

Influencia del clenbuterol-Clb en los procesos homeostáticos que inhibe la conservación de especies criollas en bovinos

Influência do clenbuterol-Clb nos processos homeostáticos que inibe a conservação de espécies crioulas em bovinos

DOI: 10.34188/bjaerv6n2-045

Recebimento dos originais: 05/01/2023

Aceitação para publicação: 31/03/2023

Ricardo E. Caicedo Rivas

Doctorado En fisiología y Endocrinología Comparada,
Universidad de Gifu-Japón, Facultad de Agricultura-Rengo Daigaku
Labora: Facultad de Ciencias Biológicas / Area de Morfofisiología Experimental / Profesor Investigador Titular
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla-BUAP,
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

Vladimir Tristán Ruiz Paredes

Estudiante Pasante en la Licenciatura de Biología.
Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Biológicas
Laboratorio de Endocrinología de la Reproducción y Malacología, No. 347
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla-BUAP
Dirección: Boulevard Valsequillo y Ave. San Claudio S/N,
Ciudad Universitaria, Edificio Bio-1, C.P 72570,
Puebla, México
E-mail: vladotran@gmail.com

Mariana Paz-Calderón Nieto

Maestría en Biología Productiva, en el Centro de Investigaciones de Biología Aplicada-Instituto Politécnico Nacional-IPN
Licenciatura en Biología por la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla-BUAP, Facultad de Ciencias Biológicas,
Labora: Complejo Regional Mixteca, (Izucar de Matamoros), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla-BUAP / Profesora De Biología
Dirección: Carretera Federal a Izucar de Matamoros S/N, Puebla
Investigadora en Biología molecular en el Laboratorio de Endocrinología de la Reproducción y Malacología, No. 347, Facultad de Ciencias Biológicas, Ciudad Universitaria, Edificio Bio-1
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla-BUAP
Puebla-México
E-mail: morella.paz.mp@gmail.com

RESUMEN

El clenbuterol-Clb calificado como un potente bronco-vaso-dilatador, repartidor de grasa, agente tocolítico (retardador del parto), utilizado para controlar enfermedades respiratorias, tanto en animales como en humanos; el Clb es un β 2-agonista-adrenérgico (β 2-AA), el cual, causa incremento de la masa muscular en aves, bovinos, cabras y ovejas, sin embargo, las rutas metabólicas y el modo de acción hasta el presente no están bien dilucidadas; el objetivo de este estudio consistió en determinar los metabolitos que surgen con la ingesta del clenbuterol y sus posibles derivados que se almacenan en la estructura hepática, páncreas, glándula suprarrenal, músculos y órganos genitales en bovinos. Además, se sabe que el contenido de grasa es reducido dramáticamente cuando el clenbuterol es utilizado como anabólico, entendiéndose como anabólico, cuando el Clb se administra de forma oral o intramuscular por arriba de la dosis terapéutica, entre 5 y 10 veces su concentración terapéutica ($0.8\mu\text{g}/\text{peso corporal}$ dos veces al día). Para este estudio de midieron 17 metabolitos diferentes con el propósito de determinar cuáles son los parámetros metabólicos que son perturbados por este aditivo, y que impiden los procesos de equilibrio intra y extracelular llamado homeostasis, esto a nivel de los diferentes órganos en el que interviene. Se estudiaron 2567 bovinos: el 95% machos y el 5% hembras (*Bos taurus* X *Bos indicus*), los resultados revelaron que son varios los metabolitos que son alterados por el clenbuterol entre estos tenemos a: a la glucosa, triglicéridos, colesterol, bilirrubina y el Calcio y enzimas a nivel hepático como: fosfatasa alcalina, gamma glutamil transferasa, transaminasas (ALT/GPT y AST/GOT), deshidrogenas láctica; fosfatasa acida: FA-total, FA-prostático y FA-no prostática, los datos muestran que el Clb tiene un efecto en alterar el metabolismo de varias rutas metabólicas; contribuyendo a que posee actividad lipolítica, y anti-lipogénicas e induce a la retención de nitrógeno, aumenta la glicolisis, la producción de lactato y el consumo de oxígeno, incrementa los niveles de glucosa, que varía de acuerdo al tiempo de tratamiento o que es suministrado, ya que a nivel del páncreas disminuye la insulina y los adipocitos son menos sensibles a este aditivo, se detectó el incremento en la utilización de energía y esto produce el aumento de la temperatura corporal llamada termogénesis y que repercute en el desarrollo de patologías en la calidad espermática de los bovinos e infertilidad en hembras bovinas a nivel hormonal, también aumenta los intervalos entre partos-anestros; estas anomalías desarrolladas son activadas por el uso de este aditivo alimenticio Clb. Estos datos determinan que este aditivo tiende a disminuir la sustentabilidad de esta especie.

Palabras clave: Aditivo alimenticio, Biodisponibilidad, Biotransformación, perfil metabólico, rutas metabólicas

RESUMO

Clenbuterol-Clb qualificado como poderoso bronco-vasodilatador, distribuidor de gordura, agente tocolítico (retardador do parto), utilizado no controle de doenças respiratórias, tanto em animais quanto em humanos; Clb é um agonista β 2-adrenérgico (β 2-AA), que causa aumento da massa muscular em aves, bovinos, caprinos e ovinos, porém as vias metabólicas e o modo de ação ainda não estão corretos. O objetivo deste estudo foi determinar os metabólitos que surgem com a ingestão de clenbuterol e seus possíveis derivados que são armazenados no fígado, pâncreas, glândula adrenal, músculos e órgãos genitais em bovinos. Além disso, sabe-se que o teor de gordura é drasticamente reduzido quando o clenbuterol é usado como anabolizante, ou seja, anabólico quando Clb é administrado por via oral ou intramuscular acima da dose terapêutica, entre 5 e 10 vezes sua concentração terapêutica ($0,8\mu\text{g}/\text{peso corporal}$ duas vezes um dia). Para este estudo foram medidos 17 metabolitos diferentes com o objetivo de determinar quais são os parâmetros metabólicos que são perturbados por este aditivo, e que impedem processos de equilíbrio intracelular e extracelular denominados homeostase, isto ao nível dos diferentes órgãos em que intervém. Foram estudados 2567 bovinos: 95% machos e 5% fêmeas (*Bos taurus* X *Bos indicus*), os resultados revelaram que existem vários metabólitos que são alterados pelo clenbuterol, dentre estes temos: glicose,

triglicéridos, colesterol, bilirrubina e cálcio e fígado enzimas como: fosfatase alcalina, gama glutamil transferase, transaminases (ALT/GPT e AST/GOT), desidrogenases lácticas; fosfatase ácida: FA-total, FA-prostático e FA-não prostático, os dados mostram que Clb tem um efeito na alteração do metabolismo de várias vias metabólicas; contribuindo para o fato de ter atividade lipolítica e antilipogênica e induzir a retenção de nitrogênio, aumentar a glicólise, a produção de lactato e o consumo de oxigênio, aumentar os níveis de glicose, que variam de acordo com o tempo de tratamento ou que é fornecido, pois a insulina diminui no pâncreas nível e os adipócitos são menos sensíveis a este aditivo, foi detectado um aumento no uso de energia e isso produz um aumento na temperatura corporal chamada termogênese e tem impacto no desenvolvimento de patologias na qualidade espermática de bovinos e infertilidade em fêmeas bovinas no nível hormonal nível, também aumenta os intervalos entre anestro-parto; essas anomalias desenvolvidas são ativadas pelo uso deste aditivo alimentar Clb. Esses dados determinam que esse aditivo tende a diminuir a sustentabilidade dessa espécie.

Palavras-chave: Aditivo alimentar, Biodisponibilidades, Biotransformação, perfil metabólico, vias metabólicas

