

María del Mar Martínez Mateos

***"EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE BETA-ADRENÉRGICOS EN RATAS
SOBRE LA ESTRUCTURA HEPÁTICA Y LOS PERFILES HORMONALES"***

Departamento de Fisiología Animal
Universidad Complutense de Madrid

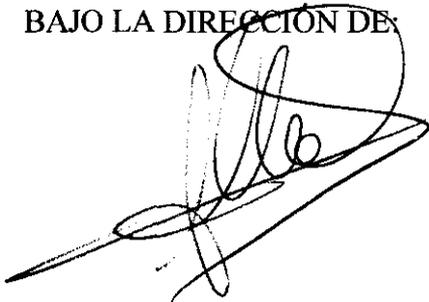
1998

A mi familia

**"EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN
DE BETA-ADRENÉRGICOS EN RATAS
SOBRE LA ESTRUCTURA HEPÁTICA
Y LOS PERFILES HORMONALES"**

MEMORIA presentada para la colación del
grado de Doctor, por la Licenciada en
Veterinaria Dña. María del Mar Martínez
Mateos

ESTA TESINA HA SIDO REALIZADA
BAJO LA DIRECCIÓN DE:



Prof. Dr. D. Juan Carlos Illera del Portal

Licenciada Dña. María del Mar Martínez
Mateos, aspirante al grado de Doctor en
Veterinaria.

María del Mar Martínez Mateos

Madrid, Septiembre, 1998

AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis, el Prof. Dr. D. Juan Carlos Illera del Portal, al cual debo todo lo que en la actualidad soy. Su constante apoyo, optimismo, capacidad inmensa de trabajo, y GRANDÍSIMA PACIENCIA, son un estímulo para cualquier persona que se encuentre cerca de él. Es todo un orgullo y un honor, conocer y poder trabajar junto a alguien cuya categoría humana y científica pone el listón muy alto dentro del mundo de la investigación y lo que es más importante, la vida. Muchísimas gracias, de todo corazón, por haberme abierto las puertas de "esta casa", haber soportado todos los malos momentos sufridos a lo largo de este tiempo, y contribuir, en más de un 99,9999...% ($p < 0,001$), a que me sintiese un poquito útil.

Al Prof. Dr. D. Mariano Illera, quien me acercó, al igual que a muchos, al impresionante y fascinante mundo de la Fisiología, ya desde los tiempos de estudiante y posteriormente, cuando tuve la inmensa suerte de entrar en el Departamento. Supone toda una fortuna, contar con tan prestigioso Profesor, cuyo rigor y seriedad científicos, no están reñidos, en absoluto, con una tremenda humanidad que te anima a seguir adelante.

A la Prof. Dra. Dña. Gema Silván Granado, a quien tuve la suerte de conocer mientras estudiábamos Veterinaria, y que me ha honrado durante muchos años con su amistad, apoyo y cariño sinceros, tanto en las "duras" como en las "maduras". Su preocupación ante los problemas que puedan surgir tanto en el ámbito laboral como en el estrictamente privado, la han llevado desde siempre, a ayudar en todo momento a quien lo necesite, y de ésto, puedo dar fé, pues en todos estos años, me ha aguantado más de mil bajones morales, que sin su ayuda no hubiera podido soportar. Mi más sincera admiración y respeto para alguien tan excepcional.

A mis sufridos compañeros y amigos: May, que en más de una ocasión debía haberme mandado a Siberia y por el contrario, me soportó y aguantó hasta lo indecible, ayudándome en todo momento y hasta el final, Pedro (cuidadín), por sus sabios consejos, bromas y constante ayuda, Ana B., compañera de dichas y desdichas del clenbuterol y sin

cuya colaboración y conocimientos, gran parte de esta Tesis no se hubiera podido realizar, Mari Jose, que ya sabe que los PCs me tienen manía y por eso me ha echado MUCHAS MANOS para que todo saliese bien, Luis, por su ayuda tanto en el laboratorio como en la sala de ordenadores y echar la Primitiva (a ver si nos toca), Rosana por su ánimo constante, Ana H., por escuchar en más de una ocasión mis numerosas parrafadas acerca del denbuterol y otras cosas, a M^a José I., por su apoyo y ayuda en todo momento, y, aunque ya no estén en el Dpto. a Ana P. que también aguantó lo suyo y a Alicia. A todos, muchísimas gracias y prometo enmendarme.

A Bene que contempló mis primeros y "alejados" contactos con las ratitas (os podría contar muchas cosas divertidas, ¿verdad?) y a Jesús, que junto con Bene, cuidaron de nuestros animales con la mayor seriedad y responsabilidad que puede desear cualquier investigador, para no encontrarse "sorpresas" de última hora.

A Ana Vicente por su colaboración inicial en el desarrollo de la Microscopía electrónica llevado a cabo en esta Tesis y a las "chicas" (Mar y Raquel) de la Biblioteca de la Facultad de Veterinaria, que me proporcionaron material bibliográfico cuya obtención resultaba casi imposible algunas veces.

Al Dpto. de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos, a cuyo frente se encuentra el Prof. Dr. Sanz Esponera y quien, desde el primer momento, me ofreció su inestimable ayuda poniendo a mi disposición tanto el material técnico como el soporte científico necesario para adquirir los conocimientos suficientes dentro de ese increíble mundo que se ve a micras y nanómetros. También quiero agradecer a Mari Ángeles, eficaz como la primera, su tremenda ayuda en unos momentos especialmente difíciles para mí.

A todos mis amigos (Fede, Esther, Anabel, María José, Asun, Adolfo y un largo etcétera), que se han interesado en todo momento (aunque no tuviesen ni idea del tema) y, entre divertidos y aburridos, medio en broma y medio en serio, siempre me han estado dando "caña" para que no me rindiese.

Por último, permitidme que tenga un especial recuerdo de cariño y agradecimiento inmensos a mi familia: a mis padres, mi hermana Yolanda y mi tía, que, aunque ya no están aquí, siempre estimularon en mí el espíritu de lucha y superación, y el interés y curiosidad por profundizar en el estudio sin darse por vencido, y por supuesto, a mi hermana Merche, con quien "discutir" ciertos temas es siempre positivo y me ha aclarado en numerosas ocasiones cuál era el mejor punto de vista que debía adoptar, así como a Borja, que también ha apoyado y aguantado mis "rollos" durante todo este tiempo.

ACRÓNIMOS

α:	alfa - <i>Alfa</i> (alfabeto griego)
ABTS:	<i>Ácido 2, 2-azino-di (3-etilbenzotiazolino sulfónico)</i>
ACTH:	Adrenocorticotrophic Hormone - <i>Hormona adreno corticotropa</i>
ADN:	Deoxyribonucleic Acid - <i>Ácido desoxirribonucleico</i>
AMP:	Adenosine Monophosphate - <i>Monofosfato de adenosina</i>
AMPC:	Cyclic Adenosine Monophosphate - <i>Monofosfato cíclico de adenosina</i>
ARN:	Ribonucleic Acid - <i>Ácido ribonucleico</i>
ATP:	Adenosine Triphosphate - <i>Trifosfato de adenosina</i>
β:	beta - <i>Beta</i> (alfabeto griego)
BAT:	Brown Adipose Tissue - <i>Tejido adiposo pardo (grasa parda)</i>
BUN:	Blood Urea Nitrogen - <i>Nitrógeno uréico de la sangre</i>
C:	Carbon - <i>Carbono</i>
CBG:	Cortisol-binding Globulin - <i>Globulina portadora de cortisol</i>
COMT:	Catechol-O-Methyl Transferase - <i>Catecol orto metil transferasa</i>
CRH:	Corticotropin-releasing Hormone - <i>Hormona liberadora de corticotropina</i>
CRF:	Corticotropin-releasing Factor - <i>Factor liberador de corticotropina</i>
DES:	Diethylstilbestrol - <i>Dietilestilbestrol</i>
DHEA:	Dihydroepiandrostenodione - <i>Dihidroepiandrostenodiona</i>
EDL:	<i>Extensor digitorum longum</i> - <i>Extensor digital largo</i>
EIA:	Enzyme-immuno Assay - <i>Enzimo inmunoanálisis</i>

ELISA:	Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay - <i>Análisis enzimático ligado a un inmunoabsorbente</i>
esm:	Standard Error - <i>Error estándar de la media</i>
g:	Gram - <i>Gramo</i>
GH:	Growth Hormone - <i>Hormona de crecimiento</i>
GDP:	Difosfato de guanidina
HE:	Hematoxylin- Eosin - <i>Hematoxilina-eosina</i>
HHA:	Hypothalamic-hypophyseal-adrenal - <i>Eje hipotálamo hipófisis adrenales</i>
17β-HOR:	17 β -hidroxiesteroide reductasa
IGF:	Insulin-like Growth Factor - <i>Factor de crecimiento semejante a la insulina</i>
K:	<i>Kalium</i> (Potassium) - <i>Potasio</i>
K_d:	<i>Constante de distribución</i>
kg:	Kilogram - <i>Kilogramo</i>
K_s:	<i>Constante de síntesis</i>
l:	Liter - <i>Litro</i>
LH:	Luteinizing Hormone - <i>Hormona luteinizante</i>
LPL:	Lipoprotein Lipase - <i>Lipoproteína lipasa</i>
μg:	Microgram - <i>Microgramo</i>
μm:	Micrometres - <i>Micrometros</i>
ME:	<i>Microscopía electrónica</i>
mg:	Miligram - <i>Miligramo</i>
ml:	Mililiter - <i>Mililitro</i>

MO:	<i>Microscopía óptica</i>
Na:	<i>Natrium (Sodium) - Sodio</i>
NADG:	<i>Nitro-acetil glucosaminidasa</i>
ng:	<i>Nanogram - Nanogramo</i>
OPD:	<i>Ortofenilén diamina</i>
pg:	<i>Picogram - Picogramo</i>
ppm:	<i>Parts per million - Partes por millón (10^{-6}) (ng/kg)</i>
RNA:	<i>Ribonucleic Acids - Acido ribonucleico</i>
rpm:	<i>Revolutions per Minute - Revoluciones por minuto</i>
SNC:	<i>Central Nervous System - Sistema Nervioso Central</i>
TMB:	<i>Timidil Benzidine - Timidilbencidina</i>
TSH:	<i>Thyroid-stimulating Hormone - Hormona estimulante de la tiroides</i>
TSH-RF:	<i>Thyroid-stimulating Hormone-releasing Factor - Factor liberador de la hormona que estimula la tiroides</i>
U:	<i>Unity - Unidad</i>
UCM:	<i>Universidad Complutense de Madrid</i>
USA:	<i>United States of America - Estados Unidos de América</i>

CONTENIDO

JUSTIFICACIÓN	1-5
INTRODUCCIÓN	6-49
MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANABOLIZANTES	8-11
AGONISTAS BETA-ADRENÉRGICOS	12-15
CLENBUTEROL: CARACTERÍSTICAS GENERALES	16-22
➤ Estructura	
➤ Vía de administración	
➤ Biodisponibilidad	
➤ Carácter β -agonista	
➤ Efectos:	
a.- Efectos terapéuticos	
b.- Efectos metabólicos	
MECANISMO DE ACCIÓN DEL CLENBUTEROL	23-36
* a.- Activación de los receptores adrenérgicos	
* b.- Activación del metabolismo:	
1.- Glúcidos	
2.- Lípidos	
3.- Prótidos	
* c.- Mecanismo de acción a nivel muscular	
➤ Mecanismos directos	
➤ Mecanismos indirectos	
* d.- Mecanismo de actuación en tejido adiposo	

	Contenido
HÍGADO, CLENBUTEROL Y METABOLISMO	37-42
GLUCOCORTICOIDES DE SÍNTESIS: DEXAMETASONA	43-45
ACCIONES PRINCIPALES DE LA DEXAMETASONA	45-47
CLENBUTEROL ASOCIADO A DEXAMETASONA	48-49
MATERIAL Y MÉTODOS	50-85
> Animales	
> Tratamiento	
> Descripción de la fase experimental	
> Sacrificio y obtención de las muestras de los animales	
ANÁLISIS HORMONALES	56-71
DETERMINACIÓN DE CLENBUTEROL	72-74
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	75-75
ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO DEL HÍGADO	76-85
> Microscopía óptica	
> Microscopía electrónica	
RESULTADOS	86-144
Validación de la técnica EIA de Competición en ratas para hormonas esteroides y clenbuterol	87-90
1. Diluciones óptimas de anticuerpo	
2. Diluciones óptimas de conjugado	
3. Trazado de las curvas patrón	
4. Parámetros de validación del EIA de competición	

Ganancia de peso de los animales	91-97
Variaciones del peso del hígado	98-104
Concentraciones de clenbuterol	105-110
Morfometría Hepática	111-112
Estructura y ultraestructura hepáticas	113-118
DETERMINACIONES HORMONALES:	119-144
> Insulina	119-121
> Glucocorticoides: cortisol y corticosterona	122-133
> Esteroides gonadales:	
Progesterona,,17 β -estradiol, Androstenodiona	134-144
DISCUSIÓN	145-181
CONCLUSIONES	182-185
RESUMEN	186-189
BIBLIOGRAFÍA	190-214

JUSTIFICACIÓN

La producción cárnica representa uno de los mayores contingentes mundiales a nivel industrial, ya que la musculatura esquelética de origen animal proporciona el principal recurso energético para la obtención de proteínas de alta calidad.

A nivel de producción cárnica, los ganaderos han ensayado distintas fórmulas cuya finalidad ha consistido en lograr un mayor crecimiento del animal en un plazo de tiempo lo más breve posible, puesto que ello proporciona un considerable ahorro, cuya cuantía económica es al mismo tiempo bastante sustanciosa. La utilización de los agentes promotores del crecimiento representa, dentro de este sector, una doble ventaja: económica y la obtención de canales de mayor calidad y más atractivas para el consumidor. Pero al mismo tiempo, entraña un riesgo, dada la falta de control en cuanto a la aplicación y dosificación de dichas sustancias, llegando en ocasiones a crear serios problemas en el entorno de los consumidores.

La utilización ilegal del clenbuterol en todos los países de la Unión Europea, como agente promotor del crecimiento ha creado una profunda controversia dentro de los sectores de la alimentación y producción animal, dado el carácter fraudulento que entraña esta práctica. Por otra parte, las intoxicaciones diagnosticadas, sobre todo en España e Italia a principios de los 90, en los consumidores de carnes y especialmente, del hígado de los animales tratados con este beta agonista, han supuesto un serio problema tanto desde el punto de vista económico, por las restricciones en cuanto a exportación de productos cárnicos se refiere, como dentro del entorno de la Salud Pública, aún a pesar de que la sintomatología observada, remitiese en un periodo relativamente corto de tiempo y que, por el momento, no ha tenido consecuencias tan graves para la población humana, como el consumo de carne procedente de las tristemente famosas "vacas locas".

