

**Efecto del clorhidrato de clenbuterol sobre el funcionamiento hepático en modelo conejo**

VALLADARES-CARRANZA, Benjamin\*†, BAÑUELOS-VALENZUELA, Rómulo', PEÑA-BETANCOURT, Silvia'', VELAZQUEZ-ORDOÑEZ, Valente, ECHAVARRIA-CHAIREZ, Francisco' y MURO-REYES, Alberto'

*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México. C.P. 50200 Toluca, México.*

*Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, México.*

*Departamento de Producción Agrícola y Animal, Laboratorio de Toxicología. Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, México, Distrito Federal*

Recibido Enero 21, 2015; Aceptado Junio 30, 2015

**Resumen**

El clorhidrato de clenbuterol (CCL), es un anabólico utilizado de manera ilegal en la alimentación animal, y a su vez esta situación se asocia a problemas en salud pública. Como órgano de biotransformación, el hígado tiene múltiples funciones, se ha referido que en este tejido el CCL permanece por un mayor periodo de tiempo y en mayor cantidad, provocando citotoxicidad hepática.

**Clorhidrato de clenbuterol, Enzimología clínica, hepatotoxicidad.**

**Abstract**

Clenbuterol hydrochloride (CCL) is an anabolic illegally used in animal feed, and in turn this situation is associated with problems in public health. As biotransformation organ, the liver has many functions, referred to in this tissue the CCL remains for a longer period of time and in greater quantity, causing hepatic cytotoxicity. The objective was to evaluate the effect of CCL, through the liver function by enzymology clinic in rabbit model.

**Clenbuterol hydrochloride, clinical enzymology, hepatotoxicity.**

**Citación:** VALLADARES-CARRANZA, Benjamin, BAÑUELOS-VALENZUELA, Rómulo, PEÑA-BETANCOURT, Silvia, VELAZQUEZ-ORDOÑEZ, Valente, ECHAVARRIA-CHAIREZ, Francisco y MURO-REYES, Alberto. Efecto del clorhidrato de clenbuterol sobre el funcionamiento hepático en modelo conejo. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales* 2015, 1-1: 16-23

\* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: benvac2004@yahoo.com.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

**Introducción**

El clorhidrato de clenbuterol (4-amino-3,5-dicloroalfa 1,1-dimetiletil amino benceno metanol) es una sustancia  $\beta$ -agonista del grupo de los  $\beta$ -adrenérgicos. Su uso como agente anabólico en la engorda de ganado genera un incremento importante en las masas musculares, pero desde antes del año 2000 se prohibió su uso como aditivo en la alimentación y producción animal debido a su efecto residual y contaminación de los productos alimenticios (carne e hígado), que ha producido procesos de intoxicación en los consumidores, el efecto tóxico en los humanos provoca: cefalea, nerviosismo y taquicardia entre otros signos clínicos (Ramos et al., 2009; Valladares et al., 2015).

Su efecto anabólico y lipolítico del CCL se genera con al suministrarlo en la dieta, ya que es absorbido fácilmente vía digestiva, alcanzando una concentración importante media hora a seis horas pos ingestión; como órgano de biotransformación, el hígado tiene múltiples funciones; se ha referido que en este tejido el CCL permanece por un mayor periodo de tiempo y en mayor cantidad, cuando es suministrado en la alimentación animal; y provoca citotoxicidad hepática (Daubert et al., 2007).

El hígado como órgano en donde se desarrollan las reacciones metabólicas, puede ser un indicador de las alteraciones de funcionalidad orgánica. El incremento de su peso relativo se produce como respuesta a un incremento de su funcionalidad o por efecto de reguladores endocrinos (hormonas tiroideas o glucocorticoides), lo cual suele ser simultáneo o consecuente con hipertrofia e hiperplasia de origen tóxico (Repetto, 2002; Ramesh, 2007).