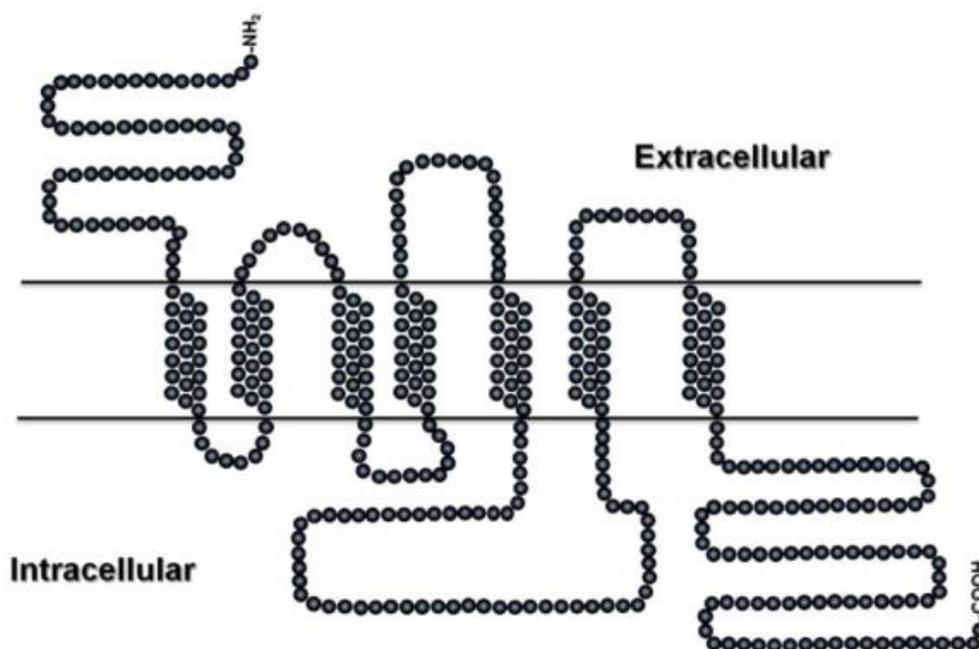
1 INTRODUCCIÓN

La utilización de β_2 -agonistas principalmente el clenbuterol (Clb), zilpaterol y la ractopamina, están produciendo un incremento en las intoxicaciones en humanos y animales, principalmente por el uso desmedido de estos componentes que son utilizados como aditivos alimenticios (Sumano *et al.*, 2002, Caicedo *et al.*, 2009, 2011, Valladares *et al.*, 2013 y Caicedo *et al.*, 2021). 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; considerar que el uso excesivo de este fármaco como el clenbuterol (Clb) han tenido y sigue teniendo un impacto tóxico muy significativo a nivel humano y animal (alterando el bienestar animal y humano, respectivamente). Su utilización aumenta la producción de carne a corto plazo, en tres meses se puede aumentar el peso vivo del animal en un 50-80%, esto dependerá de la concentración de Clb que se le suministre al animal, al igual que el tiempo de administración (Caicedo *et al.*, 2021), ya que el Clb tiende a retener compuestos nitrogenados, incrementado la masa muscular (Smith, 1998). Los agonistas de β_2 AA aumentan el metabolismo degradativo de los lípidos en los adipocitos *in vitro* e *in vivo*. En los tejidos de los mamíferos, existen hasta el momento tres subtipos distintos de receptores- β AR de los β_2 AA, como: β_1 (β_1 AR), β_2 (β_2 AR) y β_3 (β_3 AR). Los tejidos individuales (ejemplo: hígado, corazón) tienen diferentes proporciones de subtipos, esto dependerá de la especie de vertebrados, y que varía entre diferentes especies. Consecuentemente, se espera que ciertos agonistas de β_2 AA tengan efectos diferentes en el mismo tejido en diferentes especies debido a las diferencias en la distribución de los subtipos de β AR y (o) secuencia de

aminoácidos (Mersmann, 2002); por tal motivo, se puede agregar que los efectos producidos por un agonista (o antagonista) de β AR en el tejido adiposo *in vivo* dependen no solo de la especie y la distribución de los subtipos de β AR del adipocito, sino también de la farmacocinética y farmacodinámica del compuesto en esa especie, incluido el flujo sanguíneo al tejido, y los múltiples efectos metabólicos y endocrinos del compuesto en otros tejidos del cuerpo (Mersmann, 2002).

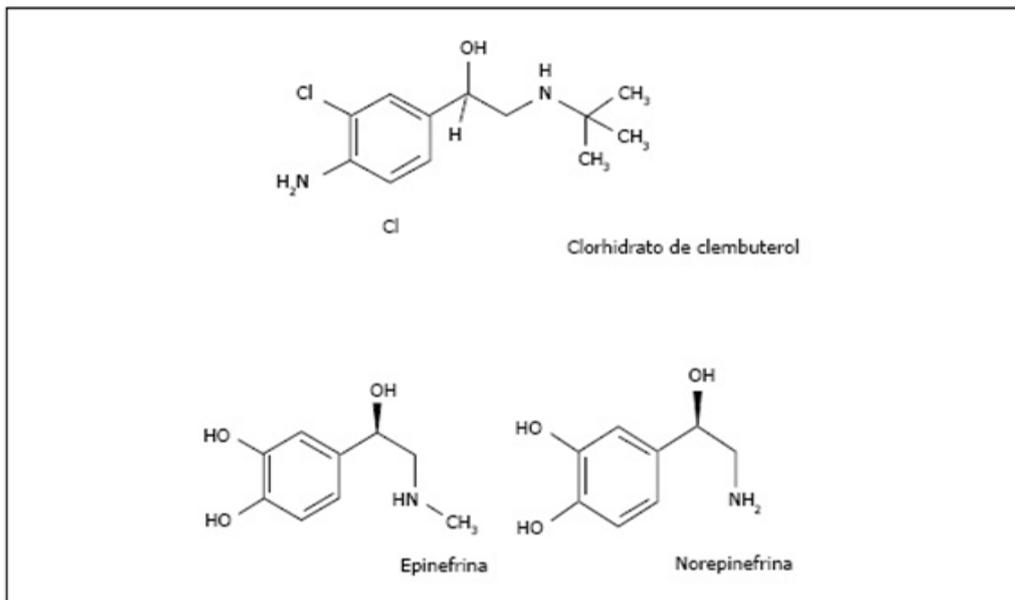
Estos fármacos β_2 -AA, son además agentes químicos que actúan específicamente a nivel de los receptores adrenérgicos celulares (β -AR), metabolizando los nutrientes e incrementan la energía, aumentan el metabolismo de las proteínas y de grasas, modifican la permeabilidad de la membrana celular, aumento de la lipólisis, y la glucogenólisis (Meyer y Rinke, 1991), debido a la ubicación de sus receptores (dominios hidrofóbicos transmembranales) en la membrana celular en donde actúan. Figura 1.

Figura 1: Todos los receptores β -AR contienen siete dominios hidrofóbicos transmembranales que permite que este componente como el Clb, su efecto sea mucho más prolongado principalmente en los adipocitos. Según Johnson *et al.*, 2014, (Asian Australasian J. Anim. Sci., Vol.27, No. 5: 757-766)



Además, traen consigo un incremento en la formación de masa muscular, y esto debido a que el grupo OH que poseen otros β_2 -AA, en el caso del Clb, es sustituido por un halógeno llamado cloro (Cl), este ion Cl evita la biotransformación por las enzimas COMT (catecol-O-metiltransferasa) a nivel tisular y se hace lenta la biotransformación hepática (Courtheyn *et al.*, 1996), este ion 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 en la grasa animal (Martin 1971, Ruffolo, 1991, Waldeck y Widmark, 1995). Figura 2.

Figura 2: Comparación de la estructura química de tres componentes llamados fenetanolaminas dos producidos fisiológicamente producidos por el organismo: la Epinefrina y Norepinefrina y un componente sintético llamado clenbuterol, este se caracteriza por tener dos átomos de cloro-Cl en su estructura, el cual, le da una acción prolongada. (Tomado de Valladares *et al.*, 2015).



La aplicación de β_2 -AA a mamíferos, amplifica una 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 -AA 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); se considera como dosis terapéutica (DT) 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal dos veces por día. La duración máxima del tratamiento en ganado no lactante permitido es de 10 días por vía oral o intravenosa. El uso ilegal del Clb y análogos en el ganado, es toda dosis que supere la dosis terapéutica (Sauer *et al*, 1995). En base a lo anterior se muestra que hasta el momento se desconoce las rutas metabólicas (biotransformación y biodisponibilidad) de degradación de este aditivo alimenticio, por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar las posibles rutas metabólicas del Clb en bovinos y su efecto en el deterioro homeostático del animal.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: Se utilizaron 2567 bovinos (*Bos taurus* X *Bos indicus*), el 95 % fueron machos y 5% hembras, procedente de diferentes zonas zoogeográficas del país y de diferentes rastros municipales como de fincas privadas. Todas las fincas en estudio fueron georreferenciadas con un GPS. Las edades de los animales fluctuaron desde los 22-38 meses, las razas predominantes: cruzadas, Angus X Brahman=Brangus, Angus, Cebú, Holstein, Charoláis y criollos.

Toma de muestras: Se emplearon tubos de ensayo al vacío, el primer tubo sin anticoagulante, para obtener el suero sanguíneo para la determinación del perfil metabólico y perfil hormonal de esteroides principalmente (progesterona y 17β -estradiol) 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 y se midieron 18 metabolitos tales como: macrominerales: calcio, fosforo, enzimas hepáticas: Gamma-glutamyl transferasa (γ GT), deshidrogenasa láctica (L-DH), Fosfatasa alcalina (FA); transaminasas como: alanina amino-transferasa (ALT/GPT) y aspartato amino-transferasa (AST/GOT), metabolitos como: albumina, Bilirrubina directa y total, colesterol total, Glucosa, proteínas totales, Urea/BUN, enzimas prostáticas: fosfatasa ácida total (FAt), no prostática y prostática; 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 17β -estradiol (E_2), se utilizó la técnica de inmunodiagnóstico de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), se utilizaron los *kits diagnostica, USA*, se midieron en un lector de ELISA (Stat Fax-2100, Microplate Reader).

Análisis Estadístico: los datos obtenidos se les realizado un análisis de varianza (ANOVA), con el programa estadístico Stat-2 (Olivares 1984) y para determinar la significancia entre promedios se utilizó *Duncan New Multiple Range Test*.

