

## **Biocinetica y lesiones histológicas del clorhidrato de clenbuterol en modelo conejo**

Benjamin Valladares, Romulo Bañuelos, Silvia Peña, Valente Velázquez y Jose Zamora

B. Valladares, R. Bañuelos, S. Peña, V. Velázquez, J. Zamora.  
Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.  
Paseo Universidad #100, Universitaria, 50130 Toluca de Lerdo, Estado de México  
Universidad Autónoma de Zacatecas. Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Jardín Juárez #147 Centro Histórico C.P. 98000 Zacatecas, Zacatecas,  
México UAM-Xochimilco. Departamento de Producción Agrícola y Animal.  
Calz del Hueso 1100, Villa Quietud, Coyoacán, 04960 Ciudad de México, Distrito Federal  
benvac2004@yahoo.com.mx

M.Ramos., V.Aguilera., (eds.) Ciencias Agropecuarias, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2014.

## Abstract

In order to evaluate the histopathological alterations according to two different clenbuterol hydrochloride (CCL) concentrations, 15 rabbits were randomly separated into 3 groups in which 0.8 and 16  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  of CCL respectively (T1 and T2) and for T3 (placebo) 1 gr of sugar were administered in drinking water for 28 days. In days 1, 7, 14, 21 and 28, three ml of blood were withdrawn from the marginal vein to collect serum. In day 28 after blood sampling they were weighed, sacrificed and the necropsy performed. Liver and heart tissue samples were collected in 10% formalin for histological procedures. CCL detection was performed in blood serum using an ELISA test (RidascreenClenbuterol FAST®). There were no evident macroscopical alterations either in the carcasses or in the tissues of the treated rabbits; nevertheless, in T3 rabbits there was a greater deposition of fat in the carcasses. Histologically in T2 hearts, multiple hemorrhages, and nuclear pleomorphism and rows of nuclei were observed. In the liver of T1 and T2, 25 up to 50% of tissue alteration was evidenced, showing mild to moderate areas of congestion, hydropic degeneration, pyknosis, karyorrhexis and focal areas of necrosis; in 2/5 rabbits from T2 areas of necrosis, neutrophil and macrophage infiltration surrounded by fibroblasts were observed. Only in rabbits from T1 and T2 CCL levels above detection limit were found from day 7 up to day 28, with a gradual increase of 3068 to 8100 ppt.

## 7 Introducción

El clorhidrato de clenbuterol (CCL) [4-Amino-alfa-[(*tert*-butylamino) metil]-3, 5-diclorobenzil alcohol hidrocloreto], es un fármaco  $\beta$ -agonista del grupo de los  $\beta$ -adrenérgicos, y posee una vida media de acción prolongada, con la particularidad de almacenarse en hígado y riñón, y con un incremento notorio en la síntesis de proteína muscular (Ramos et al., 2009; Valladares-Carranza et al., 2013).

Para mejorar la conversión alimenticia con un menor costo de producción y “mejores” características de la canal en las especies de abasto, en diferentes unidades de producción animal se ha implementado el uso de  $\beta$ -agonistas adrenérgicos. En México se ha utilizado el clorhidrato de zilpaterol (Castellanos et al., 2006), y el clorhidrato de clenbuterol (Valladares-Carranza et al., 2014). Aunque en particular el uso del CCL en la producción animal está prohibido (Geesink et al., 1993; Kuiper et al., 1998; LFSA, 2007; SAGARPA 2000), se continúa utilizando de manera irracional, constituyendo un riesgo en la salud pública (Daubert et al., 2007).

El tiempo de retiro del CCL cuando se utiliza a una dosis convencional para mejorar la ganancia de peso y rendimiento de la canal en bovinos es de 4 semanas, sin embargo en sobredosisaciones se desconoce el tiempo requerido para que el producto o subproductos de origen animal sean “inocuos” para el consumidor. No obstante, su uso terapéutico adecuado en medicina veterinaria no tendría riesgo de intoxicación, pero debido a la sobreutilización y sobreadministración hasta el último momento en los corrales de engorda del ganado (bovinos, cerdos y aves principalmente), los productos y subproductos consumibles no garantizan el estar libres de dicha sustancia; el tiempo de permanencia de 6, 28 y 56 a 60 días en músculo, riñón e hígado respectivamente, son en el mejor de los casos una cuestión que debe considerarse en inocuidad alimentaria (Elliot et al., 1995; Ramos et al., 2009).