En la afección tóxica aguda del hígado pueden distinguirse las formas citotóxica y colagástica; esta última, consiste en la detección de la bilis en los canalículos intra o extrahepáticos. La forma citotóxica tiene tres formas de presentación, que pueden ser secuenciales o no: esteatosis, degeneración y necrosis. La esteatosis consiste en la acumulación citoplasmática de gotitas grasas; pueden originarse por numerosas sustancias capaces de alterar los mecanismos de degradación de los triglicéridos o de la síntesis de las lipoproteínas encargadas de sacar las grasas del hepatocito, originando lo que se conoce como hígado graso (Repetto, 2002; Doxey, 1987).

La degeneración estriba en una inflamación o balonización del hepatocito con hialinización (transparencia), de su contenido y aparición de cuerpos acidófilos. La necrosis supone la muerte celular y se puede producir por mecanismos de lipoperoxidación, alquilación, arilación o uniones covalentes de las macromoléculas biológicas (membrana plasmática y retículo endoplásmico), por el tóxico a sus metabolitos, o bien por reacciones inmunitarias. Cuando estas lesiones suceden en forma crónica, el tejido colágeno se transforma en fibrótico no funcional, que distorsiona la arquitectura hepática con posible obliteración de vasos y producción de edema y varices, conocido el proceso como cirrosis (Repetto, 2002).

El hígado responde a estímulos tóxicos con proliferación del REL (retículo endoplásmico liso), para incrementar la actividad de las enzimas metabolizantes de xenobióticos.

Esta proliferación puede progresar hasta alcanzar un grado patológico (manifestación de hepatotoxicidad), y entonces se produce una regresión en el nivel funcional adquirido, coincidiendo con la afectación de las mitocondrias (Repetto, 2002).

La mayoría de las enzimas son intracelulares, se localizan en mitocondrias, citoplasma o ambos, a partir de estas estructuras la liberación de enzimas, con consecuente incremento en concentraciones séricas aumentarán cuando las células son dañadas o destruidas (Doxey, 1987; Repetto, 2002; Meyer y Harvey, 2004).

La reacción L-aspartato↔oxalacetato ocurre en muchos tejidos, la mayor concentración de AST (aspartato amino transferasa) existe en músculo cardiaco y en proporciones o niveles iguales en el hígado, mucosa intestinal, músculo esquelético, riñón y páncreas. En consecuencia, el daño en células de una amplia variedad de órganos provoca un aumento en la concentración de AST circulante. Sin embargo puede ser una prueba diagnóstica de daño hepático (Manning et al., 1994). La enzima AST tiene una vida media de 5-12 horas en perros, de 1-2 horas en gatos y de 50 horas en equinos (Thrall et al., 2006; Meyer y Harvey, 2004).

La reacción L-alanina↔piruvato con participación de la ALT (alanin amino transferasa), ocurre principalmente en el hígado y en menor medida en cerebro, músculo y riñón. En los conejos las concentraciones de ALT en musculo cardiaco también son altas (Manning et al., 1994). En el hígado de rumiantes y caballos su valor es bajo (Meyer y Harvey, 2004), por lo que la prueba solo es válida en animales como primates, perros, gatos, conejos y ratas quienes presentan concentraciones más altas (Kaneko et al., 1997).

Cuando existe alteración hepatocelular la actividad de la enzima ALT se ve incrementada a las 12 horas aproximadamente, teniendo picos a los 1 y 2 días de daño agudo. En perros y gatos esta reportada una vida media de 60 horas (Thrall et al., 2006; Meyer y Harvey, 2004; Kaneko et al., 1997).

A pesar de que el uso de CCL en la producción animal (especies para abasto, principalmente bovinos) está prohibido, su uso clandestino e irracional se sigue dando en las diferentes unidades de producción propiciando problemas de salud pública, en México no existe un estudio sobre el daño que pudiera ocasionar el CCL a nivel hepático, considerando que es un órgano de importancia en la cinética (metabolismo y eliminación) de esta sustancia. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto del CCL, a través del funcionamiento hepático por enzimología clínica en un modelo conejo, y dar un panorama de lo que puede estar ocasionando el CCL en salud pública.