3 RESULTADOS

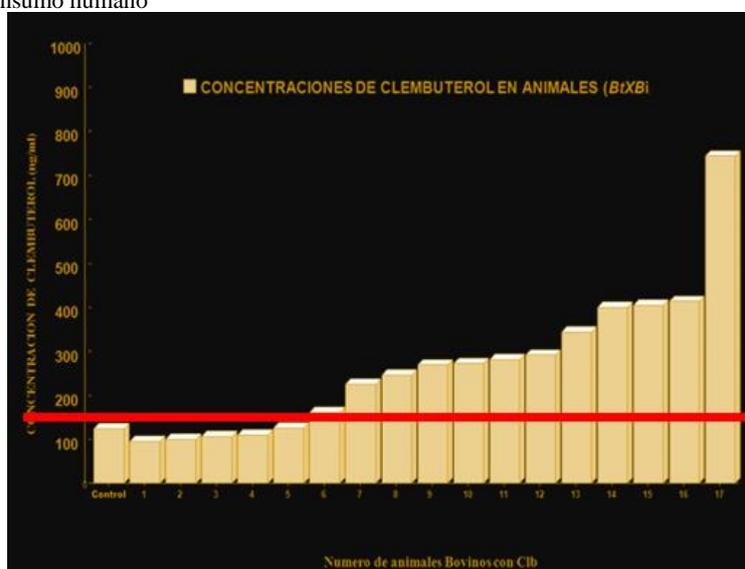
Efecto de las concentraciones administradas en bovinos con Clb

Los resultados muestrearon que el Clb, (β_2 -AA) altera el crecimiento y la composición del músculo, al parecer, decrecer el incremento del musculo cuando la lipogénesis decrece, estimula la lipólisis; el incremento de la masa muscular, el cual, está asociado con la proliferación de células satélites, estimulando las miofibrillas en la síntesis de proteínas y la supresión de la degradación de miofibrillas en la degradación de proteínas. Los animales muestreados incrementaron su peso

corporal entre un 50 a 70 % de su peso inicial, en un tiempo de 90 a 112 días de tratamiento, la alimentación diaria con Clb fue de dos veces al día, a concentración entre 5 a 10 veces la dosis terapéutica (0.8µg/Kg-peso corporal), ósea a dosis anabólica.

Un primer muestreo de animales bovinos llevados a rastro con un peso de sacrificio entre 457±21.6 a 672.8±39.9 kg, en un periodo de tratamiento entre 75.8±8.9 días a 121.7±11.3 días y con edades que fluctuaron entre los 25±1.0 a 38.9±2.2 meses, en la figura 3 se muestran las concentraciones de Clb detectadas en estos animales ya listo para su distribución y venta, las concentraciones de Clb fluctuaron entre 112.4±5.9 a 778±12.5 ng/kg. **Figura 3**

Figura 3. Se muestra las concentraciones de Clb de 17 bovinos en un rastro, donde la mayoría de los animales se detectaron con concentraciones de Clb por arriba de los permitidos por el *Codex alimentarius-FAO* (125ng/kg), la línea roja indica la concentración máxima permitida para consumo humano



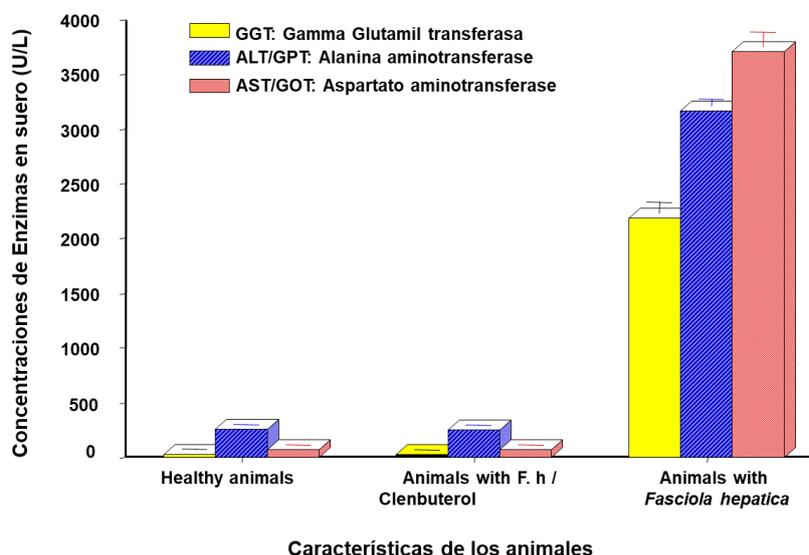
Un segundo muestreo realizado 12 meses después del primero, se detectaron concentraciones de Clb en tejido sanguíneo estos fluctuaron entre los 245±34.5 a 1623±146.6 ng/kg, si se analizan estos valores corresponde a animales bovinos listos para ser distribuidos en los diferentes supermercados para ser consumidos por el hombre, sin embargo, estos valores no coinciden con los valores aceptados por la FAO/OMS-(*Codex Alimentarius*), cuyos valores no deben rebasar a los 125.0 ng/kg, si el animal ha sido tratado con Clb, y supera este valor, entonces deberá someterse a periodo de cuarentena, para que estos valores presente en sangre bajen a través de su degradación a nivel sanguíneo y hepático, sin embargo, las altas concentraciones del Clb detectados en este estudios han coincidido con casos de intoxicaciones en humanos por la ingesta de vísceras de bovinos que es donde más se concentra este β₂-AA-Clb en bovinos, existen casos de intoxicaciones de Clb en humanos desde el año 2002 al año 2022, con más de 4500 casos a nivel nacional, por ejemplo en México.

Efectos del Clb al Perfil Metabólico:

Se recalca que existen muy pocos trabajos o casi ningún tipo de información del efecto del Clb los diferentes metabolitos y enzimas a nivel del suero sanguíneo de los animales bovinos destinados al consumo humano, sin embargo, este estudio realizo la medición de los varios metabolitos, el cual, fueron detectados y en la cual mostramos a continuación:

En cuanto al perfil metabólico se obtuvieron concentraciones elevadas de las enzimas transaminasas: la AST/GOT se tuvieron valores de animales clínicamente sanos (ACS) de 533.9 ± 0.26 U/L en comparación con animales tratados con Clb, cuyo valor detectado fue de 264.7 ± 0.22 U/L, hubo un descenso significativo $p < 0.01$, el cual, indica que hay un enorme cambio fisiológico a nivel hepático, a nivel del parénquima hepático, posiblemente degradación del parénquima hepático sin destrucción de tejido, ya que estas enzimas son intracelulares, lo mismo ocurrió con la ALT/GPT, cuyo valor en animales no tratados con Clb fue de 345.5 ± 0.60 U/L en comparación con bovinos tratados con Clb se detectó valores de 277.9 ± 0.50 U/L, hay también una disminución significativa de $p < 0,05$; por otro lado, la enzima hepática la Gamma-glutamil transferasa (γ GT), se detectó valores significativamente muy bajos ($p < 0.01$) con referente a los animales ACS, entre 16.7 ± 0.34 y 26.5 ± 0.30 U/L, respectivamente, el Clb también es capaz de disfrazar ciertas patológicas hepáticas trabajo ya presentado en el 2011. (**Figura 4**), estos animales presentaron muchas patologías hepáticas como: quistes, obstrucción de canalículos hepáticos y probablemente renal y aunque no se haya determinado para este caso muy particular a la fosfatasa alcalina-(FA).

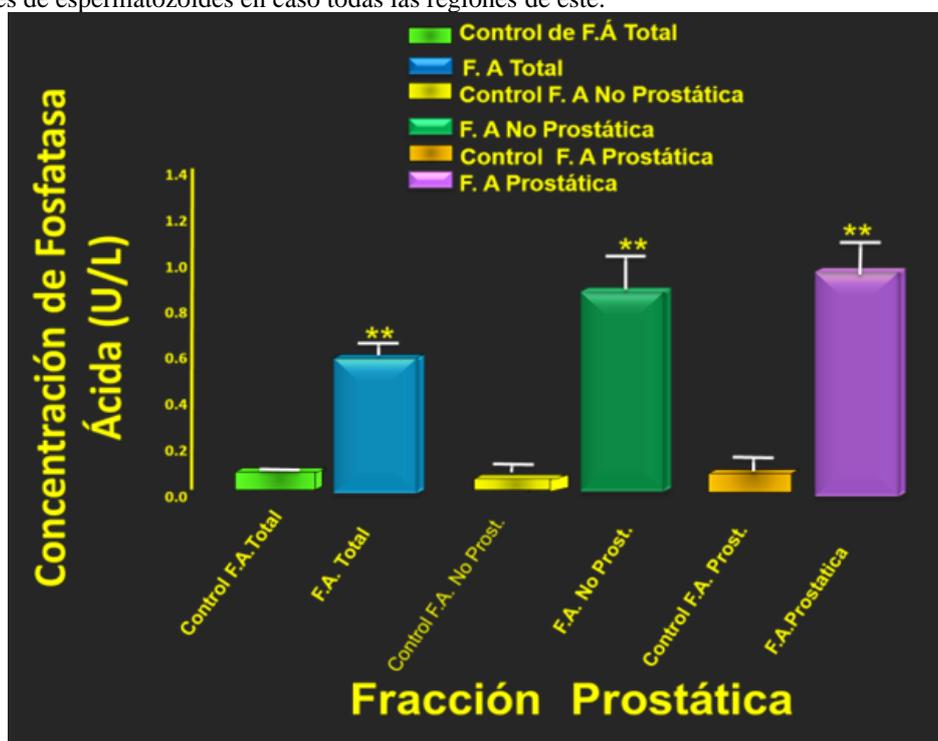
Figura 4: Se muestra como el Clb disfraza las enfermedades hepáticas en bovinos, donde los valores de animales con Fasciola hepatica más Clb tienen valores enzimáticos muy similares a los animales clínicamente sanos, mientras que los animales con *Fasciola hepatica* si muestran daños hepáticos- fibrosis hepatica-cirrosis, por los valores enzimáticos muy elevados en comparación con los otros grupos experimentales.



