase. ALT/GPT = Alanina amino- transferasa; GGT= Gamma- glutamil transferasa. Los asteriscos representan diferencias significativas *($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$). Los animales clínicamente sanos (CS – M y H) fueron aquellos que no presentaron ningún tipo de afección parasitaria ni metabólica y tampoco se sometieron al clembuterol, mientras que los animales con *Fasciola hepática* (*F.h*), su afección se presentó de forma natural y no inducida; y a los animales con clembuterol y *Fasciola hepática* (Clb – *F. h*) fueron animales diagnosticados con *Fasciola hepática* y se sometieron a clembuterol; los animales con clembuterol (Clb) fueron animales que se les administró clembuterol como aditivo alimenticio.