Considerando las particularidades que el conejo tiene por su fisiología y anatomía, para valorar y conocer la cinética del CCL; y además que la carne de conejo actualmente tiene una demanda importante en el mercado nacional, y que si bien al igual de lo que ocurre en otra especie de abasto, es factible que en esta se utilice el CCL, y que pueda repercutir en la salud pública.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la cinética de clorhidrato de clenbuterol en modelo conejo, así como las lesiones histológicas en los organismos expuestos, que al valorarlos pueda referir y ser un dato importante a los efectos producidos, y estos sean similares a lo que pueda ocurrir en los organismos que son expuestos con mayor frecuencia a esta sustancia, incluso en el hombre.

### **7.1 Materiales y métodos**

Se utilizó un modelo biológico usando como material de experimentación 15 conejos Nueva Zelanda, de 8 semanas de edad (peso aproximado de 1.400 Kg). Se identificaron, se pesaron y se alojaron individualmente en jaulas comerciales de 40 x 90 x 40 cm, fueron distribuidos al azar en 3 grupos de tratamiento (T1, T2 y T3), de 5 animales cada uno.

A los grupos del tratamiento 1 y 2 se le administro CCL en el agua de bebida a una dosis de 0.8 y 16  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso respectivamente, y al T3 (grupo control) 1 gr de azúcar; en los tres grupos el tratamiento fue a diario, por un periodo de 28 días. Al día 1 (inicio), 7, 14, 21 y 28 se tomaron 3 mL de sangre de la vena marginal auricular para colectar el suero de cada muestra, conservándose en congelación a  $-8^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. El día 28 después de la toma de las muestras sanguíneas, se pesaron y sacrificaron humanitariamente a todos los animales (SAGARPA, 1996). Posteriormente se realizó la necropsia (Aluja y Constantino, 2002); se tomaron muestras (hígado, riñón y corazón) conservándose en formol al 10% y se enviaron al laboratorio para su fijación en parafina para evaluación histológica.

La detección de los niveles de CCL en suero sanguíneo se realizó por ELISA utilizando el kit RidascreenClenbuterolFast<sup>®</sup>. Para el reporte de resultados se utilizó estadística descriptiva (cuadros y figuras), considerando las lesiones observadas en los tejidos; y las concentraciones séricas de CCL.

### **7.2 Resultados y discusión**

En las observaciones macroscópicas realizadas en los conejos de los grupos de tratamiento T1 y T2, las características de la canal y tejidos como son el: hígado, corazón, riñón no mostraron cambios o lesiones evidentes, salvo que en la canal de los conejos del T3 se observó una mayor deposición de grasa. En cuanto al peso de los diferentes tejidos, se obtuvo un mayor peso promedio del riñón en los conejos del T3 comparativamente con el T1 y T2 a los que se les adicionó CCL. El valor promedio del riñón de los conejos del T3 fue de 18.48 y el valor más bajo correspondió al T1 con 15.72 gr. También en cuanto al peso del hígado, en el T3 se obtuvo el mayor peso promedio por grupo con 96.35 gr contrastando con el obtenido del T1 con un peso de 82.31 gr.

En relación al peso del corazón el valor promedio por grupo obtenido fue distinto, en el T2 hubo un mayor peso con 7.92 y el grupo control de 7.07 gr.

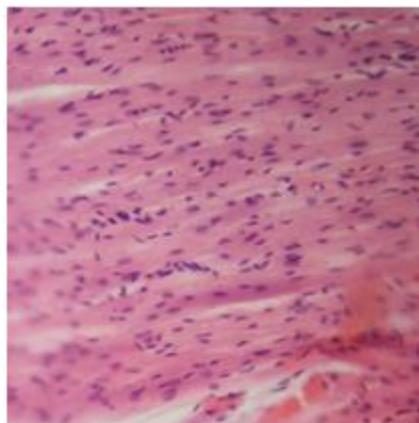
Al considerar el incremento tanto de peso y volumen del corazón de los conejos del T2, la hipertrofia mostrada pudo estar asociada con el efecto de la sustancia; por lo que, tanto el grosor y el peso del corazón se debe a la hipertrofia de células musculares; condición similar descrita por Burniston et al., (2007), en donde refieren que existe una hipertrofia debida al mayor acúmulo y transporte de sustratos al tejido, proceso que incrementa a su vez el peso y volumen de ciertos tejidos.