Tampoco hemos de olvidar que las sustancias utilizadas, con fines fraudulentos, no suelen ser administradas aisladamente, sino en combinación con otro tipo de fármacos, que bien potencian unas veces, y enmascaran, otras, los efectos producidos. Por ejemplo, la utilización de antibióticos, que *per se* estimulan el engorde, permite utilizar animales cuyo estado sanitario es ejemplar. Si a estos animales, se les administra cualquier anabolizante, el

efecto de engorde será mayor.

El principal objetivo de nuestra experimentación, ha sido el estudio de la administración de clenbuterol, o las asociaciones de éste a glucocorticoides de síntesis y su repercusión sobre el fisiologismo animal a distintas edades, tanto a nivel hepático como sobre los ejes hipotálamo-hipofisario adrenal y gonadal.

En primer lugar, se ha escogido la rata por ser una especie de crecimiento rápido, y por ello, los efectos serán más rápidamente observados, desde el punto de vista de la utilización del clenbuterol como promotor del crecimiento. Además, se ha comprobado que los reodores constituyen una de las especies idóneas para el estudio de los efectos del clenbuterol en virtud de su carácter de agente de reparto. Por otra parte, tendremos una mayor disponibilidad de animales, y ello nos permitirá establecer conclusiones más precisas y aproximadas a lo que ocurre en la vida real.

Elegimos hembras puesto que los tratamientos con clenbuterol dentro del mundo ganadero, han demostrado ser más efectivos que en los machos, desde el punto de vista anabolizante. Asimismo, trabajamos con animales de distintas edades, para ver cómo se alteraban los distintos parámetros analizados.

Los tratamientos a aplicar, han constituido un serio reto para nosotros, tanto en cuanto al ajuste de la dosis, como la duración y el tipo de tratamiento. Por ello, nuestro objetivo en este sentido, ha sido la administración de dos tipos de tratamiento: uno a base de clenbuterol y otro con la asociación de clenbuterol y dexametasona. De esta forma podremos comparar las distintas repercusiones que tendrá cada uno de ellos, sobre los animales y ver cual dispondrá de mayor efectividad para la consecución de nuestro fin.

En cuanto a la duración del tratamiento, creímos oportuno que ésta fuera lo más parecida a la aplicada a los animales de abasto, con los periodos de supresión correspondientes, aunque bien es cierto, que "tanteando", puesto que al estar prohibida la

utilización de cualquier sustancia como favorecedor del engorde, era difícil encontrar información aclaratoria. Por ello, aplicamos tratamientos de larga duración, para poder, así, contemplar la evolución en las distintas fases del mismo.

Dado que el consumo de hígado, procedente de animales tratados con clenbuterol, ha sido el "responsable" de la polémica suscitada en torno a este tema, uno de nuestros principales objetivos consistió en llevar a cabo un profundo estudio de la estructura hepática y comprobar si el clenbuterol, al quedar acumulado en esta víscera, era capaz de alterar la misma, con lo cual demostraríamos si ese posible efecto hepatotóxico se debe al clenbuterol o a otras sustancias, pues no hemos de olvidar, que en las prácticas fraudulentas de engorde de los animales de abasto se emplean auténticos "cócteles" a base de hormonas anabolizantes, antibióticos, glucocorticoides, etc.

Basándonos en la bibliografía consultada y dada la carencia de información al respecto, hemos utilizado dosis considerablemente superiores a las administradas al ganado vacuno y otras especies, de tal manera que deseábamos producir lesiones en este órgano, llevando a cabo, el estudio anatomopatológico (tanto estructural como ultraestructuralmente) del hígado de nuestros animales, en distintas fases del tratamiento. De este modo, en caso afirmativo, podríamos comprobar exactamente en qué momento y medida el clenbuterol llega a ser hepatotóxico, tanto durante la administración como en la retirada del medicamento.

Para que este estudio fuera más exhaustivo, otro de nuestros objetivos consistió en determinar las concentraciones, tanto plasmáticas como hepáticas, de clenbuterol. De este modo, conociendo la cantidad del fármaco distribuido a nivel sistémico y la encontrada en hígado, el estudio histológico realizado, nos permitiría conocer con precisión, la cantidad de clenbuterol necesaria para producir una lesión en esa víscera.

Asimismo, y dada la importancia que representa la utilización del clenbuterol en lo que a modificación del metabolismo se refiere, estudiamos el carácter anabolizante de este compuesto, midiendo la ganancia de peso y los niveles de insulina alcanzados por los animales,

tanto en adultos como en prepúberes, que terminaban la fase experimental siendo adultos. No hemos de olvidar que el crecimiento en los animales jóvenes es superior al de los adultos, y de este modo comprobaríamos la eficacia que aporta el clenbuterol, lo cual también nos orientaría hacia las consideraciones zootécnicas de su utilización.

Para finalizar, otro objetivo que nos propusimos desarrollar fue el de determinar las alteraciones que el clenbuterol, un potente estimulante del Sistema Adrenérgico, pueda llevar a cabo sobre los ejes hipotalamo-hipofisario-adrenal e hipotalamo-hipofisario-gonadal, mediante el estudio de las concentraciones hormonales.

A la vista de los resultados que encontraríamos, intentaríamos determinar si la rata (estirpe Long Evans) puede considerarse como un biomodelo ideal para el estudio de los beta-adrenérgicos y sus asociaciones a glucocorticoides de síntesis.

INTRODUCCIÓN

En la producción ganadera se utilizan ilegalmente diferentes compuestos con la finalidad de lograr un mayor crecimiento del animal, en el menor tiempo posible, amén del ahorro económico que ello representa. Sustancias como estrógenos, andrógenos, beta agonistas o glucocorticoides son utilizados con estos fines. Su administración, da lugar a un mayor aumento de peso, en periodos cortos de tiempo, tanto si son aplicados aisladamente o en forma combinada, potenciando los efectos de unos y otros (Lommen *et al.*, 1993). Todos ellos y otras sustancias más, se engloban dentro del grupo de los **anabolizantes**.

Podríamos definir a los anabolizantes, como sustancias capaces de producir un aumento de peso, con la intención de alcanzar más rápidamente el peso deseado del animal con la misma cantidad de pienso, estimulando su anabolismo proteico en detrimento de los anabolismos lipídico y glucídico (Marcos *et al.*, 1989). En un sentido amplio de la palabra, se definen, como: "toda sustancia o compuesto capaz de favorecer los procesos de síntesis (anabolismo) a expensas de disminuir los procesos de destrucción, de los diferentes componentes de los organismos animales".

En 1978, Hoffman clasificó a los anabolizantes desde dos puntos de vista:

☞ Según su actividad biológica:

- * Estrógenicos
- * Androgénicos
- * Progestágenos

☞ Según su estructura:

- * Esteroides naturales
- * Esteroides sintéticos
- * Compuestos no esteroideos

Para una mejor comprensión de sus efectos, y una vez establecida su clasificación, pasaremos a resumir brevemente el mecanismo de acción de los anabolizantes.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANABOLIZANTES

El mecanismo de acción de estas sustancias es variable dependiendo de los distintos tipos hormonales considerados, pero desde el punto de vista bioquímico, todas ellas coinciden ya que los anabolizantes se caracterizan por fijarse y penetrar en las células, donde actúan directa o indirectamente a través de distintas biotransformaciones (Baulieu, 1992). El resultado final consiste en la liberación del ADN nuclear y su posterior transcripción por la ARN polimerasa, transformándose en ARN mensajero, que va hacia el citoplasma, donde se fija a los ribosomas e induce la síntesis de proteínas codificadas por la porción de ADN liberada.

* Los **andrógenos** son sintetizados bien mediante transformaciones metabólicas periféricas, o a nivel glandular en:

- * testículo (células de Leydig)
- * ovario (estroma de las células intersticiales)
- * glándula adrenal (corteza)
- * placenta

Posteriormente, los andrógenos son transportados por la sangre hasta las células efectoras, libres o unidos a proteínas específicas que, a su vez, facilitan y posibilitan la entrada de la hormona en las mismas. Los andrógenos actúan directamente sobre las fibras musculares (Sanz Pérez, 1995), uniéndose a receptores específicos, que reconocen la molécula activa y permiten su penetración, dando lugar a un incremento en la síntesis proteica de la fibra muscular (Woodman, 1997). Entre los andrógenos anabolizantes más



Figura 1

utilizados hemos de destacar la testosterona (véase figura 1) y sus ésteres, como esteroides naturales, o el acetato de trenbolona, melengestrol o zeranol como esteroides de síntesis (xenobióticos no estilbénicos).

* Los **estrógenos** actúan directamente, sobre el hígado, estimulando la biosíntesis de las proteínas plasmáticas sintetizadas por aquel y sobre las fibras musculares, al igual que los andrógenos, pero uniéndose más débilmente a los receptores.

Indirectamente, actúan a distintos niveles glandulares:

- # Sobre el lóbulo anterior de la hipófisis aumentando la secreción de la hormona del crecimiento.
- # En el páncreas estimulando la secreción de insulina, por parte de los islotes de Langerhans.
- # En la glándula tiroidea disminuyendo, momentáneamente los niveles de tiroxina circulante.

Entre los estrógenos más utilizados (Sanz Pérez, 1995), cabe mencionar los de tipo

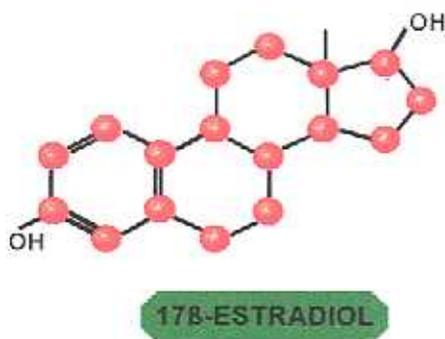


Figura 2

natural, como son el 17 β -estradiol y sus ésteres (véase figura 2), y los de síntesis, derivados del estilbeno, como son el dietil estilbestrol (DES), hexestrol o dinestrol. Los de origen natural son sintetizados primordialmente en ovario, pero también se pueden obtener a partir de testículo, placenta y adrenales o del mismo modo que los andrógenos, a través de transformaciones metabólicas periféricas.

Los **progestágenos**, cuyo principal representante es la progesterona (véase figura 3), sintetizada principalmente en ovario y placenta, pero obtenida secundariamente también a partir del testículo y adrenales, tienen un mecanismo de actuación más desconocido, aunque



Figura 3

se cree que se fijan directamente sobre los receptores celulares de los andrógenos, potenciando la acción de aquellos. Estimulan la actividad de la lipoproteína lipasa y parecen aumentar el depósito de lípidos. Reducen las acciones de la aldosterona en los túbulos renales y originan un descenso en la retención de sodio, que puede aumentar la secreción de mineralocorticoides a partir de la corteza adrenal (Williams y Stancel, 1996).

Otras sustancias, utilizadas con fines anabolizantes, son los **antitiroideos** o finalizadores cárnicos (Sanz Pérez, 1995), cuyo mecanismo de acción se basa en inhibir la síntesis de tiroxina mediante el bloqueo de la función tiroidea, por lo que se produce hiperplasia de la tiroides, edemas subcutáneos, mixedema, aumento de peso y debilidad cardíaca en los animales tratados con estas sustancias. Los derivados más utilizados, y cuyo uso en España está prohibido, son:

- tiocianatos o sulfocianuros.
- tionamidas o tioureas.

* Por último, conviene resaltar el empleo de **antibióticos y coccidiostáticos** como promotores del crecimiento (Edwards, 1986), ejerciendo su actividad fundamentalmente a nivel gastrointestinal bajo tres puntos de vista:

- Modificando el desarrollo o el metabolismo de la flora intestinal bacteriana.
- Reduciendo la producción de toxinas microbianas o metabolitos

tóxicos que pueden causar efectos adversos en el intestino.

☞ Suprimiendo enfermedades subclínicas.

Si bien todas estas sustancias anabolizantes producen una notable mejoría sobre el crecimiento del animal, son potencialmente peligrosas para la salud de los consumidores (Thein *et al.*, 1995; Maghuin-Rogister, 1995), fundamentalmente, por los residuos de las mismas procedentes de su metabolización, pudiendo quedar acantonadas en distintos órganos de los animales, que posteriormente serán consumidos por el hombre.

Experimentalmente, se ha comprobado que su implantación, en animales de laboratorio, también ha producido lesiones de distinta importancia, tales como tumores uterinos, adeno carcinoma de próstata, cáncer de vejiga, exacerbación de cáncer de mama y próstata y virilización de las hembras, en el periodo fetal y lactante. En el caso de los progestágenos, se han observado tumores ováricos.

Por este motivo y a raíz de la prohibición de los anteriores, una de las pautas que se ha seguido con mayor frecuencia en los últimos años, sobre todo hacia finales de los 80, en la línea de aumentar el crecimiento y producción animal ha sido el empleo de los **agonistas beta adrenérgicos**, como agentes promotores del crecimiento (Fiems *et al.*, 1995).

AGONISTAS BETA-ADRENÉRGICOS

Un **agonista**, es un compuesto que ocupa un receptor e imita la actividad de un mediador biológico natural, generalmente de una forma mucho más potente que el mediador endógeno (Stiles *et al.*, 1984). En el caso de los receptores adrenérgicos, la acción de los agonistas se encuentra relacionada con la epinefrina y norepinefrina, presentando además una fórmula química muy similar a la epinefrina (Fiems, 1987) (véase figura 4).

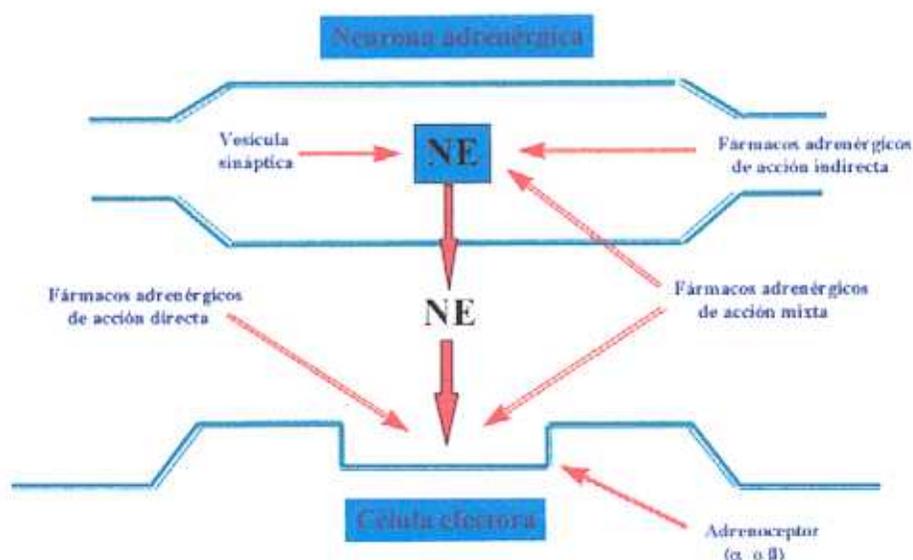


Figura 4

Los receptores adrenérgicos son estructuras macromoleculares localizadas en el interior o sobre la membrana superficial de las células inervadas por neuronas adrenérgicas y ciertas células no inervadas, cuya función fisiológica consiste en reconocer e interactuar con los mediadores adrenérgicos endógenos, epinefrina y norepinefrina y que, mediante una compleja serie de reacciones intracelulares, alteran la actividad de la célula efectora, provocando respuestas excitatorias, en algunos casos, o inhibitorias en otros.