### **Materiales y Métodos.**

Se realizó un modelo biológico con 10 conejos Nueva Zelanda, de 8 semanas de edad. Se identificaron, pesaron y alojaron individualmente en jaulas comerciales, distribuyéndose al azar en 2 tratamientos (T1 y T2, de 5 animales cada uno). Al T1 se le administro 0.8 µg/Kg de CCL en el agua de bebida, y al T2 (control) 0.5 gr de azúcar; el suministro de los 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°C hasta su procesamiento.

En las determinaciones de Alanino amino transferasa (ALT) y Aspartato amino transferasa (AST), se utilizaron 50 µL de suero y 560 µL de ALT<sup>®</sup> o AST<sup>®</sup>, a través del método modificado sin piridoxal fosfato, midiendo la absorbancia a 340 nm (IFCC, 2002).

La concentración de CCL en suero se realizó a través de ELISA utilizando el kit Ridascreen Clenbuterol Fast<sup>®</sup>.

Los datos obtenidos se evaluaron a través de análisis de medidas repetidas y ANDEVA ( $P < 0.0001$ ), con el paquete estadístico SAS, versión 6.0.

### **Resultados y Discusión.**

El uso del CCL en la producción animal ha demostrado efectos tóxicos en los organismos que consumen dicha sustancia, se distribuye en casi todos tejidos, con un periodo de vida largo en el organismo (Ramos et al., 2009). El CCL al ser absorbido eficazmente en el tracto gastrointestinal pasa a la circulación y a su vez puede depositarse en hígado, ocasionando cambios estructurales y funcionales debido a las propiedades de la sustancia (Valladares et al., 2014).

En los conejos del T1, al día 1 no se detectaron niveles positivos de CCL; al día 7 se obtuvo un nivel de  $3068 \pm 401$  ppt, condición que se incrementó paulatinamente con  $4013 \pm 263$  y  $8100 \pm 100$  ppt para los días 14, 21, 28 respectivamente; y para el T2 en los mismos periodos los valores obtenidos fueron de cero residuos ( $P < 0.0001$ ).

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 este estudio, en el que una vez iniciado la adición de CCL, se encontraron niveles desde el día 7 y hasta el final del estudio.

Para los agonistas  $\beta$  adrenergicos las sustituciones en el anillo aromático son importantes para obtener una actividad biológica definida. Cuando los OH son sustituidos por un halógeno como en el caso del clorhidrato de clenbuterol (cloro), se evita la biotransformación por las enzimas COMT (catecol-O-metil-transferasas) a nivel tisular y se hace lenta la biotransformación hepática. Al mismo tiempo, la presencia de cloro en el CCL lo hace más liposoluble que sus análogos, y, por ende, tiende a difundir más en los tejidos y en la grasa animal.

El CCL se metaboliza por medio de reacciones de N-oxidación en hidroxyclenbuterol y conjugados glucorónicos, principalmente. Sin embargo se han detectado concentraciones séricas importantes, ácido 4-amino-3,5-diclorobenzoico y ácido 4-amino-3,5-diclorohipúrico, sustancias tóxicas que pueden ser afectar a diversos tejidos como el hígado, en donde se produce un almacenamiento importante de esta sustancia (Baillie et al., 1980; Hawkins et al., 1993).

En las enfermedades hepáticas es importante la determinación de diferentes metabolitos (bilirrubina libre y conjugada) en circulación. Se sabe que los pigmentos biliares son productos de excreción formados a partir de la hemoglobina liberada por el desdoblamiento de los eritrocitos en el sistema reticuloendotelial (Meyer y Harvey, 2004; Doxey, 1987). Cuando existe daño hepatocelular, el mejor diagnóstico se realiza en la fase aguda. Las determinaciones más frecuentes en la sospecha de daño hepático agudo o crónico son AST, ALT y GGT (Cebra et al., 1997).

En enzimología clínica los valores obtenidos hubo un incremento gradual en los conejos del T1, sobrepasando los valores normales desde el 7° día pos exposición con valores promedio al final del estudio de  $81,27 \pm 2,8$  y  $94,84 \pm 1,9$  U/L para AST y ALT respectivamente (Cuadro 1).