Otros metabolitos como la glucosa sus valores detectados fueron para ACS 115.8 ± 0.31 mg/dL y en animales tratados tuvieron valores de 195.4 ± 0.34 mg/dL son bajo, debido a la alta demanda metabólica que este Clb exige a las diferentes estructuras incluyendo al hígado, páncreas, glándulas tiroides y glándulas suprarrenales, ya que, inicialmente este parámetros metabólicos es muy elevado, al transcurrir las horas y días después de la ingesta de este aditivo alimenticio esta actividad disminuye, pero ciertos componentes procedentes de la degradación del Clb se acumulan incluyendo parte del Clb ingerido y que no llega degradarse en su totalidad, indicando que las biodisponibilidad de este es lo suficiente útil para seguir acumulándose en tejidos y continuar con la degradación de los lípidos, con acumulación de nitrógenos, a través de los adipocitos, estos como reserva energética del organismo y al degradarse liberan ácidos grasos y triglicéridos al torrente sanguíneo. La degradación de los adipocitos conllevan el incremento de la lipólisis, disminución de la lipogénesis e incremento de termogénesis, mientras que el músculo, tiende a acumular las altas concentraciones de Clb, la cual, lo convierte en un anabólico para el animal con un periodo de acción prolongado, considerar que la biotransformación a nivel muscular esto conlleva posiblemente, el aumento de la fibras muscular, esta obedece a que hay un incremento de la síntesis de proteínas, disminución de la degradación de proteínas, aumento de la glucólisis, en la producción de lactato y de la utilización de oxígeno. En el páncreas hay una disminución en la producción de insulina y en el aumento del glucagón, provocando en el animal una diabetes; mientras que en el hígado ocurre un incremento de la glucogenólisis y de la gluconeogénesis, esto conlleva en el animal daños hepáticos como la fibrosis-cirrosis, el cual, se detectó en un 62.3% de los animales estudiados, al igual que la presencia de quistes a nivel hepático.

La fosfatasa ácida prostática de los animales ACS su valor detectado fue de 3.87 ± 0.30 U/L, en comparación con los animales tratados con Clb, cuya concentración fue detectada fue de 11.3 ± 1.2 U/L. En su mayoría de los animales presentaron valores muy elevados en la fosfatasa acida total, no prostática y prostática, esto inducido probablemente a la termogénesis testicular, produciendo alteraciones en la morfología espermática. Todos los valores detectados con respecto al control de cada uno de estos parámetros son significativos $p < 0.01$. Figura 5

Figura 5: se muestran los valores de la Fosfatasa Ácida: total, No prostática y Prostática, demostrando que el Clb produce una elevación de esta enzima prostática, produciendo alteraciones en la morfología espermática. Si los valores de la fosfatasa ácida prostática son elevados como se demuestra en este estudio, indica presencia de un inicio de cáncer prostático si esto valores continúan elevados por un período de tiempo muy prolongado, por ende, se detectó malformaciones de espermatozoides en caso todas las regiones de este.



Además, las concentraciones de colesterol para este estudio disminuyeron de 264.5 ± 0.33 mg/dL a 207.8 ± 0.48 mg/dL, esta disminución es significativa a $p < 0.01$. El colesterol suele bajar cuando hay disfunción toroidal inducida por exceso de aditivos alimenticios-Clb, ya que se sabe que las glándula tiroides estimula la eliminación del colesterol por secreción directa en la bilis y los ácidos biliares y también estimula su síntesis mediante su control del nivel funcional del hepatocito, donde se forma aproximadamente el 90% del colesterol endógeno y esto puede aclarar la variabilidad de los cambios en la concentración sérica en patologías como hipertiroidismo e hipotiroidismo en los bovinos tratados con este β_2 AA-Clb, por un periodo de tiempo más allá de lo reglamentados, ya que muchos productores someten a sus animales a más de 100 días de tratamiento y a concentraciones más elevada que la dosis anabólica, entre un 12 y 15 % más.

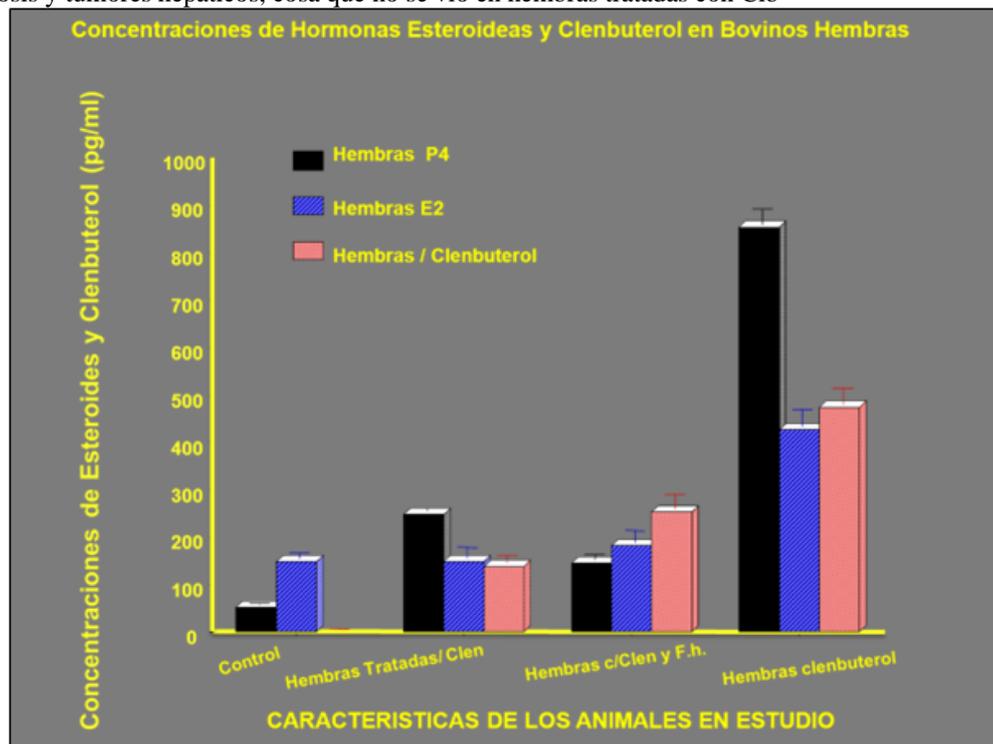
En cuanto a la Urea/Bun, constituye uno de los componentes nitrogenados más abundante no proteico en el organismo de los rumiantes, es el principal producto nitrogenado de desecho del catabolismo de las proteínas y solo se sintetiza en el hígado, los valores obtenidos para este estudio fluctuaron entre 30.4 ± 0.23 mg/dL en ACS y en animals tratados en 95.8 ± 0.28 mg/dL. Estos últimos valores muy incrementado y significativos ($p < 0.01$). mostrando una deficiencia renal, ya sea por el incremento de la presión arterial a nivel del aparato yuxtglomerular.

Cabe también mencionar que los restantes metabolitos medidos no mostraron cambios significativos por tal motivo, en este estudio no lo mencionaremos, pero si queremos recalcar que todos los 17 metabolitos medidos hubo cambios de acuerdo con los valores de los ACS.