En relación al efecto del CCL y las alteraciones observadas histológicamente en tejidos parenquimatosos como el hígado y el riñón, la vía de administración refleja un aspecto importante, en donde el CCL al ser absorbido eficazmente en el tracto gastrointestinal pasa a la circulación y a su vez puede depositarse en los tejidos mencionados, ocasionando cambios estructurales y funcionales debido a las propiedades de la sustancia (contenido en su estructura de cloro)(Valladares-Carranza et al., 2013).

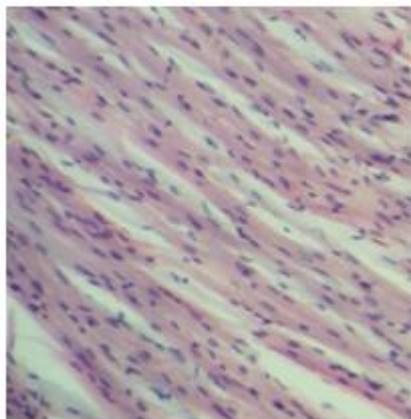
El CCL tiene un efecto importante sobre el músculo estriado, y también se expresa que no es necesaria una dosis muy alta para obtener un efecto marcado (hipertrofia muscular), ya que por el resultado obtenido por grupo al evaluar el peso de la canal de los conejos expuestos, en el T1 se obtuvo el mayor peso con  $1924.46 \pm 119.02$  gr; mientras que el peso obtenido de la canal para el T2, fue de  $1848.80 \pm 169.90$  gr, no observando un efecto adicional mayor al T1.

En las evaluaciones histológicas en los diferentes tejidos considerados, las observaciones más notorias realizadas fueron, en: corazón: hemorragias múltiples, pleomorfismo e hileración nuclear de miocitos en el T2 (Figuras 1, 2 y 3); contrastando parte de nuestros resultados con el estudio realizado in vivo en roedores por Burniston et al., (2007), al adicionar una dosis de 5.0 mg de CCL/Kg, quienes reportaron zonas de necrosis en músculo cardiaco a las 12 horas después de haber sido expuesto el tejido.

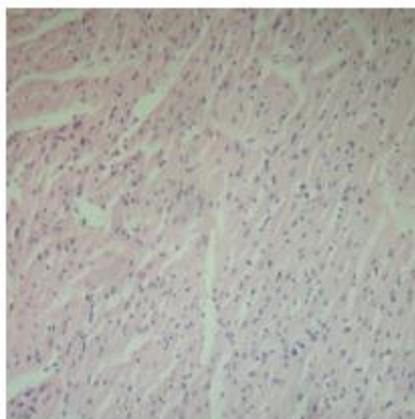
**Figura7** Músculo cardiaco T1



Hemorragias y pleomorfismo nuclear. (Tinción H&E.10X)

**Figura7.1** Músculo cardiaco T2

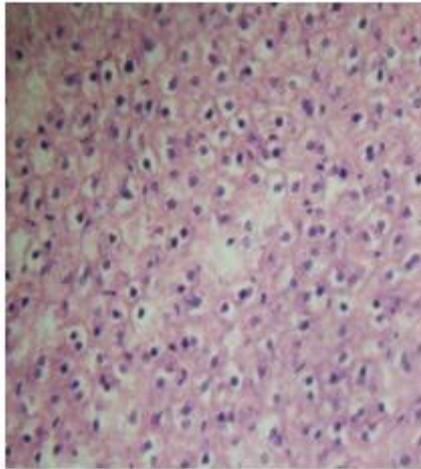
Hileración nuclear. (Tinción H&E.10X)

**Figura7.2** Músculo cardiaco GC

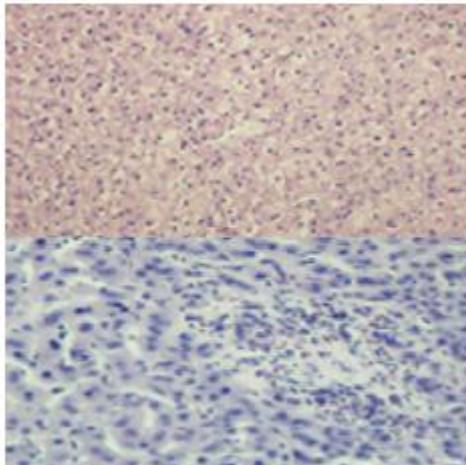
Músculo cardiaco normal. (Tinción H&E. 10X)

Las lesiones degenerativas ocasionadas por el CCL en el hígado de los conejos expuestos (T1 y T2), provocó lesiones en el 25 - 50 % del tejido, lo cual puede atribuirse y asociarse con el tipo de sustancia, cantidad y efecto residual, observando: áreas de congestión de leve a moderada, degeneración hidrópica de hepatocitos, picnosis y cariorexis, áreas de necrosis focal; en 2 de los 5 conejos del T2 se observó lesión franca inflamatoria con necrosis rodeada de fibroblastos, neutrófilos, y macrófagos (Figuras 4, 5 y 6).