Se considera que los agentes inductores de los procesos enzimáticos originan la proliferación del REL, con el incremento de las enzimas metabolizadoras y citocromo P-450, junto con el incremento de los fosfolípidos microsómicos. De forma contraria, otros hepatotóxicos producen dilatación y fragmentación de las membranas rugosas y lisas, junto con un descenso en la síntesis de enzimas y fosfolípidos, y liberación de fosfatasa (Konnie, 2004; Ramesh, 2007).

Por tanto, cuando un tóxico comienza a llegar en pequeñas dosis al hígado, este puede llegar a incrementar su capacidad metabolizante por respuesta del REL y estimulación de los sistemas enzimáticos apropiados, y se inicia un aumento de peso relativo del órgano (hepatomegalia). Cuando la capacidad destoxicante del hígado queda superada, comienza a fallar la glucosa-6-fosfatasa hepática (índice de lesión microsómica), produciendo cambios histopatológicos importantes. Un incremento, aunque sea reversible de los niveles séricos de transaminasas indica afectación hepática y muscular con rotura celular (Repetto, 2002; Meyer y Harvey, 2004).

	Hora		Días				Promedio
	0	3	7	14	21	28	
T1	47,44	48,72	90,45	107,7	103,5	89,7 <sup>a</sup>	81,27 <sup>a</sup> ±
AST	<sup>a</sup> ± 1,3	<sup>a</sup> ±	<sup>a</sup> ±	<sup>a</sup> ±	<sup>a</sup> ± 4,4	± 9,4	2,8
		2,4	18,	6,7			
T2	47,81	49,72	49,66	69,63	68,87	69,17	59,14 <sup>b</sup> ±
AST	<sup>a</sup> ± 1,0	<sup>a</sup> ±	<sup>b</sup> ±	<sup>b</sup> ±	<sup>b</sup> ± 2,1	<sup>b</sup> ± 1,3	0,4
		0,2	0,2	0,4			
T1	76,80	77,02	99,36	104,	105,86	105,86	94,84 <sup>a</sup> ±
ALT	<sup>a</sup> ± 2,1	<sup>a</sup> ± 0	<sup>a</sup> ± 0	91 <sup>a</sup>	<sup>a</sup> ± 0,8	<sup>a</sup> ± 0,5	1,9
				± 1,1			
T2	77,07	78,15	78,44	77,57	77,26	78,53	77,84 <sup>b</sup> ±
ALT	<sup>a</sup> ± 0	<sup>a</sup> ±	<sup>b</sup> ±	<sup>b</sup> ±	<sup>b</sup> ± 2,2	<sup>b</sup> ± 0	0,4
		1,1	0,3	2,2			

Literales diferentes por columna, muestran diferencia estadística (ANDEVA,  $P < 0,0001$ ). Valores normales (Kaneco, 2008), para Alanino amino transferasa (ALT) y Aspartato amino transferasa (AST): 47 y 79 U/L respectivamente

**Tabla 1** Concentraciones de AST y ALT (U/L) en diferentes periodos con y sin la administración de CCL en conejos.

La ALT es una enzima ubicada en el citosol de varias células, y resulta un indicador de lesión hepática, que puede liberarse al ocurrir lesión o necrosis subletal; el aumento en su concentración en alteración hepática es proporcional al número de células con necrosis o lesión; asimismo, altos niveles de AST pueden indicar lesión hepatocelular o muscular (Shelly, 2011).

En casos de extenso daño hepatocelular agudo, se detectan niveles muy elevados de estas enzimas. Mientras que en casos crónicos, tienden a disminuir después de un periodo, por tal razón el mejor diagnóstico se realiza en la fase aguda del daño celular. En conejos tratados con  $17\alpha$ -metiltestosterona por 15 días a dosis de 10 mg/Kg/ día se incrementaron los niveles séricos de AST y ALT con picos máximos a los 7 días; también se observó un incremento de la enzima GGT a los días 7, 10 y 15 de tratamiento (Hild et al., 2010).