En 1948, Ahlquist distinguió dos tipos de receptores: α y β , que a su vez se clasifican en varios subtipos (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 y β_3), (Lands *et al.*, 1967; Fain y Gracia Sáinz, 1983; McNeel y Mersmann, 1995) cuya distribución y proporción son variables según el tejido y especie

considerados (Mersmann, 1998).

La clasificación propuesta por Lands *et al.* (1967), se basó en la actividad de las aminas simpaticomiméticas frente a la movilización de los ácidos grasos en el tejido adiposo de la rata, estimulación cardíaca en conejos, broncodilatación en cobaya y vasodilatación en perro (véase figura 5).

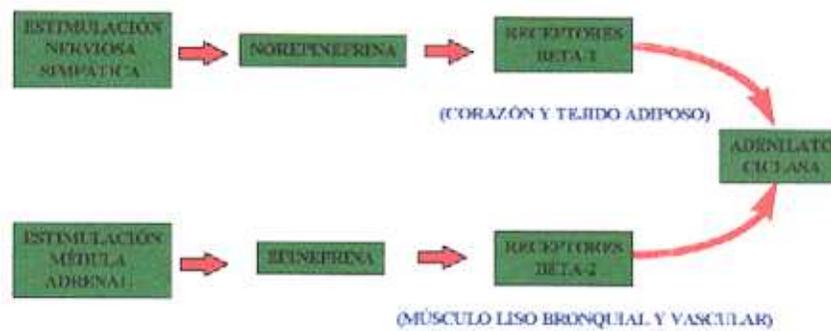


Figura 5

Los receptores β_1 se localizan en corazón e intestino y con respecto al metabolismo, tanto su estimulación como inhibición están relacionadas con la lipólisis, mientras que la de los β_2 ejercen sus efectos sobre la musculatura lisa, glucogenólisis y glicólisis (Ahren y Lundquist, 1981) (véase figura 6).

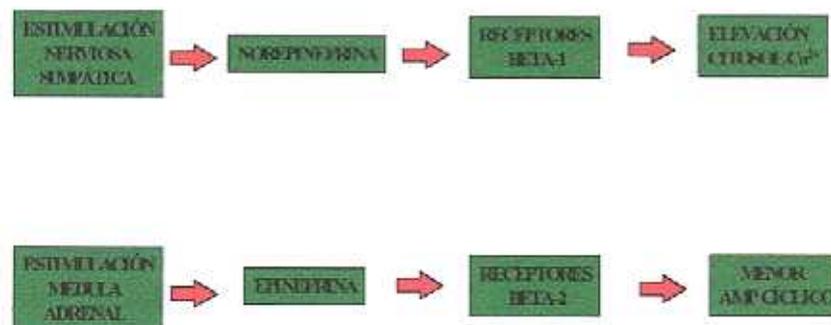


Figura 6

Por lo que se refiere al papel anabolizante de los agonistas, nos interesan los agonistas β_2 -adrenérgicos, ya que los efectos β están asociados a un incremento del AMP cíclico y a la

activación de la glucogénesis hepática. Son los responsables del incremento proteico a expensas del contenido de grasa (Del Barrio *et al*, 1995). Entre los más utilizados, como promotores del crecimiento, se encuentran el clenbuterol y el cimaterol, menos el salbutamol y últimamente ha empezado a utilizarse la ractopamina (véase figura 7).

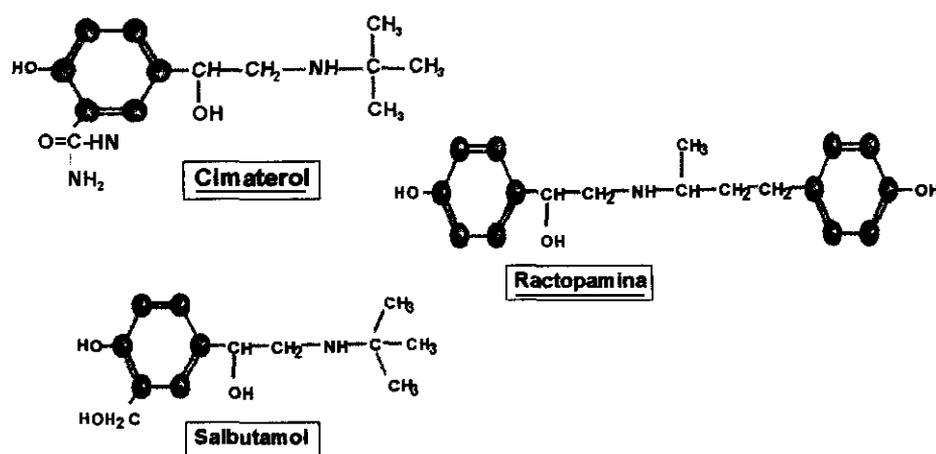


Figura 7

El clenbuterol, junto con otros β_2 -agonistas (Lommen y Groot, 1993), se ha venido utilizando como agente de reparto para mejorar el rendimiento de los animales destinados a la producción cárnica. Administrado a dosis elevadas produce un incremento en la síntesis proteica y una reducción en la deposición de grasa estimulando, de este modo, el crecimiento de la masa muscular. Sin embargo, la falta de información acerca del metabolismo y distribución de esta sustancia en los animales destinados a la producción de alimentos, así como el posible peligro potencial que el depósito de sus residuos en los tejidos comestibles pueda representar para los consumidores, ha llevado a las autoridades sanitarias de numerosos países a considerar el uso de este fármaco, ilegal, en tanto en cuanto no estén suficientemente aclaradas las dudas al respecto (Reeds *et al.*, 1988; Re *et al.*, 1993; Directiva 96/22/CE del Consejo de la Unión Europea; Kuiper *et al.*, 1998; Mitchell y Dunnavan, 1998).

El clenbuterol es un agonista β_2 específico que posee acciones anabolizantes en un gran número de especies, incluida la humana.

El incremento producido sobre el crecimiento muscular, visto en numerosas especies tratadas con este compuesto, sugiere que las nuevas tecnologías basadas en la manipulación del sistema adrenérgico, pueden resultar de gran utilidad en relación al objetivo de incrementar la eficacia de los niveles de producción del ganado estabulado (Belhansen y Deshaies, 1992).

CLENBUTEROL: CARACTERÍSTICAS GENERALES

⇒ Estructura

Químicamente, el clenbuterol es una feniletanolamina sustituida, cuya fórmula es 4-amino-3,5-dicloro- α ((1,1-dimetil) metil)-3,5-diclorobenzil alcohol) (véase figura 8).

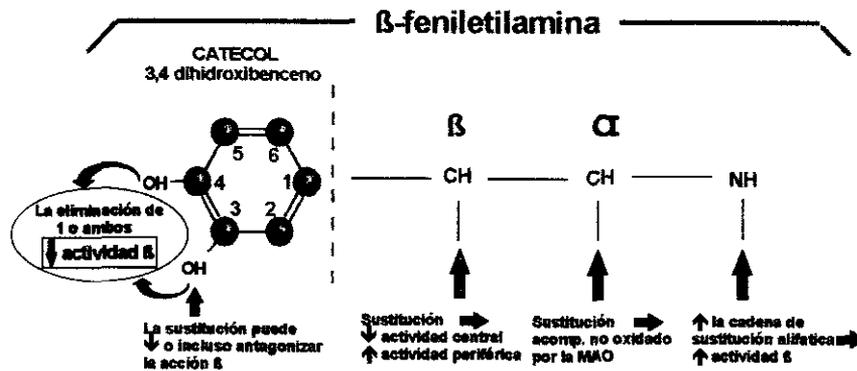


Figura 8

Como todo β -agonista, su estructura es similar a la de las aminas simpaticomiméticas. Pertenece al grupo de las ariletanolaminas, con una gran semejanza a la epinefrina, ya que posee una estructura beta-fenil-etanol-amina (Sanz Pérez, 1995), y dependiendo de los radicales que ocupen las posiciones 3, 4 y 5 del anillo aromático y de los radicales de la cadena lateral, se originan nuevos compuestos como carbuterol, salmeterol, cimaterol, mabuterol, clenbuterol etc... (Illera, 1993).

⇒ Vía de administración:

En la práctica clínica, el clenbuterol, al igual que otros β_2 agonistas, puede ser administrado mediante inhalación directa al pulmón (a través de aerosoles o nebulizadores), inyectado (subcutánea, intramuscular o endovenosamente) o por vía oral, dependiendo, su biodisponibilidad de la vía empleada (Morgan, 1990) (véase figura 9).

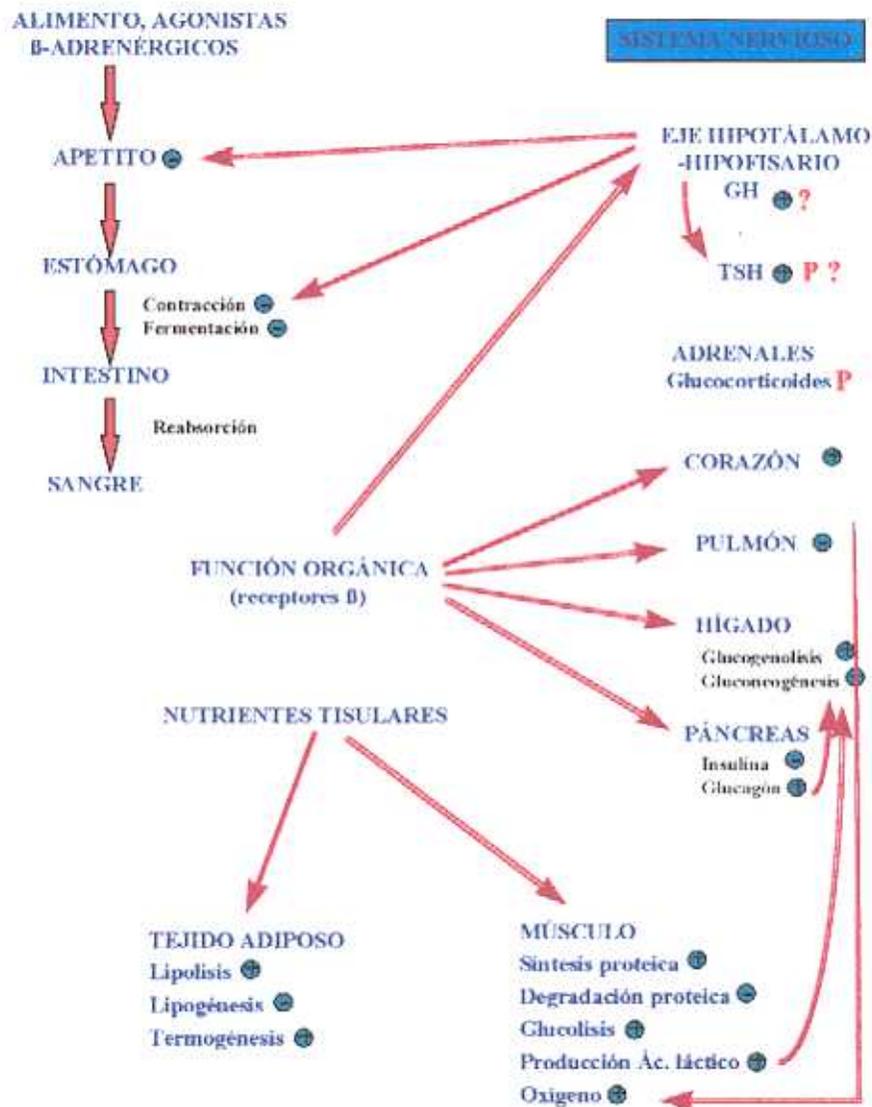


Figura 9

En contraste con otros β -agonistas, el clenbuterol es efectivo al ser administrado por vía oral, puesto que su estructura clorada (Moore *et al.*, 1994) le confiere una mayor resistencia al metabolismo de la catecol-oxi-metil-transferasa (COMT) y por tanto la duración de su efecto es mayor, aproximadamente de 34-35 horas (Carter y Lynch, 1994).

Los catecoles rápidamente, sufren una oxi-metilación, ya que constituyen buenos sustratos de la enzima COMT. Estos agentes con un grupo hidroxilo-fenólico son metabolizados rápidamente a un conjugado esterificado oxi-sulfatado. De esta manera, al sustituir los grupos hidroxilo-fenólicos por 3,5-dicloro-amino se obtiene el clenbuterol, que

presenta gran resistencia a la sulfatación. Debido a estas modificaciones posee una mayor biodisponibilidad sistémica, un aclaramiento metabólico más bajo y una vida media más larga, por lo que es más recomendable, que en el caso de otros compuestos, la vía oral para su utilización (Morgan, 1990).

Al ser administrado por vía oral, produce un incremento de:

- ✦ la ganancia de peso corporal
- ✦ síntesis proteica
- ✦ masa muscular

⇒ **Biodisponibilidad:**

La absorción depende de la vía de administración. Por vía oral, la absorción es rápida, alcanzándose los mayores niveles plasmáticos entre la 1ª y 3ª hora, debido a la gran sulfatación que experimenta en hígado e intestino delgado. Por vía subcutánea o intramuscular, es mucho más rápida, alcanzándose las máximas concentraciones dentro de los 15-30 primeros minutos, pero como contrapartida, la duración de su efecto es menor (Morgan, 1990; Moore *et al.*, 1994).

El metabolito del clenbuterol que se encuentra en mayor proporción y obtenido a partir de la fracción microsomal hepática, es la hidroxilamina del clenbuterol. Estudios recientes (Zalco *et al.*, 1998), han demostrado que en ganado bovino se ha detectado además, otro metabolito, el ácido 4 amino- 3,5 dicloro benzoico, cuyo conjugado glicínico, el ácido 4 amino 3,5 diclorohipúrico ha aparecido también en hepatocitos de rata.