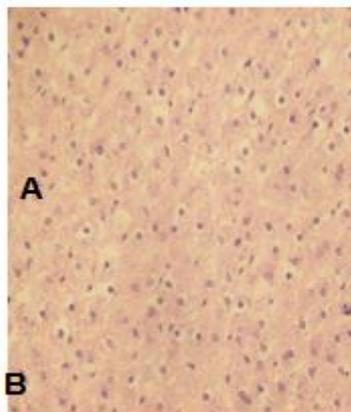
De acuerdo con la funcionalidad hepática y el efecto de cualquier sustancia extraña que ingresa al organismo, esta puede provocar desde una lesión leve a una tan extensa condicionada por la cantidad y el tiempo, así como por la afinidad y mecanismo de acción de la sustancia (Benchekrounet al., 2004; Valladares-Carranza et al., 2013).

**Figura7.3 HígadoT1**

Degeneración hidrópica difusa de hepatocitos, picnosis y mitosis.  
(Tinción H&E. 20X)

**Figura7.4 HígadoT2**

Degeneración hidrópica difusa de hepatocitos, picnosis y mitosis. B. Reacción inflamatoria con infiltración de neutrófilos, presencia de fibroblastos, picnosis y abundante mitosis. (Tinción H&E. 10X y 20X)

**Figura7.5 HígadoGC**

Tejido hepático normal. (Tinción H&E. 10X)

En relación con la fisiología urinaria, cinética o deposición del CCL, no se tienen reportes al momento sobre el posible efecto y daño histopatológico que pueda ocurrir a este tejido. Al estudio microscópico en riñón, se observaron cambios significativos en los T1 y T2 en comparación con los del T3, mostrando: congestión de moderada a marcada, y una glomerulitis linfocitaria. Y en el músculo estriado de ambos grupos, de manera general se observó: distribución focal a múltiple de hemorragias, la hileración y pleomorfismo nuclear.

En los conejos del T1 (0.8 µg/Kg de CCL), al día 1 (inicio), no se detectaron niveles considerados como positivos de CCL a través de la prueba de ELISA. Al día 7 se obtuvo un nivel de  $3068 \pm 401$  ppt (partes por trillón), condición que fue incrementándose paulatinamente en los siguientes muestreos con  $4013 \pm 263$  y  $8100 \pm 100$  ppt para los días 14, 21, 28 respectivamente.

De manera similar en el T2 (16 µg/Kg de CCL), las detecciones ocurrieron hasta el séptimo día con un valor de  $5885 \pm 424$  ppt, y de una manera homogénea para el día 14 y 21 con un valor de 8099 y para el día 28 de  $8100 \pm 100$  ppt; y para el T3 en los mismos periodos los valores obtenidos de 99ppt se consideran como negativos (Tabla 1).

**Tabla7** Concentraciones de CCL (ppt), en suero sanguíneo de conejos en los diferentes tratamientos con base en los diferentes días de evaluación

Tratamiento	1	7	14	21	28
T1 (0.8 µg/Kg p.v de CCL)	99	$3068 \pm 401$	$4013 \pm 263$	$8099 \pm 0$	$8100 \pm 100$
T2 (16 µg/Kg p.v de CCL)	99	$5885 \pm 424$	$8099 \pm 0$	$8099 \pm 0$	$8100 \pm 100$
GC (1 gr de azúcar)	99	99	99	99	99

De acuerdo con el periodo de detección de CCL, Sumano *et al.*, (2002), al evaluar la vida media del CCL en conejos, refieren que es factible encontrar cantidades importantes a las 9 horas; a diferencia de lo encontrado en nuestro estudio, en el cual una vez iniciados los diferentes tratamientos adicionando CCL, se encontraron niveles desde el día 7 con un valor de  $3068 \pm 401$ , al día 14 con  $4713 \pm 263$ , día 21 con 8099 y el valor más alto a los 28 días con  $8100 \pm 100$ .