Efectos del Clb a las Hormonas esteroideas

Cuando se detectaron los valores de hormonas esteroideas ligadas con la capacidad reproductiva en hembra se detectó valores de estradiol (E₂) entre 152.1±8.91 a 1152.3±89.74 pg/ml, y valores de progesterona (P₄), fluctuaron entre 248.51±12,51 a 852.42±90.2 pg/ml estos valores tan elevados de estrógenos y progesterona fueron obtenidos de hembras con anestros post parto muy prolongados mayor a 120 días (postparto). Figura 6

Figura 6: Se muestra las concentraciones de hormonas esteroideas en bovinos hembra: a) animales controles, b) hembras tratadas con Clb, c) hembras con Clb y *Fasciola hepatica*-Fh y d) hembras con clenbuterol, se aprecia que los valores de hembras con Clb y Fh. muestrearon valores de hormonas P₄ y E₂ más bajos que las hembras con Clb, demostrando que el Clb disfraza las afecciones hepáticas, ya que hembras con Clb y Fh, mostraron una alta prevalencia de quistes-fibrosis-cirrosis y tumores hepáticos, cosa que no se vio en hembras tratadas con Clb



4 DISCUSIÓN

Que es el clorhidrato de Clenbuterol y como actúa en animales de importancia alimentaria:

El Clb posee una estructura química muy relacionada a las catecolaminas capaz de interactuar con receptores adrenérgicos, generalmente del tipo β₂. Químicamente es un amino-4-amino alfa T butilamino metil 3, 5 diclorobenzil alcohol (Figura 2). Su vida media es de acción prolongada, con la particularidad de poder almacenarse en hígado y riñón. Según Boato, (2000);

Dimaano, (2008) y Valladares *et al.*, (2013b), se metaboliza por medio de reacciones de N-oxidación en hidroxyclenbuterol y conjugados glucurónicos.

El Clb considerado como un aditivo sintético y que pertenece a una clase de medicamentos análogos fisiológicamente a la adrenalina (Mersmann, 1998). Químicamente se describe como polvo blanco, anhidro, muy soluble en agua y altamente estable a temperatura ambiente, su punto de fusión es de 174 a 175.5 °C, tiene la capacidad de interactuar con receptores adrenérgicos, generalmente del tipo β_2 (β_2 -agonista), (Ishikawa, 2009; Valladares *et al.*, 2013 a y 2014a, b y c).

Los agonistas adrenérgicos fisiológicos (β -adrenérgicos) son la noradrenalina y la adrenalina; la noradrenalina, constituye una catecolamina del grupo de las fenetanolaminas, también y se considerada como un neurotransmisor del sistema nervioso simpático, que se biosintetiza a partir de la tirosina y circula en el suero sanguíneo en concentraciones relativamente elevadas. La adrenalina del mismo grupo se sintetiza y secreta en la médula adrenal; circula en menores concentraciones que la noradrenalina en la mayoría de los mamíferos, pero en situaciones de estrés responde en mayor proporción que la noradrenalina. La noradrenalina es más selectiva de receptores α y la adrenalina actúa sobre ambos, con mayor selectividad por los receptores β , pero con un efecto α más dominante. Las respuestas fisiológicas se producen cuando estos agonistas β_2 -adrenérgicos se unen a los receptores específicos (Badino *et al.*, 2005). Estas son moléculas orgánicas y los β_2 -adrenérgicos que se unen a los receptores β_2 -adrenérgicos-, dando lugar al complejo agonista-receptor (β_2 AR), que a su vez activa a la proteína Gs. La subunidad α de la proteína Gs activa a la adenilato-ciclasa-(ADC-asa), enzima que produce el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), está considerada como una de las principales moléculas de señalización intracelular. Esta molécula, produce sus efectos al unirse a la subunidad reguladora de la cinasa proteica A, para liberar la subunidad catalítica que fosforila a un buen número de proteínas intracelulares (Mazzanti *et al.*, 2003). Estas proteínas tienen papeles funcionales vitales para una variada gama de funciones que van a permitir la entrada de Ca^{++} a la célula, hasta mediar la síntesis de proteínas clave para el funcionamiento celular (Mazzanti *et al.*, 2003).

El Clb es administrado a dosis entre y diez veces superiores a la terapéutica, a estas concentraciones ha de presentan una acción anabólica, esto va a favorecer a la síntesis de proteína y disminuye a las grasas en la musculatura esquelética del bovino. Los receptores β AR, están presentes en la mayoría de las células de los mamíferos, aunque la distribución de los subtipos (β_1 , β_2 y β_3) y la proporción de cada uno de estos varía según el tejidos y especie de animal (Mitchell and Gloor, 1998). Se considera a los β_1 que predominan en el corazón estimulando su inotropismo (fuerza de contracción) y en el músculo liso intestinal induciendo relajación y los β_2 AR se localizan en los bronquios y músculo uterino, provocando relajación en ambos casos, por ende, la magnitud

de la actividad fisiio-farmacológica de un agonista o agonista parcial β adrenérgico, dependerá de su denominada actividad intrínseca en el receptor y distribución en los tejidos blanco (Valladares *et al.*, 2014 a, b).

El Clb su efecto en condiciones fisiológicas produce el crecimiento del músculo esquelético, el cual, es el resultado primario de una hipertrofia y se detecta con el aumento de la síntesis proteica muscular y con una disminución en la degradación de proteína muscular o una combinación de ambas producen aumento de la masa muscular (Mersmann, 1998). Este permite el incrementar el flujo sanguíneo a ciertas regiones del cuerpo, lo cual, permite el proceso de hipertrofia en el músculo esquelético al transportar mayores cantidades de sustratos (Proteínas) y fuentes de energía para la síntesis de proteína (Ramos, 2009). Otra de sus principales acciones a nivel muscular es la disminución en la cantidad de la grasa en la canal. Se ha demostrado “*in vitro*” la degradación de triacilglicerol en adipocitos y la inhibición de la síntesis de ácidos grasos-AG y de triacilglicerol, el tejido de los animales presenta una actividad lipolítica aumentada (disminución de la grasa muscular), una actividad hipogénica disminuida, o ambas (Valladares *et al.*, 2013 a y c). La elevación de la concentración plasmática de ácidos grasos no esterificados después de la administración del Clb, confirma la actividad lipolítica que ocurre en los adipocitos (Caicedo *et al.*, 2011 y 2021).

El Clb acrecienta la perfusión sanguínea hacia el músculo, así como una mayor disponibilidad de energía y aminoácidos; como resultado se produce un aumento en la síntesis y retención de proteínas y que favorecerá la hipertrofia muscular, principalmente de los músculos de los cuartos traseros del animal. En el músculo, además de la hipertrofia, ocurren cambios en el tipo de fibra muscular, también hay cambios en la proporción de ARN de transcripción para proteínas musculares como la miosina y actina (Meyer and Rinke, 1991). En ovinos y bovinos se ha observado que aumenta el peso de los músculos en 40%, y que la magnitud de la respuesta varía dependiendo del β adrenérgico suministrado, así como de la influencia de factores como la especie, la raza, la edad, el sexo y la dieta (Barry y Graham, 2013 y Caicedo *et al.*, 2021).

Según Mersmann, (1998) y Caicedo *et al.*, (2021), el Clb es considerado como un Beta₂-agonista-adrenérgico (β_2 -AA) y un anabólico no esteroideo utilizado en la actualidad para el dopaje en el deporte. Esta sustancia es conocida por el inducir hipertrofia del tejido musculoesquelético. El mecanismo preciso de cómo produce este efecto de hipertrofia no está muy bien dilucidado; sin embargo, la hipótesis más aceptada es que induce a este efecto a través de los receptores β_2 -adrenérgicos, por la regulación controlada de la expresión de los factores de crecimiento de la insulina (IGFs) que juegan un papel esencial en el desarrollo, el crecimiento y la regeneración del tejido musculoesquelético.

Histológicamente, las células satélites de los músculos esquelético son mononucleadas y residen entre el sarcolema y la lámina basal de las miofibrillas adultas. En respuesta a los estímulos como son la carga mecánica, descarga, denervación, y lesión son activadas a través de varios factores de crecimiento que contienen IGFs (Boato, 2000; Mersmann, 1998), esta activación permite que haya cambios adaptativos como es la hipertrofia, la alteración del tipo de fibras y la regeneración (Valladares *et al.*, 2014b).

Para los β_2 AA es muy importante el reemplazo del anillo aromático, el reemplazo de este permite una actividad biológica específica a nivel muscular, ya que se hace para obtener una actividad biológica definida. Hay que considerar, que cuando los OH (hidroxilo) son sustituidos por un halógeno como en el caso del Clb por cloro, se evita la biotransformación por las enzimas COMT (*catecol-O-metiltransferasas*), a nivel tisular y se hace muy lenta la biotransformación hepática (Boato, 2000), la presencia de este halógeno cloro, lo hace más liposoluble que sus análogos, y, por ende, tiende a difundir más en los tejidos y en la grasa animal (Mersmann, 1998; Valladares *et al.*, 2014b, Caicedo *et al.*, 2021).