Posteriormente, se elimina en forma de metabolitos conjugados sulfatados (Taburet y Schmit, 1994), a través de la orina.

☛ Carácter β -agonista

El clenbuterol, es un agonista parcial, que posee una alta afinidad por los receptores β_2 y más moderada por los β_1 (Waldeck y Widmark, 1985). Posee efectos broncodilatadores y, curiosamente una relativa eficacia en la activación de los receptores β_1 y β_2 venosos o cardiacos. Ésto se demuestra porque con respecto al aumento de la frecuencia cardíaca, es menos potente que el isoproterenol alcanzando tan sólo un 45% del máximo incremento producido por éste (Hoey *et al.*, 1995).

Parece ejercer efectos β_1 y β_2 agonistas, cuyo resultado es la estimulación cardíaca al actuar como agonista β_1 y vasodilatación si lo hace como β_2 (Brockway *et al.*, 1987). La alta potencialidad agonista es el resultado de la elevada afinidad por los beta-receptores debido a su eficacia para estimular los mismos (Lafontan *et al.*, 1988).

Distintos estudios han demostrado que el clenbuterol, tras su administración sistémica, atraviesa la barrera hematoencefálica (Dooley y O'Donnell, 1985), ejerciendo sus efectos, directamente, sobre el sistema nervioso central, actuando sobre el comportamiento al estar mediados ciertos efectos por los receptores β -adrenérgicos. Así, por ejemplo, el clenbuterol, reduce la actividad locomotora, suprime la ingesta de comida y disminuye la capacidad de respuesta refleja en las ratas (McElroy y O'Donnell, 1988).

Los efectos promotores del crecimiento ejercidos por el clenbuterol, están fuertemente mediatizados por la estimulación directa de los receptores β_2 , localizados en el tejido muscular y, también, indirectamente por las variaciones de las concentraciones plasmáticas de hormonas catabólicas o anabólicas como puede ser el caso de los glucocorticoides, hormona del crecimiento o 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 beta 2 exógenos (Sillence *et al.*, 1995).

⇒ Efectos

Los efectos producidos tras la administración de clenbuterol, orientan su aplicación en torno a dos vertientes concretas y determinadas:

‣‣‣ Terapéuticas

‣‣‣ Metabólicas

a.- Efectos terapéuticos

* Su aplicación más frecuente en este ámbito, le ha situado como **agente broncodilatador** tanto en Medicina Humana como Veterinaria (Martínez Navarro, 1990), lo que ha sido aprovechado para el tratamiento del asma (Masnatta y Rubio, 1992; Drennan y Yong, 1994) y otras enfermedades respiratorias de tipo obstructivo, ya que relaja la musculatura lisa bronquial y disminuye la resistencia de la vía aérea (Pascual *et al.*, 1994).

* Otra de las aplicaciones para las que, tradicionalmente, se ha venido empleando es como **agente tocolítico**, en virtud de su capacidad para relajar la musculatura lisa. Ello se aprovecha, fundamentalmente en ganado vacuno, ya que al actuar como miorrelejante uterino, se logran evitar partos prematuros (Brocway *et al.*, 1987; Re *et al.*, 1993).

* **Estimulante cardiaco**, por sus efectos cronotrópico e inotrópico positivos, lo que resulta de gran utilidad en tratamientos de urgencia de bradicardias producidas por bloqueo cardiaco o cuando es necesario aumentar la contractilidad miocárdica (Hughes *et al.*, 1983).

* Tratamiento de varios **procesos degenerativos**, como se ha demostrado en modelos animales de desnutrición o caquexia, que inevitablemente lleva aparejado todo proceso tumoral (Bates y Pell, 1991). Estudios practicados sobre ratas a las que se les induce cierto tipo de tumores y se administra clenbuterol, asociado a agentes que actúan sobre el proceso de replicación canceroso, demuestran que los efectos anabólicos del clenbuterol preservan la masa

muscular y el contenido proteico, traduciéndose en una reducción del crecimiento del tumor (Hollenga *et al.*, 1990).

* Tratamiento de enfermedades que van asociadas a un catabolismo muy elevado, como es el caso de **grandes quemaduras, diabetes o denervación muscular** (Chance *et al.*, 1991).

* Retrasa la **atrofia** producida en ciertas lesiones musculares, como distrofias o atrofas debidas a la no movilización de los miembros. Así, en ratas, cuya musculatura esquelética ha sido sometida a distintos procesos de denervación, se puede poner de manifiesto este hecho, lo que puede ser fácilmente demostrable mediante las medidas del peso húmedo y contenido proteico muscular (Pullar y Webster, 1977). El efecto ejercido por el clenbuterol sobre la síntesis proteica, en los casos de atrofia muscular, puede ser debido, bien a posibles cambios en la capacidad del ARN en todo el músculo o sobre un nivel específico del m-ARN, (Babij y Booth, 1988), o al fenómeno combinado de la reducción de la constante de degradación proteica (K_d) e incremento de la constante de síntesis proteica (K_s), debido a la acción anabolizante que ejerce el clenbuterol en el músculo inervado, lo que conduce a la hipertrofia de las fibras (Choo *et al.*, 1990; Mantle *et al.*, 1992).

* Como **coadyuvante** en el empleo de los **agentes antiobesidad**, ya que además de incrementar el índice metabólico, también estimula la síntesis proteica, lo que puede ayudar a prevenir la pérdida de masa magra corporal, asociada a la reducción de peso (Emery *et al.*, 1984). Los compuestos que tienen propiedades de lipomovilización, poseen un efecto "antiobesidad" en roedores genéticamente obesos (rat fa/fa, souris ob/ob). El clenbuterol actúa sobre las reservas lipídicas de los animales, al asociar sus efectos lipolíticos y antilipogénicos, lo que conduce a un desequilibrio, responsable de la creación de un determinado nivel de tejido adiposo y la reducción de la síntesis de ácidos grasos, permitiendo una reorientación de los glúcidos hacia el músculo (Lafontan *et al.*, 1988).

b.- Efectos metabólicos

Los efectos metabólicos están relacionados con la concentración tisular de Adenosín monofosfato cíclico (AMPc). A nivel muscular y hepático, la conversión de Adenosín trifosfato (ATP) en AMPc se produce de manera acelerada al igual que la activación de distintas enzimas, fundamentalmente de tipo fosforilasa, que catalizan la transformación de glucógeno en glucosa, aunque también están implicadas otras, como proteínquinasas, lipasas y fosfofructoquinasas. De esta manera, se produce una aceleración de la movilización de los ácidos grasos, formándose ácido láctico en sangre, hígado y musculatura esquelética (Both, 1988).

También muestra una tendencia especial hacia el incremento de la lipólisis y/o descenso de la lipogénesis (Del Barrio *et al.*, 1991). En los tejidos adiposo y muscular, es el responsable de que los nutrientes sean dirigidos fuera de los depósitos grasos hacia la formación de proteínas (Martínez *et al.*, 1991), que contribuyen a la formación de musculatura al utilizarse las cadenas carbonatadas de los ácidos grasos libres, en la formación de aminoácidos (Sanz Pérez, 1995).

El coste energético de los depósitos grasos y proteicos es el resultado del incremento producido por la energía proporcionada por el alimento, que se conoce comunmente como la energía metabolizable que se requiere para producir un incremento determinado en la grasa o proteínas corporales. El de los depósitos de grasa se puede medir fácilmente en animales adultos ya que, en estos casos, la retención de energía en forma de proteínas es menor y el porcentaje de la energía metabolizable requerida para mantener el balance energético ("requerimiento de mantenimiento") no difiere mucho de las medidas sucesivas realizadas sobre la producción de calor metabólico, a los distintos niveles de la energía metabolizable ingerida (Pullar y Webster, 1977). Sin embargo, el de los depósitos proteicos no resulta tan sencillo de valorar, ya que en comparación con las grasas, éste se produce en menor cuantía.

MECANISMO DE ACCIÓN DEL CLENBUTEROL

Los pequeños roedores de laboratorio (rata y ratón) constituyen los mejores modelos experimentales para el estudio de los mecanismos de acción de los β_2 -agonistas, como agentes de reparto, debido a la existencia del tejido adiposo pardo (BAT) o grasa parda, en una mayor proporción que en el resto de las especies. Este tejido es morfológica y funcionalmente distinto al tejido adiposo blanco, ya que está más vascularizado e innervado (Yang y McElligot, 1989). Posee receptores β_1 y β_2 , éstos últimos en mayor proporción y, en roedores, juega un papel fundamental en la termogénesis, fenómeno, que como veremos posteriormente, está íntimamente ligado al consumo o ahorro de energía, según sea o no estimulada adrenérgicamente. En las especies que posean poco o nada de grasa parda, los factores de reparto permiten, probablemente, una mayor utilización de la energía disponible para aumentar el incremento de las proteínas a nivel muscular (Lafontan *et al.*, 1988).

Aunque básicamente, todas las teorías propuestas por los distintos autores coinciden en lo referente a los efectos producidos por el clenbuterol, no ocurre lo mismo con respecto a los diferentes mecanismos por los que son llevadas a cabo dichas acciones, pudiendo afirmar que todavía no son bien conocidos. Mientras que sus propiedades farmacológicas justifican de una manera clara y evidente su aplicación en Terapéutica, tanto Humana como Veterinaria, no sucede igual con respecto al papel que desempeñan en el conjunto de procesos implicados en las distintas fases del metabolismo.

Podríamos comprender mejor el mecanismo de acción del clenbuterol, si estudiamos, por separado, los complejos fenómenos que se desarrollan para llevar a cabo su actividad. Así estructuraríamos la funcionalidad de este β -agonista en dos vertientes claramente definidas:

- a.- Activación de los receptores adrenérgicos
- b.- Activación del metabolismo:

- Lípidos
- Prótidos
- Glúcidos

Por último, nos centraremos, en las repercusiones que todos estos fenómenos tienen lugar a nivel de dos tejidos, cuya consideración es imprescindible, a la hora de evaluar su efectividad:

- c.- Tejido muscular
- d.- Tejido adiposo

a.- Activación de los receptores adrenérgicos

Los β -agonistas son los responsables de los efectos lipolítico e inotrópico positivos, al actuar sobre los receptores β_1 y de la estimulación de la glucogenolisis y de la relajación de los músculos lisos, bronquios, vasos sanguíneos, vías génitourinarias y gastrointestinales cuando lo hacen sobre los receptores β_2 .

La selectividad tisular por el incremento de potasio, como respuesta a los agonistas adrenérgicos, es de especial interés ya que los tratamientos prolongados con agonistas del tipo β_2 , como es el caso del clenbuterol, producen un incremento de los depósitos proteicos en la musculatura esquelética, pero no en otros órganos o en otros tejidos. Es evidente que el tratamiento con clenbuterol incrementa la síntesis proteica muscular y disminuye la degradación proteica también a nivel muscular (Cardoso y Stock, 1998), pero los mecanismos de unión que estimulan los receptores β -adrenérgicos para cualquiera de estos procesos son por el momento, desconocidos (Mersmann, 1998). Se ha sugerido la existencia de una vía humoral intermediaria, pero también ha sido completamente descartada, aceptándose como la más probable, la estimulación directa sobre el músculo esquelético, que es el tejido efector. Esto sugiere que los post-receptores de la musculatura esquelética, difieren de los receptores β en

otros tejidos o que el clenbuterol activa un receptor atípico ligado al recambio proteico que sólo aparece en musculatura esquelética. Sin embargo, ya que el músculo esquelético juega un papel dominante en la respuesta de hipokalemia a los agonistas β_2 selectivos, es posible que los efectos selectivos del clenbuterol y de otros agentes similares en el incremento proteico de la musculatura esquelética, tengan algo que ver con la activación de la Na-K-ATPasa y los posteriores cambios del sodio y potasio intracelulares (Cartaña y Stock, 1995).

La autorregulación de los receptores β_2 adrenérgicos, durante el tratamiento prolongado con clenbuterol, es la responsable de atenuar y limitar la respuesta trófica del músculo esquelético. Ciertos autores (Cartaña *et al.*, 1994) afirman que este proceso tiene lugar entre los días 10 y 15 de su administración aunque el contenido de glucógeno del músculo, que es indicativo de una glucogenolisis β_2 mediada, se reduce significativamente después de 10 días de alimentación con clenbuterol, sin que ello suponga la existencia de alteraciones funcionales por parte de los receptores responsables.

Es probable que el clenbuterol, al igual que isoprenalina y epinefrina, estimulen los receptores beta musculares, incrementándose por ello la actividad de la adenilato-ciclasa con la consiguiente elevación de la concentración de AMPc. El incremento del AMPc podría activar la proteína-quinasa, AMPc-dependiente, produciéndose alteraciones en la fosforilación realizada por la glucógeno sintetasa y fosforilasa, de tal manera que se ve acelerada la glucogenolisis y descende la síntesis de glucógeno resultante (MacLennan y Edwards, 1989).

b.- Activación del metabolismo

Sobre el metabolismo, como mencionábamos anteriormente, podríamos establecer distintos apartados:

1.- Glúcidos

Mediante la desintegración a nivel hepático de los depósitos de glucógeno por

activación de la fosfatasa, dando lugar a una glucogenolisis rápida en el tejido muscular, a través de la degradación del glucógeno a glucosa y de ésta a ácido láctico.

El tratamiento con clenbuterol, aparentemente, fuerza al organismo, para seleccionar los precursores gluconeogénicos a partir de otros recursos, que no sea el propio músculo, obteniéndolos, posiblemente a partir de los depósitos grasos (Chance *et al.*, 1991).

2.- Grasas

He aquí la mayor dificultad a la hora de establecer criterios comunes, ya que sus efectos son difíciles de definir, puesto que:

- ⇒ Por una parte actúa indirectamente en la deposición de la grasa al aumentar el índice metabólico y el gasto energético.
- ⇒ Parte de la energía ingerida se disipa con la termogénesis con lo que se evita la formación de grasas (Pessin *et al.*, 1983).
- ⇒ Se produce un aumento de la lipólisis, que se puede medir por la liberación de glicerol (se elevan los lípidos totales y triglicéridos en sangre) y una disminución de la lipogénesis.

La importancia relativa de estos efectos es difícil de cuantificar ya que se producen variaciones notables según se trate de pruebas *in vivo* o *in vitro*, dosis, especie animal y vía de administración de dicho agonista (Peterla y Scanes, 1990).