En datos previos publicados, las alteraciones observadas histológicamente a efecto del CCL en tejidos parenquimatosos como el hígado y el riñón; Valladares et al., (2014), observaron lesiones importantes en hígado de conejos expuestos a esta sustancia, denotando: 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 T1 se observó lesión franca inflamatoria con necrosis rodeada de fibroblastos, neutrófilos, y macrófagos.

Otros datos de importancia a considerar son el reporte de Gojmerac et al., (2002), al estudio realizado en cerdos tratados con 10  $\mu$ g de CCL/Kg de peso, dos veces al día por vía intravenosa por 25 días antes del sacrificio, en hígado, fueron observadas lesiones histopatológicas, como: ligera hiperplasia de ductos biliares, inflamación intersticial, degeneración hidrópica y vacuolar del hepatocito.

Spencer y Oliver (1996), al suministrar a ovejas 400  $\mu$ g/Kg de CCL por día, ocasionó una supresión en la respuesta inmune humoral, predisponiendo a los animales tratados con este  $\beta$ -agonista a infecciones y alterar la salud y bienestar animal; de la misma forma, Malinowski (2004) refieren que el CCL puede afectar la función inmune de los animales, al alterar la funcionalidad de varios órganos.

El CCL tiene un efecto negativo en la función reproductiva de hembras y machos. Biolatti y colaboradores (1994), reportan que cerdas tratadas con CCL a una dosis de 1 ppm/día/40 días, presentaron lesiones a lo largo del tracto reproductivo, las lesiones macroscópicas observadas fueron: ovarios microcísticos y atrofia uterina; y las lesiones histopatológicas incluyen degeneración atrésica de algunos folículos ováricos, completa ausencia de función del cuerpo lúteo, una reducción en el número de glándulas endometriales, y un decremento en el volumen del citoplasma de células epiteliales del endometrio y de glándulas. Estas lesiones pueden tener un impacto negativo en la eficiencia reproductiva de las hembras. Por otro lado, en cerdos machos tratados con CCL a una dosis de 1 ppm mezclado en el alimento por 3 meses, también se observó un impacto negativo en la función reproductiva, debido a una modificación de la estructura testicular (morfología) y cuantitativos de las células de Leydig (Blanco et al., 2002).

### Conclusiones.

El efecto hepatotóxico del clorhidrato de clenbuterol en el modelo conejo produjo incremento de AST y ALT. Utilizar el CCL en especies para abasto puede ser un riesgo para el consumidor como ocurrió en el modelo biológico con conejos.

## Referencias

Baillie, H. W., Cameron, B. D., Draffan, G. H., Schmid, J. (1980). Investigations of the placental transfer of <sup>14</sup>C-N-AB 365 CL in the cow. No. 111674 de la base de datos de la OMS. 35

Biolatti, B., Castagnaro, M., Bollo E., Appino, S., Re G. (1994). Genital lesions following long-term administration of clenbuterol in female pigs. *Vet Pathol.*, 31, 82-92.

Blanco, A., Flores-Acuña, F., Roldán-Villalobos, R., Monterde, J.G. (2002). Testicular damage from anabolic treatments with the beta (2)-adrenergic agonist clenbuterol in pigs: a light and electron microscope study. *Vet J.*, 163, 292-298.

Cebra, C.K., Gerry, F.B., Getzy, M.J., Fettman M.J. (1997). Hepatic lipidosis in anorectic, lactating Holstein cattle: retrospective study of serum biochemical abnormalities. *J. Vet. Int. Med.*, 4:231-237.

Daubert, G.P., Mabasa, V.H., Leung, V.W., Aaron. C. (2007). Acute clenbuterol overdose resulting in supraventricular tachycardia and atrial fibrillation. *J. of Med Toxicol.* 3: 56-60.

Doxey, D.L. (1987). Patología clínica y procedimientos de diagnóstico en veterinaria. Manual Moderno. México, D.F. pp. 49-68.