Considerando la cinética y bioacumulación del CCL en las especies animales a las que se les suministra esta sustancia, y al asociar el consumo de productos cárnicos contaminados, existe el riesgo de que en el consumidor puedan ocurrir procesos similares como lo observado en el modelo biológico, y con el consumo continuo de carne contaminada se pueda agravar su salud, más aún si estas padecen problemas de tipo cardiaco (Daubert *et al.*, 2007). En Mexico de manera ilegal y clandestina la distribución, comercialización y uso de CCL se efectúa, sin embargo, el trabajo de las organizaciones ganaderas para el registro de unidades de producción libres de esta sustancia garantizara el consumo de los productos cárnicos.

Asimismo, el proponer el uso de otras sustancias de las cuales hasta el momento no se tiene indicios de toxicidad, propiciarán una productividad sustentable, segura e inocua en las diferentes unidades de producción pecuaria (Ramos *et al.*, 2009).

### 7.3 Referencias

Aluja AS., Constantino F. (2002). Técnicas de necropsia en animales domésticos. 2ª ed. Manual Moderno. pp. 22-35.

Benchekroun LE., Couton D., Postic C., Borde I., Gaston J., Guillet JG., Andre C. (2004). Overexpression of beta adrenergic receptors in muse liver alters the expression of glconeogenic and glycolytic enzymes. Departments of Immunology, Genetics Development and Molecular Pathology and Endocrinology; Institute National de la Santeet de la RechercheMedicale, Paris France. E715-E722.

Burniston JG., Clark WA., Lip-Bun T., Goldspink DF. (2007). Dose-dependent separation of the hypertrophic and myotoxic effects of the beta adrenergic receptor agonist clenbuterol in rat striated muscles.Europe PMC Funders Group. 18:1-16.

Castellanos RAF., Rosado RJG., Chel GLA., Betancur AD. (2006). Empleo de zilpaterol en novillos con alimentación intensiva en Yucatán, México. *Arch. Latinoam. deProduct. Anim.* 2: 21-16.

DaubertGP.,Mabasa VH., Leung VW., Aaron C. (2007). Acute clenbuterol overdose resulting in supraventricular tachycardia and atrial fibrillation. *J. of Med. Toxicol.*, 3: 56-60.

Elliot CT., McCaughey WJ., Crooks SR., McEvoy JD., Kennedy DG. (1995). Residues of clenbuterol in cattle receiving therapeutic doses: implication of differentiating between legal and illegal use. *Vet. Q.*, 17:100-102.

GeesinkGH.,Smoulders JFM., Van Lack JM. (1993). Effects on Meat Quality of the Use of Clenbuterol in Veal Calves.*Livestock Production Science.* 15:271-279.

Kuiper HA., Noordam MY., Dooren MMH., Flipsen R., Van Schilt C., Roos AH. (1998). Illegal Use of Beta Adrenergic Agonists.*J.Anim. Sci.*, 76: 65- 72.

Ley Federal de Sanidad Animal (LFSA).(2007). Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. Diario Oficial de la Federación 27 de Julio del 2007.

Ramos F., Baeta ML., Reis J., Silveira MIN. (2009). Evaluation of the ilegal use of clenbuterol in portuguese cattle farms from drinking wáter, urine, hair and feedsamples. *Food Additives and Contaminants*, 26 (6): 814-820.

SAGARPA. (2000). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana. NOM-061-ZOO-1999. Especificaciones zoonosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal. Diario Oficial de la Federación.

SAGARPA. (1996). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Diario Oficial de la Federación.

SumanoLH.,Ocampo CL., Gutiérrez L. (2002). Clenbuterol and other beta agonists, are they an option for meat production or threat for public health. 12:137-159.

Valladares-Carranza B., Velazquez-Ordoñez V., Zamora-Espinosa JL., Aviles-Martinez JA., Zaragoza-Bastida A., Posadas-Sanchez MA.(2013). Implications of the Use of Clenbuterol Hydrochloride in Beef Cattle. In Salem, A.F.Z.M., Ed., Nutritional Strategies of Animal Feed Additives, Nova Science Publishers, Inc., New York. pp. 185-196.

Valladares-Carranza B., Bañuelos-Valenzuela R., Peña-Betancourt SD., Velázquez-Ordoñez V., Velázquez-Armenta Y., Nava-Ocampo A. (2014). Illegal use of clenbuterol in cattleproduction in México. Health, 6:673-676. <http://dx.doi.org/10.4236/health.2014.68087>.