3.- Proteínas

Aunque el clenbuterol produce un aumento de la masa muscular y el contenido proteico, no está lo suficientemente demostrado si ello es debido a un incremento de la síntesis

proteica o a una disminución en su degradación. Ciertos autores (Emery *et al.*, 1984; Quirke *et al.*, 1986; Williams, 1987) han observado que el incremento de la masa muscular se produce por incrementar la síntesis proteica. En otros casos, no se ha hallado este efecto en músculos como, gastronemios, sóleos, plantares y extensor largo del pie (EDL). De aquí dedujeron que la respuesta anabólica se debía al descenso de la degradación proteica y no al incremento de su síntesis.

Estudios realizados *in vitro* (Chance *et al.*, 1991) demuestran que se produce un descenso de la concentración muscular y de la liberación de 3-metilhistidina de los músculos de rata tratadas con clenbuterol y privadas de comida. Estos resultados sugieren que la degradación proteica de las miofibrillas se reduce específicamente, después del tratamiento de ratas sometidas a situaciones donde se produce un elevado catabolismo. Esta reducción en la degradación de actina y miosina puede ser la causa principal del ahorro muscular observado. Otros autores (Stanton *et al.*, 1969; Deshaies *et al.*, 1981; Rothwell *et al.*, 1987) han informado acerca de una inhibición (mediada por los receptores β) de los aminoácidos (alanina y glutamina) liberados del músculo esquelético, incubado *in vitro*, y puede que ésto sea debido al incremento de la síntesis proteica o a la disminución de la proteólisis, o quizá a la acción conjunta de ambos procesos.

In vivo, el efecto más espectacular y persistente que se ha observado es un considerable aumento en la retención de nitrógeno, que se detecta cuantificando la excreción de creatinina. Ésto se observa en las fibras con menor metabolismo oxidativo, mientras que en piel, intestino y otros órganos internos se produce el fenómeno contrario. Estos hechos han sido confirmados en rata, donde se ha visto que se produce un estímulo de la síntesis proteica (Emery *et al.*, 1984). Algunos autores atribuyen el crecimiento muscular a la disminución de la tasa de nitrógeno ureico en sangre (BUN), lo que es sugestivo de una reducción del catabolismo proteico (Martineau *et al.*, 1993).

Los incrementos metabólicos, originados como consecuencia de la degradación proteica, han sido observados cuando se alcanza el crecimiento después de estados de

malnutrición y durante la hipertrofia muscular inducida por el estiramiento (Emery *et al.*, 1984).

El clenbuterol no es una sustancia que lleve emparejada la retención de líquidos, al menos en la musculatura de rata y por ello no es probable que ejerza un efecto de mineralocorticoide a ese nivel. El clenbuterol, aparentemente, fracasa, a la hora de incrementar el metabolismo oxidativo sobre ciertos sustratos *in vitro*, lo cual, puede ser atribuido a varios factores que incluyen no sólo pequeñas diferencias en la estructura molecular, sino también, la especie, vía de administración y, posiblemente, el que existan vías metabólicas distintas comparadas con las de los humanos (Re *et al.*, 1993).

c.- Mecanismo de acción a nivel muscular

Tras la administración de agonistas β -adrenérgicos se produce una intensa hipertrofia muscular, sobre todo a nivel de los cuartos traseros, mas por hipertrofia que por hiperplasia de las fibras (Sanz Pérez, 1995). Se ha comprobado que el clenbuterol estimula la hipertrofia de las fibras en los músculos sóleos de rata neurectomizada. La respuesta del crecimiento muscular, producida por el clenbuterol, no muestra especificidad por el tipo de fibra muscular (contracción lenta, rápida o mixta) sobre la que ejerza su acción (McElligott *et al.*, 1987).

Del mismo modo, no todos los músculos se ven igualmente afectados, correspondiendo el efecto más notorio a los gastronemios, cuyo incremento va asociado a un incremento de la síntesis proteica (Choo *et al.*, 1992) mediante un marcado aumento de la concentración de AMP cíclico a este nivel (Moore *et al.*, 1994).

En general, podemos decir que este fenómeno se produce por la alteración de varios procesos implicados en el control del metabolismo proteico en el músculo. Aquí juega un papel importantísimo el transporte de calcio, a través de la membrana plasmática, mediante los canales de calcio. La concentración de éste está estrechamente ligada, tanto a la degradación muscular proteica como al propio papel que juega en la síntesis proteica (Reeds *et al.*, 1993).

Por otra parte, el calcio está íntimamente relacionado con la regulación de los elementos contráctiles de la musculatura esquelética, estimulando la actividad de la bomba sodio-potasio.

El efecto del recambio proteico, puede ser **directo**, cuando los β -agonistas se ligan directamente a los receptores de membrana musculares y activan una serie de procesos que conducen al incremento de proteínas o **indirecto**, cuando éstos no activan los receptores, sino que dirigen la producción de hormonas o de otros factores que entonces actuarían sobre el músculo o propiciando la estimulación del incremento de proteínas.

*** Mecanismos directos:**

Se refieren al recambio proteico, en función del aumento de la síntesis proteica y disminución de la degradación, y a la contractilidad muscular que, representa uno de los factores fisiológicos que más potentemente influyen sobre el desarrollo de la masa muscular. Está bien documentado el hecho de que los β agonistas alteran las propiedades contráctiles del músculo (Mantle *et al.*, 1992). La reducción de la contracción muscular, independientemente de la causa, provoca un rápido desgaste muscular (Mac Lennan y Edwards, 1989).

*** Mecanismos indirectos:**

Son los que afectan al recambio proteico mediante la actuación de ciertas hormonas (insulina, hormona del crecimiento, tiroxina, esteroides gonadales o glucocorticoides), enzimas e incluso variaciones del fluido vascular y las alteraciones a las que pueden verse sometidas tras los tratamientos con clenbuterol.

➔ **Insulina:**

Es de sobra conocido (Jefferson *et al.*, 1974) el papel determinante que desempeña esta hormona sobre el recambio proteico, debido al efecto directo que ejerce sobre la regulación de los niveles de aminoácidos circulantes.

Las acciones de la insulina se pueden resumir de la siguiente forma:

- # Incrementa el transporte de glucosa en músculos y adipocitos.
- # Provoca la lipogénesis y almacenamiento en el adipocito, de ácidos grasos procedentes de los quilomicrones y lipoproteínas, por acción de la lipoproteína-lipasa.
- # Favorece la síntesis de glucógeno, por activación de la glucógeno-sintetasa e inactivación simultánea de la fosforilasa (Goberna, 1992). Sobre la vía glucolítica activa la fosfofructoquinasa, la piruvato-quinasa y la piruvato-deshidrogenasa.
- # Interviene en el crecimiento celular inhibiendo la proteólisis, sobre todo a nivel muscular.

Como hormona anabolizante, la insulina da lugar a potentes efectos sobre el metabolismo proteico muscular, tiene una mayor influencia *in vitro* sobre la lipogénesis de los animales no rumiantes, sin embargo, numerosos estudios han indicado que el papel de la insulina en cuanto a la regulación de la lipogénesis, en tejido adiposo bovino, es insignificante (Prior y Smith, 1983), ya que, según el grado de maduración de los depósitos de tejido adiposo puede variar la sensibilidad del tejido a la insulina, un tejido adiposo menos maduro, como el tejido adiposo intramuscular, podría tener una mayor respuesta a la insulina en periodos cortos de incubación y/o en cultivos de tejido durante largo tiempo (Miller *et al.*, 1989).

En ratas, mediante tratamientos agudos con β -agonistas, se estimula la liberación de insulina por parte de las células β pancreáticas teniendo lugar este fenómeno en las primeras fases del tratamiento (Morgan, 1990). Por el contrario tras la administración crónica disminuye la producción de insulina o no ejerce ninguna influencia (Emery *et al.*, 1984).

Se ha comprobado que el crecimiento muscular está estimulado por β -agonistas en ratas diabéticas *per se* y en otras a las que yatrogénicamente se les provoca la enfermedad (McElligot *et al.*, 1987).

El número de receptores insulínicos de los adipocitos de los roedores desciende en presencia de agentes que incrementan la concentración intracelular de AMP cíclico (Liu y Mills 1989), cuya hidrólisis activa la triglicérido-lipasa y se produce la liberación de los ácidos grasos libres. Este mecanismo es inhibido por la insulina, pero lo que no está muy claro es si esta hormona estimula la actividad de la fosfodiesterasa o deprime la actividad de la adenilato-ciclase o afecta a ambos procesos (Fiems, 1987).

Otro aspecto, a tener en cuenta, es la disparidad existente entre el ejercicio y el tratamiento con clenbuterol, con respecto a la estimulación del transporte de glucosa inducido por la insulina. Existe una estrecha relación entre el transporte de ésta y la capacidad oxidativa de la musculatura esquelética. Estudios practicados en ratas Zucker han demostrado que el ejercicio crónico incrementa este tipo de transporte, únicamente en los músculos en los que se produce un incremento de las enzimas oxidativas (citrato sintetasa y citocromo oxidasa). El tratamiento crónico con clenbuterol da lugar a una reducción en la degradación proteica miofibrilar (Torgan *et al.*, 1993).

•• Otras hormonas, como las hipofisarias, juegan un papel fundamental en la regulación del crecimiento normal. La **hormona del crecimiento** aumenta sus niveles en ovejas, mientras que en ratas tratadas con clenbuterol no se observan cambios (Kim y Kim, 1997).

•• La **tiroxina** es indispensable para un crecimiento normal, aunque a elevadas concentraciones es catabólica. Tras el tratamiento con beta-agonistas aumentan los niveles plasmáticos de T_4 circulante.

Estudios realizados en ratas Wistar (Katsumata *et al.*, 1991) hacen sospechar que los efectos del clenbuterol sobre la alteración de la composición corporal, en cuanto a contenido

graso y proteico se refiere, pueden variar, según el nivel de actividad tiroidea del animal. Así, en ratas eutiroideas, el clenbuterol se muestra como un agente de reparto, hecho que no sucede cuando se administra el β -agonista a ratas hipotiroideas, en cuyo caso ni aumenta el contenido proteico, ni disminuye la fracción de grasa corporal.

↔ **Glucocorticoides**

En algunos roedores, tales como hamsters, cobaya y gerbillos, al igual que el hombre, el principal glucocorticoide secretado es el cortisol, mientras que en otros, como la rata y el ratón, es la corticosterona (Brien y Bannigan, 1986). Los trabajos de Conley y Bird (1997), en donde se hace referencia a las diferentes rutas metabólicas de la esteroidogénesis adrenal en distintas especies, indican que la rata produce una mayor cantidad de corticosterona debido a un déficit de la enzima *c-P450-17 α hidroxilasa-20 liasa*, responsable de la transformación de pregnenolona en cortisol.

La síntesis y secreción de corticoides se encuentra bajo el control de la hormona adreno-corticotrópica (ACTH), hormona hipofisaria que se libera como respuesta al factor liberador corticotrófico hipotalámico (CRF). En primer lugar, la ACTH incrementa el aporte sanguíneo adrenal, y posteriormente la esteroidogénesis y secreción de la mayoría de los esteroides adrenales (Woodman, 1997).

En la circulación periférica, los corticoides se encuentran de tres maneras:

- ligados a una proteína específica, transcortina o CBG (globulina portadora de cortisol)
- ligados a la albúmina
- libres, o ligados a sustancias no proteicas

En cuanto a sus funciones, al mismo tiempo que se encargan de regular el metabolismo de glúcidos, proteínas y grasa, intervienen de una manera fundamental, en dotar al organismo de una mayor capacidad de reacción frente al estrés (De Paolo y Masoro, 1989).

Los glucocorticoides regulan el número de receptores β -agonistas y la sensibilidad muscular y a altas concentraciones, producen un fuerte desgaste muscular. Para ciertos autores, las concentraciones plasmáticas de corticoides no se ven alteradas, ni en corderos ni en ratas, tras el tratamiento con clenbuterol (Choo *et al.*, 1992). Otros, han comprobado mediante estudios realizados en hembras Wistar de un año de edad (Sillence *et al.*, 1995), que cuanto menor sea la dosis de clenbuterol, las concentraciones de corticoides (cortisol y corticosterona), aumentan.

•• **Hormonas gonadales esteroides**, tampoco están involucradas en los mecanismos de hipertrofia muscular inducidos por los β -agonistas, como lo demuestra el hecho de que éstos son igualmente efectivos en machos o hembras, o en animales castrados e hipofisectomizados (Haynes, 1994).

Sobre aparato genital, el clenbuterol eleva las concentraciones de los receptores de estrógenos y progesterona, lo que conlleva la aparición de lesiones orgánicas, que nos hacen pensar seriamente en una disminución de la funcionalidad ovárica (Peterla y Scanes, 1990; Cerruti Sola *et al.*, 1996).

•• **El flujo sanguíneo** también se ve incrementado por la acción de los beta agonistas debido al efecto de vasodilatación periférica por ellos ejercido. Como también aumenta a nivel muscular, el crecimiento, asimismo, se verá favorecido. Pero, como este efecto es temporal ya que va descendiendo paulatinamente, es poco probable que el clenbuterol, al igual que el resto de los β -agonistas ejerzan un efecto sobre el crecimiento muscular, sólo por una alteración del flujo sanguíneo (Yang y McElligot, 1989).

•• En cuanto a la influencia que ejercen las **distintas enzimas**, los estudios realizados

por McElligot *et al.* (1989) sobre el efecto que produce en el crecimiento de la masa muscular, la administración continua o intermitente de beta-agonistas, como el clenbuterol, ponen de manifiesto que se produce un incremento en el tamaño de la masa muscular y los índices de recambio proteico se ven forzosamente alterados, aunque es realmente difícil establecer si los niveles de proteínas experimentan variaciones, bien por el aumento de su síntesis o por la disminución de su degradación.

La actividad enzimática, a nivel muscular, nos muestra un conjunto de enzimas proteolíticas (proteinasas y peptidasas ácidas, neutras y alcalinas), responsables de varios estadios de la degradación proteica en cascada. Nos referimos, entre otras, a las catepsinas D y B y a la NADG (N-acetilglucosaminidasa), que degradan las proteínas de las miofibrillas (Petrou *et al.*, 1995).

El incremento de la masa muscular observado en roedores, tanto inervados como denervados, tras el tratamiento con clenbuterol, no es el resultado de grandes cambios de la actividad de dichas proteasas ni tampoco obedece a espectaculares alteraciones de los niveles de las proteínas estructurales musculares (Mantle *et al.*, 1992). Las alteraciones concomitantes de la catepsina B muscular y el crecimiento del músculo podrían indicarnos que esta enzima colaboraría en el crecimiento estimulado por los beta agonistas (McElligot *et al.*, 1989).

d.- Mecanismo de actuación en tejido adiposo

La mejora de la composición de la canal producida por el clenbuterol, es en parte debida a su actividad beta-agonista, ya que como es bien sabido se produce una estimulación de la lipólisis de las reservas del tejido adiposo, un incremento de la termogénesis de la grasa parda, un descenso del nivel de degradación proteica y, en algunas circunstancias, se manifiestan muy claramente los efectos anabólicos proteicos.