Efecto del Clb detectados en este estudio

Para este estudio hay que considerar que una de las características más importantes en cuanto a la estructura del Clb es que posee un halógeno en su estructura química el cual es el ión cloro, este ión cloro (Cl), permite retardar 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 del sistema reproductor en hembras y machos, porque en los animales con una alta ingesta de Clb, la actividad reproductiva disminuye, (Caicedo *et al.*, 2010 y 2011, Paz-Calderón *et al.*, 2011), por otro lado, hay aumento de la fosfatasa ácida prostática posiblemente por el efecto termogénico del Clb, este fenómeno calórico lo que hace es alterar la morfología del esperma (Paz-Calderón *et al.*, 2011). Además, podemos considerar que los β_2 -AA estimulan a la glándula suprarrenal al producir glucocorticoides y corticoides (dexametasona y betametasona); el efecto del Clb a nivel de esta glándula adrenal aún no está bien claro. Es probable que en hembras estimule la producción de esteroides (P_4 y E_2) a nivel de los ovarios como progesterona y estradiol y en machos incrementa los niveles de testosterona (T) y fosfatasa ácida prostática, sin embargo, se desconoce el daño probable que puede producir el clenbuterol en los órganos reproductivos (Caicedo *et al.*, 2011 y 2021), debido a que en ellos se producen estos esteroides, es probable que el Clb en la glándula suprarrenal, incremente los glucocorticoides y mineralcorticoides, que

también pueden llegar a incrementar los esteroides (estrógenos y progestanos) a través de este órgano (Caicedo *et al.*, 2011 y 2021).

Se puede considerar que el Clb produce un incremento de la actividad del sistema nervioso, que conduce a la pérdida del apetito, el 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.*, 2009 y Saavedra *et al.*, 2019). Al ser capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica, es viable que la reducción del consumo de alimentos pueda ser atribuida a un exceso de la estimulación de receptores β_2 -adrenérgicos (β -AR) 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 clenbuterol, por lo tanto, modifica la composición muscular de los animales, puesto que en animales tratados con β_2 -AA, 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 -AA, es una hipertrofia del tejido muscular esquelético estriado, lo que se demuestra por los estudios realizados por Beermann *et al.*, (1983 y 1986) en ratas y por Martin *et al.*, (1990) en vacas. Los efectos de los β_2 -AA sobre el sistema endocrino, son debidos en gran parte a la liberación de otras hormonas (Caicedo *et al.*, 2009, 2011 y Saavedra *et al.*, 2019).

Entre las acciones de las catecolaminas están la inhibición de 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 Clb en la glándula adrenal, que es aún más sorprendente, si se piensa que existen receptores β -adrenérgicos (β -AR) en esta glándula, que la médula adrenal es uno de los tejidos que sintetizan y secretan las catecolaminas naturales adrenalina y noradrenalina y que la glándula adrenal sintetiza y secreta los glucocorticoides, por último, hay que considerar 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 -AA 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 reflejarse con la termogénesis, parte de la energía ingerida evita la formación de grasa y por otra parte el efecto directo está en el 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 transforma 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 -AA, juega un papel muy importante en el efecto a corto y mediano plazo, para la administración de este. En base a los estudios previos y los datos que se han obtenido en este estudio se puede agregar lo siguiente: La administración de Clb, a dosis anabolizante, causa una alteración de la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal-gonadal-hepático en bovinos, que en algunos casos es reversible, después de un período de retirada o cuarentena. Además, que las rutas del Clb en bovino, el cual, conlleva la formación de: 4-nitroclenbuterol, hidroxilamina de clenbuterol, ácido 4-amino sulfónico de clenbuterol, alcohol-hidroxilamina 2,5-dicloro-a-bencil y ácido 4-amino-3,5-dicloromandelico, todos estos componentes son altamente tóxicos para la fisiología animal según Fiems (1987), Zalko 1997 a y b; Caicedo *et al.*, (2021). Figura 7.

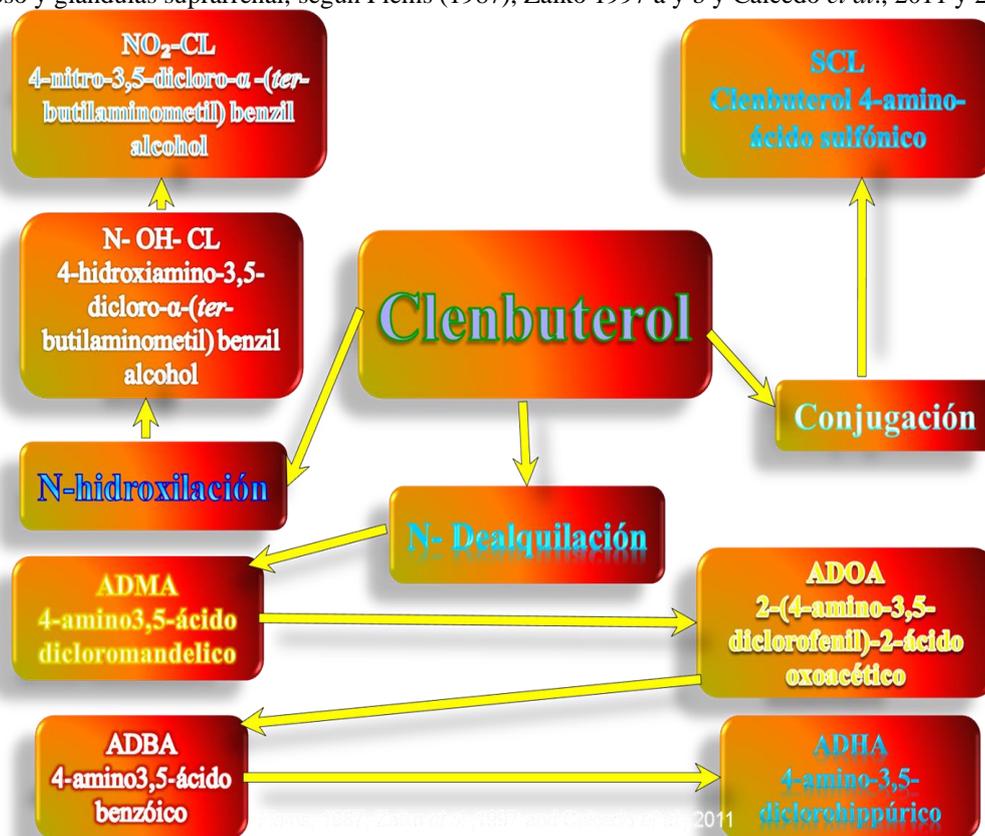
Se puede considerar que la respuesta máxima de β_2 -AA-clembuterol se ve afectada por la dosis administrada y la duración de una dosis sostenida (Ricks *et al.*, 1984). Esto ha sido bien documentado y que el aumento de cAMP mediado por β -AR es temporal y que la activación continua del receptor por el ligando β -AA es necesaria para mantener los niveles de cAMP para sostener la respuesta. La exposición a una dosis constante de β AA para el receptor eventualmente causará una desensibilización o inactivación aguda de la señalización mediada por el receptor. La fosforilación tanto de la proteína quinasa A-(PKA) como de las quinasas β -AR son los pasos principales para iniciar la cascada de señalización que sigue a la activación de cAMP por β -AR (Hausdorff *et al.*, 1990). La desensibilización aguda puede evitarse hasta cierto punto aumentando la dosis y potenciando la señal. La exposición a largo plazo (crónica) a dosis elevadas de β_2 -AA conduce a la internalización o pérdida del receptor de la superficie celular y a la disminución de la abundancia de ARNm de β -AR (Hausdorff *et al.*, 1990). Estas alteraciones parecen ser irreversibles al menos en el período de alimentación a corto plazo. Sin embargo, adicionalmente a todo esto Sauer *et al.*, (1995) detectó que al evaluar la cinética de Clb en becerros holstein-friesian, a los que se les suministraron una dosis de 10 μ g/kg de peso cada 12 h durante 21 días, encontraron residuos en

suero sanguíneo a las 6 h, 1, 2, 4, 8 y 16 días después de iniciado el tratamiento. Desde el día 2 de retiro del Clb, al sacrificio de los bovinos, las concentraciones más elevadas detectadas se encontraron en hígado, riñón, bilis y orina. En estudios realizados en *Rattus norvegicus*, según FAO-OMS, consideraron que la administración de Clb aumentó la incidencia de leiomiomas meso-ováricos después de haber recibido dosis de hasta 25 mg/kg de peso al día. Concluyeron que estos se deben más a una estimulación adrenérgica y no tanto a factores de tipo genotóxico, lo mismo se puede decir que sucedió con ratones expuesto con el Clb, según Valladares-Carranza *et al.*, (2017), donde hubo incremento de la masa muscular y alteraciones a nivel del hígado y corazón en este se detectó a través del estudio histopatológico de las fibras cardíacas engrosamiento y rizamiento de fibras musculares, pleomorfismo e hileración nuclear, esto relacionado con lo hipertrofia muscular del músculo cardíaco. Mientras que a nivel hepático de los animales tratados con Clb las lesiones observadas fueron: tumefacción y degeneración hidrópica de moderada a difusa, mitosis, picnosis y megalocitosis con megacariosis de hepatocitos, esto provoca lesiones a través de los hepatocitos provocando alteraciones de estos en la producción de la bilis, por ello las altas concentraciones en bovinos de la bilirrubina detectados en este estudio. En el hígado de los ratones expuestos a Clb se observaron alteraciones importantes, que ponen de manifiesto su efecto tóxico (Valladares-Carranza *et al.*, 2014a y b y 2015). El Clb en el organismo de los animales tiene una función y acción prolongada, como se ha mencionado tiende a almacenarse primordialmente en hígado y riñón (por ser estos órganos de filtración de componente y reguladores de la homeostasis) y se metaboliza por medio de reacciones de N-oxidación en hidroxiclembuterol y conjugados glucurónicos (Mazzanti *et al.*, 2003 y Valladares-Carranza *et al.*, 2015). Zalko *et al.*, (1997a), manifestó que los metabolitos del Clb: N-hidroxilarilamina y N-nitroso clembuterol, poseen propiedades tóxicas de riesgo tanto para la salud animal como para el humano. Otro caso muy particular del efecto del Clb en conejos a los que se les administraron dosis de 30 µg-50 mg/kg de peso al día se observaron signos de feto toxicidad, como retraso de la osificación y paladar hendido. Por otro lado, estudios realizados por Carrola *et al.*, (2003), en dos casos humanos estos presentaron signos de tremor muscular, náuseas e incoordinación; a la auscultación mostraron un incremento de la frecuencia cardíaca, incremento de la presión arterial y en el examen hematológico presentaron: leucocitosis, acompañada de neutrofilia, hipercalemia e hiperglucemia, mismos que se dan a nivel de los bovinos que son sometidos a la alimentación con el β_2 AA-Clb. Sería muy interesante realizar investigaciones de este tipo en bovinos, aves o porcinos, además de que son las especies en las que más se llega a usar, y las que se consumen en mayor frecuencia y cantidad en el mercado nacional (SIAP, 2009). Según estudios de Avilés-Martínez *et al.*, (2019) detectaron valores de Clb en altas concentraciones en bovinos un 69.3% de los animales muestreados entre rastros municipales, otros estudios por