Gojmerac, T., Pleadin, J., Zoric, M., Mirko, L., Stipica, C. (2002). Effects of repeated growth-promoting doses of clenbuterol on the hepatic function of female pigs (abstract). *Vet Hum Toxicol.*, 44(5):269-71.

Hawkins, D.R., Elsom, L.F., Dighton, M.H., Kaur, A., Cameron, D. M. (1993). The pharmacokinetics, metabolism and residues of <sup>14</sup>C-clenbuterol (<sup>14</sup>C-N-AB 365 CL) following intramuscular administration to calves. No. HRC/BOI 140/921418 de la base de datos de la OMS.

[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_876\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_876_spa.pdf). (6 Abril 2015).

IFCC. (2002). Primary reference procedures for the measurements of catalytic activity concentration of enzymes. *Clin Chem Lab Med*.

Kaneco, J. (2008). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Blood Analyte Reference Values in Small and some Laboratory Animals*. 6a ed. Academic Press. USA.

Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (1997). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Kaneko, 5th Ed., Academic Press, San Diego, pp. 829-843.

Konnie, H. Plumlee. (2004) *Clinical Veterinary Toxicology*. Mosby. St. Luis Missouri pp. 8-12.

Malinowski, K., Kearns, C.F., Guirnalda, P.D., Roegner, V., McKeever, K.H. (2004). Effect of chronic clenbuterol administration and exercise training on immune function in horses. *J Anim Sci.*, 82:3500-3507.

Manning, J.P., Ringler, H.D., Newcomer, E.C. (1994). *The Biology of the laboratory rabbit*. 2a ed. Academic Press. San Diego California. USA. pp. 459-460.

Meyer, D.J., Harvey, J. (2004). *Veterinary Laboratory Medicine*. 3a ed, Saunders, U.S.A. pp. 169-189.

Ramesh, C.G (2007). *Veterinary toxicology*. Academic Press. San Diego California. pp. 25-41.

Ramos, F., Baeta, M.L., Reis, J., Silveira, M.I.N. (2009). Evaluation of the illegal use of clenbuterol in portuguese cattle farms from drinking water, urine, hair and feed samples. *Food Addit Contam.* 26 (6): 814-820.

Repetto, M. (2002). *Toxicología fundamental*. 3a ed., Díaz de Santos. pp.195-203.

Shelly, L. (2011). Pruebas de laboratorio y procedimientos de diagnóstico en pequeños animales. Intermedica, Argentina.

Spencer, G.S., Oliver, M.H. (1996). Suppression of immune response in lambs during treatment with the beta-adrenergic agonist clenbuterol. *J Anim Sci.*, 74:151-153.

Sumano, L.H., Ocampo, C.L., Gutiérrez, L. (2002). Clenbuterol y otros b-agonistas. ¿Una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública?. *Vet Mex.* 33:137-159.

Thrall, M.A., Baker, D.C., Campbell, T.W., DeNicola, D., Fettman, M.J. (2006). *Veterinary hematology and clinical chemistry.* Blackwell, USA.

Valladares, C.B., Bañuelos, V.R., Peña, B.S.D., Velázquez, O.V., Zamora, E.J.L. (2014). Biocinética y lesiones histológicas del clorhidrato de clenbuterol en modelo conejo. *In: M. Ramos, V. Aguilera. (ed). Ciencias Agropecuarias, Handbook - ©ECORFAN-Valle de Santiago, Guanajuato. pp. 61-69.* [http://www.ecorfan.org/handbooks\\_agro2.php](http://www.ecorfan.org/handbooks_agro2.php)

Valladares, C.B., Bañuelos, V.R., Peña, B.S.D., Velázquez, O.V., Echavarría, Ch.F.G., Muro, R.A., Zaragoza, B.A., Ortega, S.C., Zamora, E.J.L., Gutiérrez, C.A. (2015). Implications of the use of clenbuterol hydrochloride in livestock production. *Rev Electrón Vet.* 16 (2): 1-13.