El tejido adiposo pardo juega un papel importantísimo en la termogénesis inducida tanto por la dieta, como por el frío en roedores. Morfológica y funcionalmente la grasa parda

y la amarilla (blanca) son diferentes. La parda está más vascularizada y posee una mayor inervación simpática (Challis *et al.*, 1988).

Los adipocitos pardos, se caracterizan por la presencia de termogenina en la propia membrana de las mitocondrias. La termogenina es una proteína específica desligante, que constituye la única vía conductora de protones que permite la reentrada de éstos en la matriz mitocondrial, sin acoplarse a la síntesis de ATP. De este modo, la respiración y la producción de calor puede producirse sin reservas y no está limitada por los requerimientos de ATP (Fain y Gracia Sáinz, 1983). La unión del guanidíndifosfato (GDP) a esta proteína mitocondrial indica el índice del estado termogénico de la grasa parda. El tratamiento con clenbuterol origina un rápido incremento de los puntos de unión del GDP mitocondrial.

Tanto la estimulación α ó β adrenérgicas pueden aumentar la respuesta termogénica a nivel de la grasa parda, pero los receptores α desempeñan un papel de menor importancia (Young *et al.*, 1984).

Los ácidos grasos libres, liberados en el curso de la lipólisis, son capaces de actuar directamente sobre la termogenina; ello induce la transcripción de un gen de dicha proteína dando lugar así a una neosíntesis de proteína que se introduce en la membrana interna de las mitocondrias del tejido adiposo pardo (Ricquier *et al.*, 1986; Yang y Mc Elligot, 1989).

Esta estimulación crónica provoca un incremento de las reservas energéticas a la vez que una reducción de tejido adiposo blanco. En el caso de la rata, que cuando es adulta posee un tejido adiposo pardo bien desarrollado, el clenbuterol ejerce un efecto equivalente al producido por un β_1 agonista como el prenalterol. En esta especie, el efecto lipomovilizador y termogénico puede explicar, en parte, la reducción de la masa grasa, sin que ello impida el efecto del clenbuterol sobre el crecimiento muscular (Lafontan *et al.*, 1988). También provoca una reducción de la extensión del tejido adiposo blanco, asociado a un aumento del tejido adiposo pardo intercapsular, aunque estos efectos, son variables según la estirpe de rata utilizada (Berne *et al.*, 1985).

En cuanto a otras especies, los depósitos adiposos disminuyen en más de un 10% en bovinos y ovinos, llegando a alcanzar hasta el 30-40% en ciertos casos (Liu y Mills, 1989). Thorthon *et al.* (1985) demostraron que el clenbuterol posee una actividad lipolítica en adipocitos aislados de cordero, al mismo tiempo que se produce una modificación de la grasa de cobertura perdiendo ácidos grasos libres: palmítico (23-26%), esteárico (67%) y oleico (63%) (Lafontan *et al.*, 1988).

Estudios experimentales, realizados en ratas, han demostrado que se produce un incremento del metabolismo de las grasas, que puede ser debido a una elevación de la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) en el músculo y la utilización preferente de los ácidos grasos por el músculo como recurso energético, tras el tratamiento con β -agonistas (Chance *et al.*, 1991). La lipoproteína lipasa cataliza la hidrólisis de los triglicéridos, formando ácidos grasos libres. En la rata, esta enzima se localiza preferentemente en corazón y tejido adiposo, mientras que en el hígado se encuentra en estado inactivo. La heparina está considerada como un activador específico del grupo prostético de la lipoproteína lipasa. Su destrucción, a nivel hepático por la heparinasa, puede justificar la inactivación de la lipoproteína lipasa en hígado (Felts y Mayes, 1967). Estudios realizados sobre el metabolismo de quilomicrones o triglicéridos, en hígados perfundidos, demuestran que la activación de la LPL por la heparina tiene como consecuencia unos elevados índices de oxidación, siendo altamente probable que la grasa formada sea utilizada rápidamente por el hígado debido a la hidrólisis de los triglicéridos en ácidos grasos (Felts *et al.*, 1967).

HÍGADO, CLENBUTEROL Y METABOLISMO

Un punto directamente relacionado con el metabolismo en general y sobre el que debemos centrar muy especialmente nuestra atención, ya que es uno de los principales órganos donde se produce el mayor acúmulo de clenbuterol, es el estudio del hígado tanto estructural como funcionalmente.

Macroscópicamente, el hígado de la rata está formado por cuatro lóbulos mayores (mediano, lateral derecho, lateral izquierdo y caudal o accesorio) (Kohn y Barthold, 1984).

Desde el punto de vista histológico, es un tejido heterogéneo, en el que el 65% de las células son hepatocitos y el 35% restante está constituido por células no parenquimatosas, que representan el 10% de la masa hepática (células endoteliales, de Kupffer, de Ito y en hoyo o "pit cells"). El estroma, está constituido por espacios porta, sinusoides, células sinusoidales y vénulas hepáticas terminales o centrolobulillares (Ortega e Ispizua, 1993).

Estructuralmente, se puede contemplar desde dos puntos de vista: morfológica y funcionalmente.

Con respecto a la **morfología**, nos referimos a los lobulillos clásicos en el que tabiques conectivos finos unen los espacios porta entre sí, delimitando zonas de parénquima hexagonales y en cuyo centro, se sitúa una vena central.

Desde el punto de vista **funcional**, los distintos autores hablan del acino hepático, constituido por una arteriola hepática terminal, vénula portal terminal, uno o más conductos biliares y fibras nerviosas (Poo *et al.*, 1992). En los sinusoides hepáticos destaca la presencia de receptores β_2 -adrenérgicos, que juegan un papel fundamental en la microcirculación hepática.

En cuanto a la funcionalidad hepática con respecto al metabolismo conviene hacer un breve recuerdo de las principales funciones que este órgano lleva a cabo, sobre los procesos metabólicos fundamentales, como son:

- Glúcidos
- Lípidos
- Proteínas

Con respecto al **metabolismo de los glúcidos**, la regulación de las vías metabólicas de la glucosa depende de la concentración de glucosa en sangre sinusoidal y de los niveles de insulina, catecolaminas y glucagón.

La captación de glucosa a nivel hepático se realiza a favor de gradiente (Barber y Ponz, 1988) y debe encontrarse a unas concentraciones superiores a las fisiológicas. Esta captación debe producirse muy rápidamente para igualar las concentraciones a nivel sinusoidal y células hepáticas (véase figura 10).

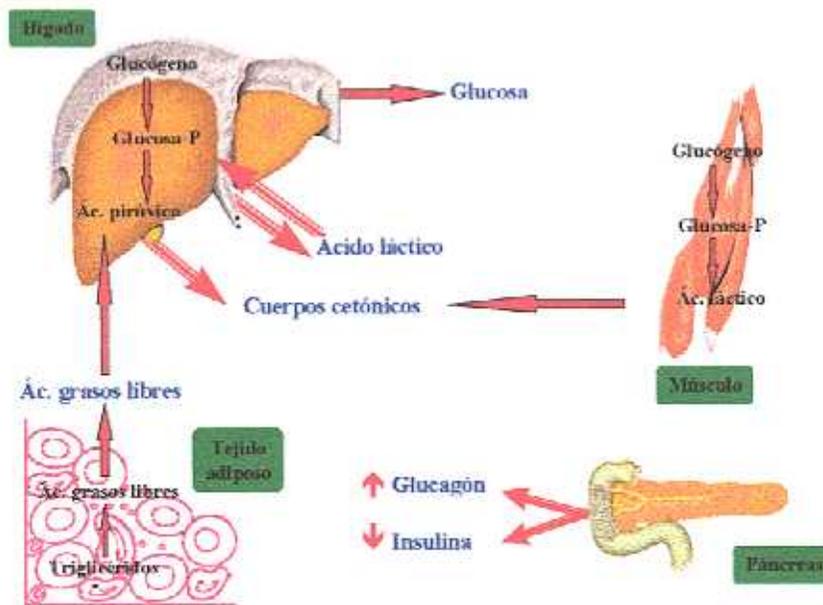


Figura 10

En la fase de absorción, la captación se produce cuando este glúcido alcanza unos niveles muy elevados en la sangre procedente de la vena porta. Sin embargo, en el ayuno, o en la fase de post-absorción, el hígado reacciona de forma contraria, liberando glucosa.

Una vez, en el interior de los hepatocitos, la glucosa se incorpora a las diferentes vías metabólicas (véase figura 11):

- Glucogenogénesis/Glucógenolisis.
- Glicolisis.
- Gluconeogénesis.

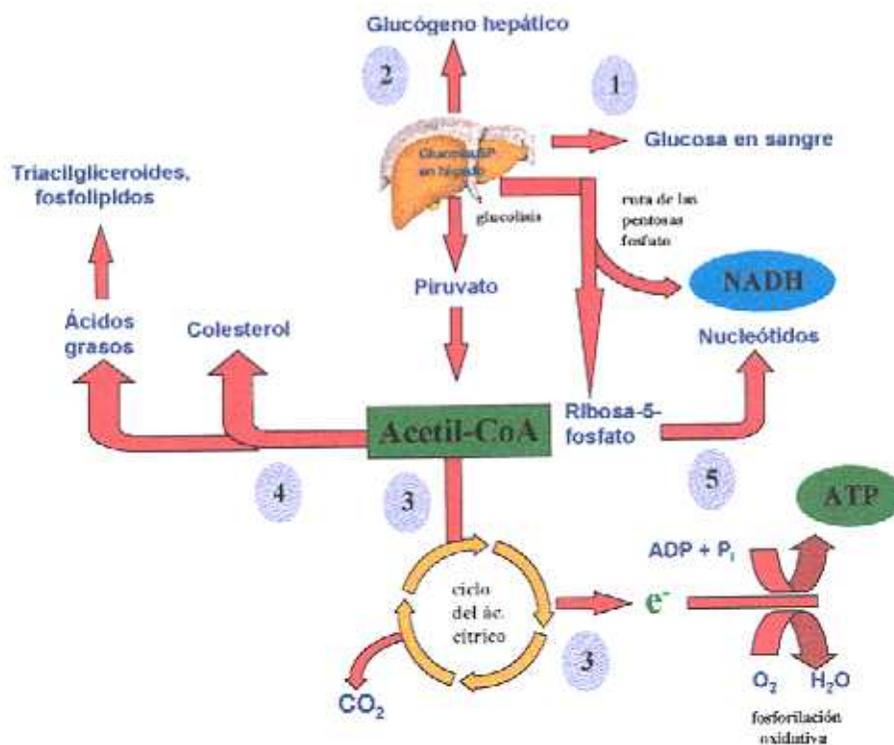


Figura 11

No está demasiado claro cuáles son las enzimas clave involucradas en el desarrollo de estas vías metabólicas específicas, que tienen lugar en las regiones periportal y pericentral del

lóbulo hepático (Cortinovis *et al.*, 1993). Los hepatocitos de estas dos regiones, serían los responsables de la gluconeogénesis y glicolisis, respectivamente.

Por lo que se refiere al **metabolismo de los lípidos** (triglicéridos y colesterol), el 20% sufre un proceso de "aclaramiento" en el hígado (Martínez Verano y Martínez, 1992), para utilizar los ácidos grasos como principal fuente de energía, mediante dos procesos (véase figura 12):

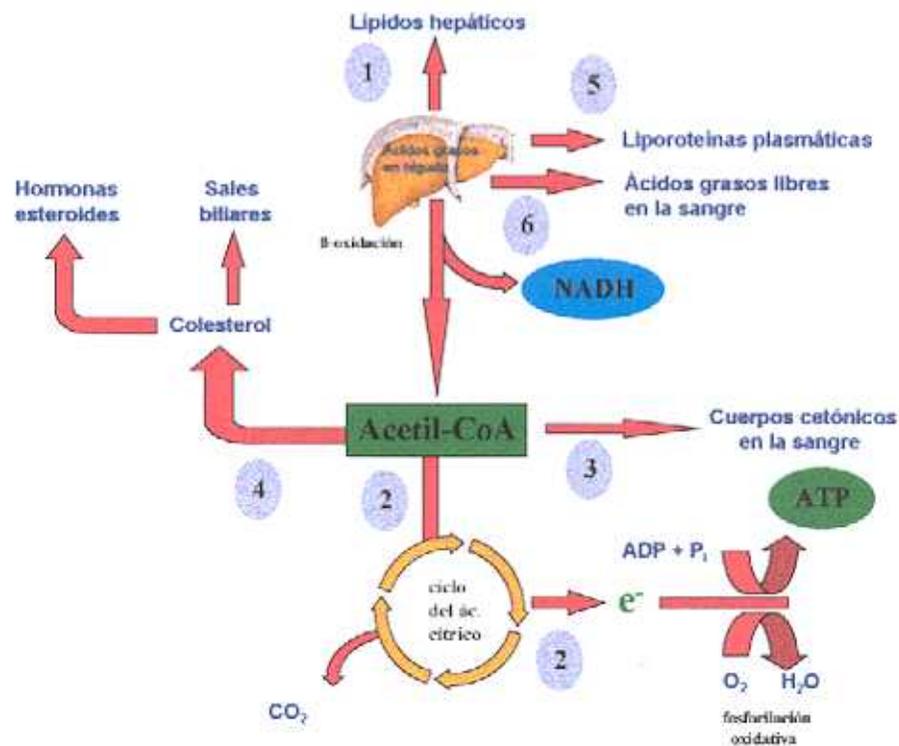


Figura 12

- **Esterificación:** Tiene lugar en el retículo endoplásmico y da lugar a la formación de lipoproteínas, que son las responsables de solubilizar los lípidos para transportarlos a los distintos fluidos corporales y, además, regulan la entrada y salida de los mismos de las células y tejidos efectores.
- **Beta-oxidación:** Se realiza a nivel mitocondrial, dando lugar a la formación de

cuerpos cetónicos. Estos sólo se forman en el hígado y proporcionan la energía que será utilizada por los tejidos, en las fases de ayuno.