Caicedo *et al.*, (2021) detectaron un 62.3% de animales positivo a Clb de una población de 36,000 bovinos muestreados en rastros municipales, indicando que no hay medidas pertinentes al uso de este componente (Caicedo *et al.*, 2021), a pesar de que la norma de prohibición existe en México (Norma Oficial Mexicana NOM061-ZOO-1999, que prohibió su empleo, producción, comercialización y administración en animales de consumo humano en el país (SAGARPA, 2000) y que desde el año 2002 se vienen presentando intoxicaciones en humanos por el consumo de vísceras y carne procedentes de este producto proteico contaminado con este Clb.

Finalmente, los β_2 -agonista-adrenérgicos son análogos de las catecolaminas epinefrina y norepinefrina. Pueden funcionar a través de adrenoceptores beta específicos (β AR) en la superficie de los adipocitos y las células del músculo esquelético. Está comprobado que el β_2 AA. Clenbuterol promueve el crecimiento, de igual manera esta dilucidado hasta cierto punto que estos medicamentos Clb y zilpaterol reducen la grasa total de la canal y aumentan la proteína total de la canal en cuatro especies: bovinos, ovejas, ave doméstica y ratas. Muchos agonistas β -adrenérgicos reducen los lípidos de la canal estimulando la lipólisis y bloqueando la lipogénesis en el tejido adiposo.

Figura 7: Biodisponibilidad y Biotransformación del Clenbuterol en bovinos y posibles rutas metabólicas del Clenbuterol en las diferentes estructuras del bovino: hígado principalmente, páncreas, riñón, y pulmón a nivel del sistema nervioso y glándulas suprarrenal, según Fiems (1987), Zalko 1997 a y b y Caicedo *et al.*, 2011 y 2021.



5 CONCLUSIONES

Para este estudio podemos considerar las siguientes conclusiones:

1. El Clb contribuye al incrementar la masa muscular en bovinos a expensas de alterar su bienestar, provocando alteraciones en los metabolitos sanguíneos ligados a sus procesos de homeóstasis,
2. Por ende, afecta los genes que regulan el metabolismo celular y de órganos en los bovinos,
3. La hipertrofia acelerada producida por este β_2 AA no es la ideal por el tiempo en que se presenta, alterando los procesos hormonales y procesos del sistema nervioso periférico,
4. El Clb contribuye a alteraciones en la producción de hormonas esteroideas inhibiendo la actividad ovárica en hembras, produciendo anestro muy prolongados,
5. Mientras que en macho produce alteraciones a nivel de las células precursoras de la espermatogénesis, las espermatogonias, produciendo malformaciones a nivel de cola y cabeza del espermatozoide,
6. Un exceso en la dosis del Clb produce alteraciones en los niveles de fosfatasa ácida provocando posiblemente cáncer prostático en bovinos,
7. El órgano que mayores alteraciones se produce es el hígado, provocando quistes hepáticos, alterando la función de los hepatocitos en producir bilis.

Sin embargo:

- a) El β_2 -AA-Clembuterol mejora consistentemente el rendimiento del ganado de carne y aumenta el crecimiento muscular cuando se mezcla con raciones de terminación.
- b) Cambios en la abundancia del ARNm de múltiples genes asociados con la diferenciación miogénica pueden indicar un efecto importante de β_2 AA sobre la proliferación, diferenciación y / o el reclutamiento de las células satélite en las fibras musculares para promover la hipertrofia muscular
- c) La actividad fisiológica del Clb, depende de la actividad inherente del receptor y su absorción, tasa de metabolismo, eliminación y distribución en el tejido blanco
- d) Hay que considerar que el ganado bovino que recibe β_2 -AA-clembuterol tiende a tener puntajes de marmoleo muy bajos, menor cantidad de la grasa dorsal y mayor dureza de la carne y altos niveles en el contenido de H₂O.
- e) La elevación de los tipos de fibras glucolíticas con el tratamiento con β_2 -AA-clembuterol es la principal responsable del aumento de la hipertrofia

muscular, sin embargo, se correlaciona negativamente con la cantidad de tejido adiposo, tanto intramuscular como intermuscular,

f) La disponibilidad y la biotransformación del Clb en tejidos y órganos dependerá de la concentración y tiempo en la que los bovinos son sometidos a este anabólico, el cual, se tiene pruebas que se les administran más de las dosis anabólicas permitidas, el cual, no debe ser, ya que afecta al propio animal y finalmente al consumidor al hombre.

g) Finalmente, estos cambios a nivel metabólico producen alteraciones a nivel estructural, el cual no presentamos en este estudio, sin embargo, estos cambios producen malformaciones estructurales, principalmente en la musculatura, en las características reproductivas y transformaciones hormonales provocando cambios productivos que inhiben a mediano y largo plazo la sustentabilidad productiva y reproductiva del bovino.

A pesar, que existe una prohibición (normatividad-federal) en su aplicación a animales de importancia alimentaria para humanos se sigue administrando, se adiciona que esta administración por lo general no está regulada con personal profesional

AGRADECIMIENTOS

A las autoridades de investigación de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a los rastros municipales que participaron en autorizar la toma de muestras sanguíneas y órganos de los bovinos y fincas privadas involucradas, como también a todos los estudiantes que participaron en este estudio de investigación a todos, gracias.

Aclaremos que este trabajo no tiene ningún tipo de interés particular, solo se quiere demostrar que hace falta mucho trabajo en pro de incrementar la calidad de vida del animal y su bienestar, para asegurar la producción de alimentos inocuos en nuestra región y en pro de mejorar el medio ambiente.

Igualmente, hay que aclarar que las dosis de Clb administradas no fueron dadas por los autores de este estudio, sino que ya los ganaderos administraban dosis desde 5 a más de 10 veces su concentración terapéutica, y que los autores realizaban supervisión sobre la administración de este β_2 AA, en fincas donde se nos autorizaba, ya que en muchas no se nos permitía entrar. Cabe recalcar que los muestreos fueron realizados en fincas particulares y en su mayoría en rastros municipales, por ende, no tenemos ningún tipo de responsabilidad e inherencia en la administración de este componente β_2 AA-Clb, y los animales antes de realizarle su muestreo pasaban por inspección veterinaria del patólogo de cada rastro, nuestra función fue solo y únicamente el muestreo de sangre y obtención de órganos principalmente de aquellos con signos patológicos visibles.