Por último, con respecto al **metabolismo proteico** (véase figura 13) los aminoácidos procedentes de la circulación, participan en el hígado en la síntesis de proteínas o sufren los procesos de desaminación y transaminación. La gran mayoría de las proteínas plasmáticas se

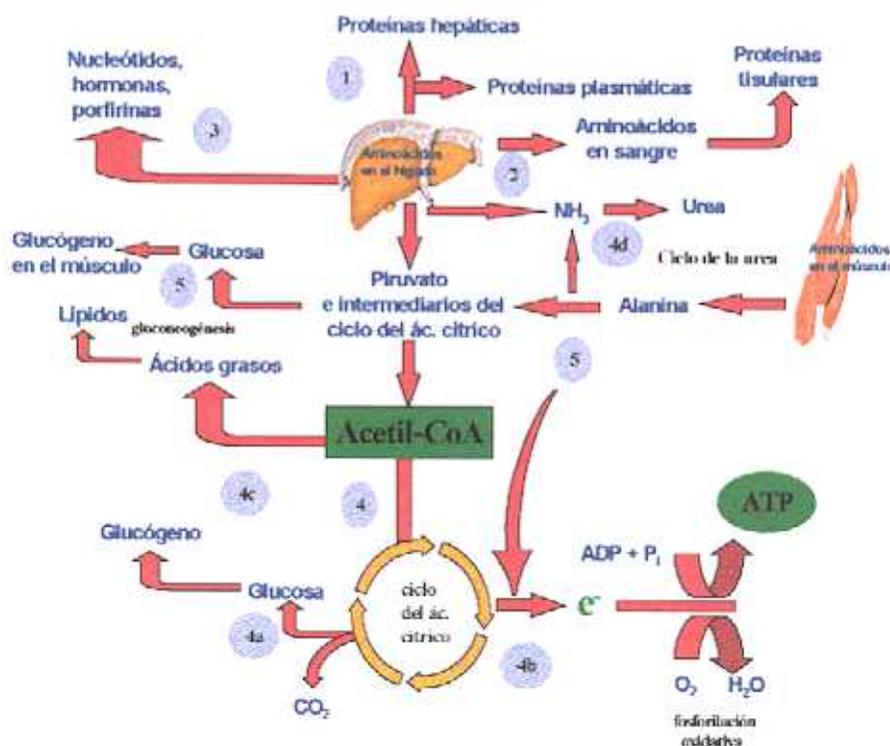


Figura 13

sintetizan en hígado a excepción de la gamma globulina.

Otro proceso fundamental, que tiene lugar en este órgano, es la formación de urea, producto de transformación del amoníaco para ser excretado. El amoníaco, no sólo procede de los procesos catabólicos del hígado, sino de otros tejidos como cerebro, músculo e intestino, que liberan el nitrógeno en forma de aminoácidos (alanina y glutamina).

En la rata, se ha demostrado la existencia de receptores β_2 , en los sinusoides hepáticos que juegan un papel fundamental, en lo que a la microcirculación hepática de esta especie se refiere (Poo *et al.*, 1992). Los efectos metabólicos están relacionados con la concentración tisular de AMP-c. A nivel hepático, en la rata, la conversión de ATP en AMP-c se produce de forma acelerada, igual que la activación enzimática, fundamentalmente, por parte de las fosforilasas, que catalizan la transformación de glucógeno en glucosa, aunque la mayoría de los autores coinciden en que la liberación de glucosa no se ve alterada por los tratamientos con clenbuterol. Estudios realizados con ratas, sometidas a entrenamiento físico o en ayunas (Davidson *et al.*, 1993), han puesto de manifiesto que el tratamiento con clenbuterol no parece modificar la liberación de glucosa por parte del hígado, siendo sus principales órganos efectores, en este caso, la musculatura esquelética o el tejido adiposo.

Bonen *et al.*, (1986) sostienen que los niveles de glucosa se elevan, en el entrenamiento, como resultado de la activación de los receptores musculares, pero no hepáticos, en ratas tratadas con clenbuterol, lo que se ve acompañado de un aumento de los niveles de insulina, pero dependiendo del tipo de músculo afectado.

Mientras que en los roedores (Torgan *et al.*, 1993) los efectos del clenbuterol sobre la liberación de glucosa no están suficiente claros, en otras especies como el ganado vacuno, si se ha comprobado que en los animales tratados se produce un incremento de dichos niveles (Bruckmaier y Blum, 1992).

Por lo que respecta al metabolismo proteico, estudios realizados en ratas, sometidas a restricción de comida y tratadas con clenbuterol (Cardoso y Stock, 1996), han demostrado que se produce un incremento de la concentración de proteínas hepáticas.

El posible grado de hepatotoxicidad que pueda representar la utilización del clenbuterol, a dosis superiores a las terapéuticas, es nulo en roedores (Roberts *et al.*, 1994), como lo demuestran los estudios histológicos y ultraestructurales realizados hasta el presente. En otras especies como las aves (Brambilla *et al.*, 1994) se ha observado hepatomegalia, quizá

debido a la acción metabólica del clenbuterol.

GLUCOCORTICOIDES DE SÍNTESIS: DEXAMETASONA

*** Generalidades**

Los glucocorticoides sintéticos presentan tres características fundamentales:

- ✓ Máxima capacidad antiinflamatoria y mínima capacidad de retención de sodio.
- ✓ Menor capacidad de unión a las proteínas plasmáticas, permitiendo de esta manera su mejor distribución tisular, y una elevada afinidad por los receptores esteroides.
- ✓ Alteración del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA) provocando la supresión de la secreción de CRH y ACTH. Estudios realizados en ratas han puesto de manifiesto que si las concentraciones de ACTH disminuyen, durante un espacio prolongado de tiempo, las células de la corteza adrenal se atrofian y la respuesta del eje HHA, disminuye progresivamente (Fernández y Sainz, 1997).

*** Estructura**

Los glucocorticoides de síntesis se originan partiendo de la estructura básica de un glucocorticoide, que consta de 21 átomos de carbono en distribución pregnano, doble enlace $C_4=C_5$ y un oxígeno en los carbonos 3, 11 y 20. Mediante ligeras modificaciones en dicha estructura (presencia de grupos cetónicos, dobles enlaces o átomos halogenados en ciertas posiciones) se originan los glucocorticoides de síntesis que suponen grandes diferencias con respecto a la farmacocinética, farmacodinámica y afinidad por los receptores de los corticosteroides (Behrend y Kemppainen, 1997).



La dexametasona (9 α -fluoro-16 α -metilprednisona) es un derivado fluorado de la prednisona (véase figura 14). Estructuralmente, pertenece a la segunda generación de glucocorticoides sintéticos o halogenados que se caracterizan por uno o varios grupos flúor o cloro, en su estructura molecular, lo que contribuye a aumentar la potencia y vida media del fármaco (Ballarín y Sala, 1995).

Figura 14

Sus acciones son similares a las del resto de los corticoides, pero carece de actividad mineralocorticoide, debido a la hidroxilación o metilación en el C₁₆, con lo cual no produce retención hidrosalina y la duración de sus efectos es más prolongada, siendo además 40 veces más activa que el cortisol (Guyton, 1997).

* Mecanismo de acción:

La dexametasona plasmática libre atraviesa la membrana celular y se une a los receptores citoplasmáticos específicos, que se caracterizan porque tienen dos puntos de unión, uno al glucocorticoide y otro al ADN celular y una vez activados penetran en la membrana celular estimulando la transcripción de ARN mensajero y ARN ribosómico, activando o inhibiendo los distintos procesos enzimáticos celulares, según actúe sobre un tejido efector en concreto (Campbell *et al.*, 1996).

* Farmacocinética y distribución

La dexametasona se absorbe fácilmente por vía oral lográndose alcanzar un pico sérico entre 70 y 180 minutos, debido a múltiples factores como pueden ser la dosis empleada o la vía de administración elegida, que va en función de la duración del efecto deseado. De este modo y debido a que la absorción en el tracto gastroentérico es muy rápida, la duración de su efecto es casi igual a su vida media (Halliwell y Gorman, 1989). Sin embargo, si lo que se pretende conseguir es una duración a más largo plazo, ha de optarse por la vía parenteral.

Atraviesa fácilmente las barreras placentaria y hematoencefálica y se metaboliza mucho más lentamente que el cortisol debido al radical flúor presente en el carbono 9 de su molécula. Se acumula entre las 12 y 36 horas en los órganos metabolizadores y excretores en función de su vida media biológica, que varía entre 36 y 72 horas (Ballarin *et al.*, 1995).

En cuanto a su unión con las proteínas plasmáticas, al igual que el resto de los glucocorticoides, se une en distinta proporción a la albúmina (15%) y la transcortina o CBG (45%), mientras que otra fracción restante, la verdaderamente activa, es vehiculada de forma libre en el plasma (40%), cuya vida media plasmática es de 200-300 minutos.

*** Metabolismo**

Es hepático, por sulfo y glucuronoconjugación.

*** Eliminación**

Renal (orina en un 70%) y hepática (bilis, en un 30%).

ACCIONES PRINCIPALES DE LA DEXAMETASONA

- ☞ Es un potente antiinflamatorio debido a la supresión de las respuestas inflamatorias.
- ☞ Bloquea la sensibilización de los linfocitos y las manifestaciones de hipersensibilidad mediadas por las células (Jiang *et al.*, 1996).
- ☞ Balance de nitrógeno negativo.
- ☞ Inhibición de la absorción gastrointestinal de calcio y la función de los osteoclastos, llegando a retardar e impedir el crecimiento del cartílago

epifisario.

- ☞ Carácter hiperglucemiante, aumentando la glucogenogénesis y la gluconeogénesis.
- ☞ A nivel hepático, estimula la formación de glucógeno y glucosa.
- ☞ A nivel muscular y del tejido linfoide, inhibe la síntesis proteica y activa la proteólisis.
- ☞ Sobre el tejido adiposo, favorece la acción lipolítica de la epinefrina y GH. De este modo, utiliza los ácidos grasos libres y el glicerol liberado, como sustratos para la formación de glucosa.
- ☞ Junto con la epinefrina y el glucagón, previene del exceso de la acción hipoglucemiante de la insulina, prolongando varias horas el aumento de la glucemia producido por ellos.
- ☞ En condiciones de ayuno, potencia y aumenta la duración del incremento de la glucemia, producido por el glucagón, epinefrina y GH, mientras que acentúa la movilización proteica, evitando la hipoglucemia y permitiendo el suministro de glucosa al Sistema Nervioso, hasta que el organismo se adapta al ayuno y comienza a utilizar los cuerpos cetónicos, como fuente de energía (López Calderón, 1992).
- ☞ Con respecto a la función endocrina (Behrend y Kemppainen, 1997) no perteneciente al eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, la dexametasona produce los siguientes efectos:

Reducción de la secreción de la hormona del crecimiento.

- # A nivel gonadal, en machos, inhibe la LH y la testosterona, mientras que en hembras da lugar a anestros prolongados. En ambos casos, conduce a fallos en la reproducción e incluso infertilidad.

- # Tiroides: es la glándula donde se han realizado los estudios clínicos más relevantes, demostrando que a elevadas dosis, no estimula la TSH-RF, mientras que la respuesta a la TSH disminuye.

CLENBUTEROL ASOCIADO A DEXAMETASONA

El clenbuterol también puede administrarse asociado a otras sustancias que, aún sin comportarse como tales promotores del crecimiento, modifican, en cierta medida, los efectos de aquellos. Es lo que se conoce habitualmente como "borradores", ya que impiden la detección de aquellos productos utilizados fraudulentamente. Uno de ellos es la dexametasona que, junto con la betametasona, constituyen uno de los grupos de corticoides de síntesis más importantes.

Existe muy poca información bibliográfica acerca de los efectos que los tratamientos combinados de estas dos sustancias producen en las distintas especies, aunque en la gran mayoría de los casos su utilización se basa en los efectos terapéuticos que tanto el clenbuterol como la dexametasona poseen. Así citaremos como ejemplos:

- ✓ Potencial efecto terapéutico sobre la enfermedad de Alzheimer (Emmet *et al.*, 1997), al estimular la liberación del factor endógeno de crecimiento nervioso (NGF), que previene la degeneración neuronal del Sistema Nervioso Central, ya que este factor es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica.
- ✓ Sobre los estados anabólicos y catabólicos de las diferentes vías proteolíticas a nivel muscular. Mientras que el clenbuterol reduce la degradación proteica total, y la degradación proteica miofibrilar, la dexametasona no produce ningún efecto, actuando de este modo de forma compensatoria, frente a la interacción de hormonas (anabólicas y catabólicas) del organismo (Fernández y Sainz, 1997).
- ✓ Disfunción diafragmática. Estudios realizados en conejos han demostrado que mientras que la dexametasona produce una disminución de la contractilidad del diafragma, el clenbuterol produce hipertrofia del diafragma y disminuye la atrofia inducida por la dexametasona (Jiang *et al.*, 1996).

- ✓ El tratamiento más efectivo en la enfermedad obstructiva crónica de los caballos se consigue con la administración de dexametasona sistémica y clenbuterol (Mair, 1996).

- ✓ Efectos beneficiosos sobre la atrofia muscular inducida por la utilización de glucocorticoides, ya que el clenbuterol antagoniza el efecto catabólico de la dexametasona sobre la musculatura esquelética (Agbenyega y Wareham, 1992).

Tanto el clenbuterol como la dexametasona son derivados de síntesis cuyas acciones están profundamente ligadas al Sistema Adrenérgico. Administrados conjuntamente tienen ciertos efectos "permisivos" sobre otros sistemas, como por ejemplo, con respecto a la gluconeogénesis, para lo cual es necesaria la presencia de glucocorticoides, o sobre la lipólisis, que está mediada por las catecolaminas (Goberna, 1992). Esta interdependencia, favorecida por el empleo de corticoides, puede tener cierta influencia a la hora de potenciar o enmascarar ciertos efectos producidos por parte de los dos compuestos y que favorezcan una utilización ilegal e indiscriminada del clenbuterol como agente anabolizante.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales.-

Hemos de comenzar diciendo que los animales utilizados en nuestro estudio, fueron obtenidos mediante el establecimiento de distintos cruces, realizados en el Pabellón de Animales de Experimentación (Nº de Registro Oficial EX-011-U) del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria de la U.C.M. Los animales reproductores procedían de Harlan, U.K. Limited y pertenecían a la estirpe Long-Evans (LE/CppHsd), con su correspondiente certificado de Salud Animal de acuerdo con al artículo 4 de la Directiva 92/65 del Consejo de la Unión Europea, siendo Harlan Ibérica S.A. el proveedor de los mismos.

Los animales fueron seleccionados por pesos y edades y mantenidos en las mismas condiciones de alojamiento y alimentación.

En cuanto a su distribución, se alojaron cinco animales por jaula; éstas son de poliestireno, de unas dimensiones de 25x40x15 cm, siendo alimentados a base de pienso en forma de pellets y agua, ambos *ad libitum*.