REFERENCIAS

- 1- Avilés-Martínez J.A, Velázquez-Ordóñez V, Valladares-Carranza B, Zaragoza-Bastida A, Felipe-Pérez YE, Ortega- Santana C, Rivero-Pérez N, Aparicio-Burgos JE y Gutiérrez-Castillo Ad. (2019). Determinación de clorhidrato de clenbuterol en orina de bovinos en tres rastros municipales del estado de México. *Rev Med Vet.* ;(38): 111-118. Doi: <https://doi.org/10.19052/mv.vol1.iss38.10>
- 2- Barry, A.R. and Graham, M.M. 2013. Case report and review of clenbuterol cardiac toxicity. *J. Cardiol. Cases*, 8:131-133.
- 3- Beermann, D.H., Bittler WR., Hogue DE., Fishell V.K., Dalrymple RH., Ricks CA., and Scanes CG. (1986). Toxicity of Clenbuterol, beta adrenergic in animals. *J. Animal Sci.* 65:1514-1524.
- 4- 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.
- 5- 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.
- 6- Boato, G. 2000. Synthesis and characterization of new beta agonists of probable illicit use in animal productions. In: Van Ginkel, L.A. and Ruiter, A. (Eds), *Residues of Veterinary Drugs in Food*. Veldhoven, NL, 237-241.
- 7- Caicedo R. R.E., Torres Beltrán A., Hernández, Zepeda J.S., Reséndiz Martínez R., Pérez y Terrón. R. y Cabrera Bautista E. (2009). Effects o beta agonist in the diagnosis of fascioliasis 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, Vienna, Austria, Vol1: 183-187.
- 8- 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- Paraíba-Brasil, pp. 460-465. ISSN:2567-1954-7.
- 9- Caicedo Rivas. R.E., Paz-Calderón Nieto, M. y Badillo M. S.V. (2011). Clenbuterol (β_2 -agonista Adrenérgico, enmascara las patologías hepáticas en bovinos. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*. Vol.1: 327-331.
- 10- Caicedo Rivas R.E., Paz-Calderón Nieto M., Estrada Poblano. M. (2021). Effects of B_2 -adrenergic agonist (B_2 -AA), in the Physiology of *Bos taurus X Bos indicus*. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*. Vol 4, No. 2, page. 1667- 1683. ISSN: 2595-573X. DOI: 10.34188/bjaerv4n2-010.
- 11- Carrola P, Devesa N, Silva JM, Ramos F. (2003). Intoxicacao por agonista betaadrenérgico. *Acta Med Port.*;16:275-8

- 12- 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.
- 13- Dimaano, J.Q. 2008. Street drugs possibly tainted with Clenbuterol. *J. of Emergency Nursing*, 34: 582-583.
- 14- Fiems, L O. (1987). Effect of beta-adrenergic agonists in animal production and their mode of action. *Annales de Zootechnies.* 36(3), 271-290.
- 15- Hausdorff WP, Lohse MJ, Bouvier M, Liggett SB, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1990). Two kinases mediate agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the beta 2-adrenergic receptor. *Symposium Soc Exp Biol.*; 44:225-240.
- 16- 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.
- 17- 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.
- 18- Ishikawa, C. (2009). Effects of Clenbuterol, a β_2 – adrenergic agonist, on Sizes of Masseter, Temporalis, Digastric, and Tongue muscles. *The Open Dentistry J.*, 3: 191-196.
- 19- Johnson B.J., Smith S. B. y Chung K.Y. (2014). Historical Overview of the Effect of β -Adrenergic Agonists on Beef Cattle Production. *Asian-Australas J Anim Sci.* Vol. 27, No. 5: 757-766.
- 20- 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.
- 21- 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.*
- 22- Lueso Sordo, M.J. and Gómez Berzal, M.A. (1990). *Mundo Ganadero* 7: 12-16.
- 23- Mazzanti G, Daniele C, Boatto G, Manca G, Brambilla G, Loizzo A. (2003). New β -adrenergic agonists used illicitly as growth promoters in animal breeding: chemical and pharmacodynamic studies. *Toxicol*; 187(2-3):91- 9. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00059-3).
- 24- 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.
- 25- Meyer, H.H.D. y Rinke, M.L. (1991). The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *J. Anim. Sci.* 69:4538-4544.
- 26- 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.
- 27- 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.

- 28- Mersmann, H.J. (1998). Overview of the effects of beta-adrenergic receptor agonist on animal growth including mechanisms of action: *Journal of Animal Science*. 76:160-172.
- 29- Mersmann, H.J. (2002). Beta-Adrenergic receptor modulation of adipocyte metabolism and growth. *Journal of Animal Science*, Volume 80, Issue E-suppl-1, 2002, Pages E24-E29, <https://doi.org/10.2527/animalsci2002.0021881200800ES10005x>
- 30- Mitchell, G.A. and Glora, D. 1998. Illegal use of β -adrenergic agonistic in the United Status. *J. Anim. Sci.*, 76:208-211.
- 31- 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.
- 32- Olivares Sáenz, E. (1994). Paquete de diseños experimentales. FAUANI. Versión 2.5. Facultad de Agronomía. UANL. Martín. NL.
- 33- Paz-Calderón Nieto M., Caicedo Rivas. R.E. y Hernández Pérez, B. (2011). Effect of clenbuterol in the levels of acid phosphatase “Prostatic Fraction”, in cattle males. *Actas Iberoamericanas de Conservación animal*. Vol.1: 136-40.
- 34- Ramos, F., Baeta, M.L., Reis, J. and 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.
- 35- Ricks CA, Dalrymple RH, Baker PK, Ingle DL. (1984). Use of a β -agonist to alter fat and muscle deposition in steers. *J Anim Sci*. 59:1247–1255.
- 36- Ruffolo RE. (1991). Chirality in α and β -adrenoceptor agonists and antagonists. *Tetrahedron*; 47:9953-9980.
- 37- Saavedra-Rodríguez, A., Caicedo Rivas, R.E. Paz-calderón Nieto, M., Estrada Poblano, M. (2019). Physiological Effect of B2-agonist adrenergic “Clenbuterol” in the cattle *Bos taurus* X *Bos indicus*, in the Estate of Puebla, México. *Agroproductividad*. Vol.12, Num. 6, pp:63-68, <https://doi.org/10.32854/agrop.v0i0.1378>.
- 38- SAGARPA. (2000). NOM-061-ZOO-1999. Especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal. México, D.F. Diario Oficial de la Federación
- 39- 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.
- 40- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Producción, peso y valor de ganado en Pie [internet]. (2009). Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/index.php?option=comwrapper&view=wrapper&Itemid=371>
- 41- Smith DJ. (1998). The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of beta-adrenergic agonists in livestock. *J. Anim. Sci*; 76:173-194.

- 42- 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.
- 43- 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.
- 44- Valladares CB, Montes de Oca JR, Zamora E JL, Velázquez OV, Posadas ME, Peña BSD. (2013a) Influence of the use of additives and growth promoters on the herd health. In: Salem AFZM. Feed nutrients and animal health. Roles of some nutrients in animal health. Deutschland: Lambert Academic Publishing.
- 45- Valladares, C.B., Velázquez, O.V., Zamora, E.J.L., Aviles, M.J.A., Zaragoza, B.A. and Posadas, S.M.A. (2013b). Implications of the Use of Clenbuterol Hydrochloride in Beef Cattle. In: Salem AFZM. Nutritional Strategies of Animal Feed Additives, New York: Nova Science Publishers, Inc.
- 46- Valladares, C.B., Velázquez, O.V., Posadas, M.E., Peña, B.S.D., Zamora, E.J.L., Ortega, S.C., Alonso, F.U. (2013 c). Determinación de clorhidrato de clenbuterol en suero sanguíneo de bovinos para abasto del estado de Guerrero, México. En: Beatriz Nava Moreno. Seguridad Alimentaria y Producción Ganadera en Unidades Campesinas. México, Universidad Autónoma de Chapingo.
- 47- Valladares, C.B., Bañuelos, V.R., Peña, B.S.D., Velázquez, O.V., Velázquez, A.Y. and Nava, O.A. (2014a). Illegal use of clenbuterol in cattle production in México. *Health*, 6:673-676. <http://dx.doi.org/10.4236/health.2014.68087>.
- 48- Valladares, C.B., Bañuelos, V.R., Peña, B.S.D., Velázquez, O.V. y Zamora, E.J.L. (2014 b). Biocinética y lesiones histológicas del clorhidrato de clenbuterol en modelo conejo. En: M. Ramos, V. Aguilera. Ciencias Agropecuarias, Handbook – ©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato. pp. 61-69.
- 49- Valladares-Carranza B, Bañuelos-Valenzuela R, Peña Betancourt SD, Velázquez-Ordóñez V, Echavarría Cháirez FG, Muro-Reyes A. (2015). Efecto del clorhidrato de clenbuterol sobre el funcionamiento hepático en modelo conejo. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales [internet]*. 1(1): 16-23. Disponible en: <http://www.ecorfan.org/spain/researchjournals/Ciencias-Ambientales-y-Recursos-Naturales/vol1num1/Revista-Ciencias-Ambientales-23-30.pdf>
- 50- Valladares-Carranza, B., Bañuelos-Valenzuela, R., Peña-Betancourt, S.D., Velázquez-Ordóñez, V., Echavarría-Cháirez, F.G., Ortega-Santana, C., Sánchez-Torres, J.E. y Lozano-Carbajal, B. (2017). Efecto del clorhidrato del clorhidrato de clenbuterol de clenbuterol en la ganancia de peso y lesiones histológicas en la ganancia de peso y lesiones histológicas en ratones. *Rev. Med Vet.*; (35): 129-136. Doi: <https://doi.org/10.19052/mv.4395>
- 51- 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.
- 52- Zalko D, Bories G. y Tulliez. (1997-a). Metabolic fate of clenbuterol in calves. *Agric. Food Chem.* 1998, 46, 5, 1935–1943
- 53- Zalko D, Debrauwer L., Bories G. y Tulliez J. (1997-b). Evidence for a new and major Metabolic Pathway of Clenbuterol Involving *in Vivo* Formation of an *N*-Hydroxyarylamine. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 2, 197–204