El pienso utilizado fue suministrado por Interfauna Ibérica S.A., cuya composición es a base de forrajes, productos y subproductos de granos cereales, cereales, productos y subproductos de semillas de oleaginosas, productos de pescado, minerales, pre-mezcla vitamínico mineral, aceite y grasas. El análisis medio, reflejó la siguiente composición:

✓ Proteína bruta %	15,00
✓ Cenizas brutas %	5,70
✓ Celulosa bruta %	5,20
✓ Grasa bruta %	2,20
✓ Cobre mg/kg	7,00 (sulfato cúprico heptahidratado)
✓ Vitamina A UI/kg	12.000
✓ Vitamina D ₃ UI/kg	14.00

✓ Vitamina E (mg/kg tocoferol) 60,00

Las condiciones de luz (ciclo 12/12), humedad relativa (50-55%), temperatura (20-22°C) y renovaciones de aire (10-15/h) de la habitación, fueron las mismas para todos los animales y a lo largo de todo el periodo experimental.

El número total de ratas utilizadas, teniendo en cuenta que no hubo que desechar ningún animal por cuestiones accidentales, como fallecimientos prematuros o presentación de estados patológicos irreversibles, fue en total de 210. Se agruparon en lotes constituidos por cinco animales (n=5) de acuerdo al siguiente esquema:

☞ *Tratadas con Clenbuterol:*

6 lotes de animales adultos y 10 lotes de animales impúberes, (n=5), y sus controles repartidos en 5 y 10 lotes respectivamente (n=5). El número total de animales tratados fue 80 mientras que el número total de animales control, 75.

☞ *Tratadas con la asociación Clenbuterol + Dexametasona:*

6 lotes de animales adultos tratados (n=5) junto a 5 lotes de animales controles (n=5). El número total de animales tratados, en este caso es de 30 y, el de los utilizados como control, 25.

Tanto en la manipulación como en el desarrollo del trabajo experimental se observaron, con el máximo rigor, las medidas contempladas en la Legislación vigente, del R.D. 223/88 respecto a la Protección de los Animales de Experimentación y a la propia ética que nuestra condición de investigadores nos compromete con respecto a evitar cualquier sufrimiento al animal por leve que fuere o nos pareciere.

Tratamiento.-

Los animales fueron sometidos a dos tipos de experimentos siguiendo el método descrito por Choo *et al.* (1990). Todos los tratamientos se realizaron por vía oral (Morgan, 1990) utilizando trócares rectos de 20 G x 11/2". A cada animal tratado se le administró 1 ml de la solución, que detallaremos a continuación, a primera hora de la mañana.

⇒ **Experimento A** : mediante la administración diaria de clenbuterol a una dosis de 1mg/Kg diluido en solución salina al 0,9%, durante 45 días, siguiendo el procedimiento de otros autores como Chance *et al.* (1991) y respetando posteriormente un periodo de retirada de 20 días.

Para ello se emplearon dos grupos de animales: impúberes y adultos, agrupados en lotes control y problema (n=5). Los pesos de los animales impúberes oscilaban en torno a los 90-100 g y los de los adultos entre 250-300 g.

⇒ **Experimento B** : mediante la administración diaria de la asociación de clenbuterol y dexametasona. El clenbuterol a la misma dosis que en el caso anterior y la dexametasona, (Decadrán, Merck Sharp Dome de España) administrada 10 días antes de finalizar el tratamiento mediante una única dosis de 0,1 mg/kg, por vía subcutánea. La duración tanto del tratamiento como del periodo de retirada, fue la misma que en el ensayo A.

En este caso sólo se emplearon animales adultos, con unos pesos medios de 250-300 g y distribuidos en lotes problema y control (n=5).

Descripción de la fase experimental.-

Se realizó un primer pesaje, con una semana de antelación al comienzo del tratamiento, para distribuir, con la mayor uniformidad posible, a los animales por lotes según el peso.

Una vez iniciados los tratamientos, se pesaban los animales semanalmente y, posteriormente, al cabo de 2 horas de la aplicación del tratamiento, anteriormente descrito, eran tranquilizados y sedados, con la asociación de Ketamina y Xylazina (0,5 ml/animal por vía intramuscular) para llevar a cabo la recogida de sangre de la vena yugular según Feldman y Seeley (1988), utilizando jeringas de 2 ml (Plastipak de Becton Dickinson) y agujas de 25 G (Microlance 3 de Becton Dickinson). El número total de tomas, incluyendo los periodos de supresión fue de 13.

Sacrificio y obtención de las muestras de los animales.-

Los días correspondientes a los sacrificios (0, 5, 10, 15 y 20 de la conclusión de los distintos tratamientos) los animales fueron anestesiados, con la asociación de Ketamina y Xylazina, y se procedió a la obtención de sangre mediante punción cardíaca (Brien y Bannigan, 1986) utilizando jeringas de 5 ml (Plastipak de Becton Dickinson) y agujas de 25 G 0.5 x 16 mm (Microlance 3, Becton Dickinson).

Una vez recogida la muestra, se llevaron a cabo los métodos de eutanasia, practicados con todos los grupos, que consistieron en la tranquilización (U.S. Department of Health and Human Services, 1985) a base de Ketamina (Ketolar 50 mg, Parke Davis, Warner Lambert Company, NJ USA) y Xylazina (Rompún, Bayer AG Leverkusen Alemania), según el método descrito por Flecknell (1987), y posteriormente dislocación cervical (Feldman y Seeley, 1988).

La recogida de sangre, se realizó en tubos de vidrio de 12 ml de capacidad, previamente heparinizados (con heparina al 10%, Rovi S.A.), con una concentración de 40µl/l sangre, y posteriormente fue sometida a centrifugación durante 20 minutos, a 4°C y 3.600 rpm (Minifuge

RF Heraeus). Una vez obtenido el plasma, las muestras fueron alicuotadas, identificadas y conservadas, a -30°C de temperatura, hasta que fueron descongeladas para realizar las técnicas analíticas de laboratorio oportunas.

Posteriormente a la recogida de sangre, se procedió a la hepatectomía total, pesaje de órganos y recogida de una porción de los mismos conservada en formol al 10% y otra en glutaraldehído al 3%, para llevar a cabo el estudio anatomopatológico a nivel de microscopía óptica y electrónica respectivamente. Otra porción, fue recogida y congelada a -30°C, para determinar la concentración hepática de clenbuterol.

ANÁLISIS HORMONALES

Las determinaciones de las concentraciones plasmáticas de las hormonas esteroides progesterona, 17 β -estradiol, androstenodiona, cortisol y corticosterona fueron realizadas mediante el método enzimoimmunoanalítico, ELISA de competición (Van Weemen y Schuurs, 1972; Munro y Stabenfeldt, 1984; Sauer *et al.*, 1986; Van de Wiel y Koops, 1986; Marcus y Durnford, 1986; Maurel *et al.*, 1986; Prakash *et al.*, 1990), puesto a punto según el método descrito por Silván (1991), en el Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (Illera *et al.*, 1992; Illera *et al.*, 1993a; Illera *et al.*, 1993b; Illera *et al.*, 1996; Blass *et al.*, 1996 ; Blass, 1997; Illera *et al.*, 1997) .

La determinación de las concentraciones, tanto plasmáticas como hepáticas, de clenbuterol fueron realizadas mediante ELISA de competición, puesto a punto según el método de Blass (1997), también en el mismo Departamento.

La determinación de las concentraciones de insulina, fue realizada mediante la técnica ELISA sandwich, mediante la utilización de un sistema automático en tubo (Boheringer Mannheim Immunodiagnosics ES 22).

Determinación de progesterona, 17 β -estradiol, androstenodiona, cortisol y corticosterona mediante la técnica ELISA de competición.

Una vez obtenidos los anticuerpos y conjugados para desarrollar el método enzimoimmunoanalítico, ELISA de competición, se realizó la puesta a punto del mismo que consistió en:

- * Definición de materiales y reactivos empleados.
- * Fijación de condiciones del ensayo: tiempos de incubación, temperatura de realización de las distintas etapas del ensayo, tiempos de lavado y tapizado

de las microplacas .

- * Establecimiento de las diluciones óptimas de trabajo tanto del anticuerpo como del conjugado para cada hormona.
- * Construcción de la curva patrón con la ayuda de una serie de diluciones estándar de cada hormona.

*** Condiciones de ensayo**

Siguiendo el criterio de Silván (1991), son las siguientes:

Fase sólida:

Se utilizan microplacas de poliestireno con 96 pocillos (*Dynatech*). Las placas se sellan con adhesivos de acetato para placas (*INC Biomedicals Inc.*).

Condiciones de incubación:

- a.- Inmovilización del anticuerpo a la fase sólida: 16 horas a 4°C.
- b.- Reacción de competición: 2 horas.

Tiempos de lavado y tapizado:

- a.- Lavados: de 5 a 10 segundos cada uno.
- b.- Tapizado de las placas con la solución de conjugado: no debe ser superior a 10 minutos ya que en caso contrario se pueden observar

variaciones en los valores de absorbancia de las columnas tapizadas en los últimos lugares.

Material

- ✓ Placas ELISA de poliestireno de 96 pocillos (Dynatech).
- ✓ Selladores adhesivos de acetato para placas (ICN Biomedicals Inc).
- ✓ Pipetas automáticas de 10-100 μ l y de 100-1000 μ l (Eppendorf).
- ✓ Pipeta multicanal de ocho canales de 50-250 μ l (Costar).
- ✓ Agitador (Vórtex) Reax 2,000 (Heindolph).
- ✓ Pipetas de cristal de doble enrase de 5 y 10 ml (Protón).
- ✓ Parafilm (Amerian Can Co).
- ✓ Tubos de ensayo de cristal de 16 x 25 mm (Becton Dickinson).
- ✓ Puntas, de un sólo uso, de 10-100 μ l (Comfortips, Eppendorf).
- ✓ Puntas de pipeta multicanal, 25-250 μ l (Costar).
- ✓ Lector automático ELISA (Biotek).

Reactivos

- ✓ TMB (Tetrametilbenzidina) Sustrato K (Labsystems).
- ✓ Ácido ortofosfórico: H_3PO_4 (Merck).
- ✓ Etanol absoluto: CH_3CH_2OH (Panreac).
- ✓ Cloruro sódico: NaCl (Probus).
- ✓ Dihidrógenofosfato monoanhidrato sódico: $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (Merck).
- ✓ Di-sodiohidrógenofosfato anhidro: Na_2HPO_4 (Merck).
- ✓ Carbonato ácido de sodio: $NaHCO_3$ (Merck).
- ✓ Albúmina sérica bovina, fracción V de Cohn (Sigma & Co).
- ✓ Thimerosal (Ácido benzoico 2-((etilmercurio)tio), sal sódica (Merck).
- ✓ Tween-20 (Merck).
- ✓ Anticuerpos policlonales obtenidos y caracterizados en el Departamento de

Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria de Madrid: anti 17 β -estradiol, anticortisol, anticorticosterona, antiprogesteronas, antiandrostenediona.

- ✓ Hormonas esteroideas estándar (Steraloids Inc., N.H. USA):
 - * 11,17,21-Trihidroxipregn-4-eno-3,20-diona: Cortisol.
 - * (11 β)-11,21-Dihidroxipregn-4-eno-3,20-diona: Corticosterona.
 - * 4-Androsteno-3,17-diona: Androstenediona.
 - * (17 β)-Estra-1,3,5 (10)-trieno-3,17-diol: Estradiol.
 - * 4-Pregnen-3, 20 diona: Progesterona.

Soluciones amortiguadoras

Solución tampón Carbonato-bicarbonato 0,05M: pH=9,6

Para 1.000 ml. de solución:

Na₂CO₃: 1,59 g.

NaHCO₃: 2,93 g.

Thimerosal 1%: 5ml.

Conservar a 4°C.

Solución tampón de EIA: pH= 7,0

Para 1.000 ml. de solución:

NaH₂PO₄.H₂O: 5,421 g.

NaHPO₄: 8,662 g.

NaCl: 8,7 g.

Albúmina sérica bovina: 1,0 g.

Thimerosal 1%: 5 ml.

Conservar a 4°C.

Solución tampón sustrato: pH= 4,8

Esta solución se encuentra preparada comercialmente, en la proporción necesaria:
Tetrametilbenzidina Substrato K: TMB (Labsystems).

Solución de lavado: Solución madre (10x). Se utiliza diluída 10 veces.

Para 1.000 ml. de solución:

NaCl 1,5M: 87,66 g.

Tween-20 0,5%: 5 ml.

Conservar a temperatura ambiente.

Solución de frenado:

H₃PO₄ 1M.

**Determinación del comportamiento de los anticuerpos y conjugados en ELISA:
determinación de las diluciones óptimas de trabajo en el ensayo.**

Para poder determinar las condiciones óptimas de trabajo de cada uno de los anticuerpos (anti: 17β-estradiol, progesterona, androstenodiona, cortisol y corticosterona) y sus conjugados respectivos, se deben realizar una serie de pruebas que enfrenten diluciones variables tanto de anticuerpo como de conjugado.

Las diluciones empleadas son las siguientes:

Para los anticuerpos: 1/2.000; 1/4.000; 1/8.000; 1/16.000.

Para los conjugados: 1/20.000; 1/40.000; 1/80.000; 1/160.000.

Dichas diluciones se distribuyen en la placa de poliestireno de la forma siguiente:

Anticuerpos:	Conjugados:
Columnas 1-3: 1/2.000.	Filas A-B: 1/20.000.
Columnas 4-6: 1/4.000.	Filas C-D: 1/40.000.
Columnas 7-9: 1/8.000.	Filas E-F: 1/80.000.
Columnas 10-12: 1/16.000.	Filas G-H: 1/160.000

El siguiente cuadro muestra las diluciones óptimas seleccionadas (aquellas que poseen una densidad óptica entre 0,6 - 0,9 a 450 nm), siguiendo el criterio de Munro y Stabenfeldt (1984).

	Anticuerpo	Conjugado
17β-estradiol	1/2.000	1/20.000
Progesterona	1/16.000	1/160.000
Androstenodiona	1/16.000	1/160.000
Cortisol	1/16.000	1/160.000
Corticosterona	1/16.000	1/160.000

Construcción de las curvas patrón o estándar

Partimos de una solución madre de concentración conocida de 2 mg/ml de etanol absoluto de cada una de las hormonas (progesterona, 17 β -estradiol, androstenodiona, cortisol y corticosterona), a partir de la cual se realizan diluciones con etanol absoluto en tubos de ensayo. Dichas diluciones son sometidas a una extracción en extractor Turbo Vap LV evaporator (Zymark) donde se someten a una corriente de gas nitrógeno C-50 P 200 Kg/cm² (Carbuos metálicos), con condiciones de extracción de 40°C, 6 PSI, 6 minutos y corriente continua de gas nitrógeno C-50. Una vez evaporado el etanol se añade el conjugado a todas las concentraciones

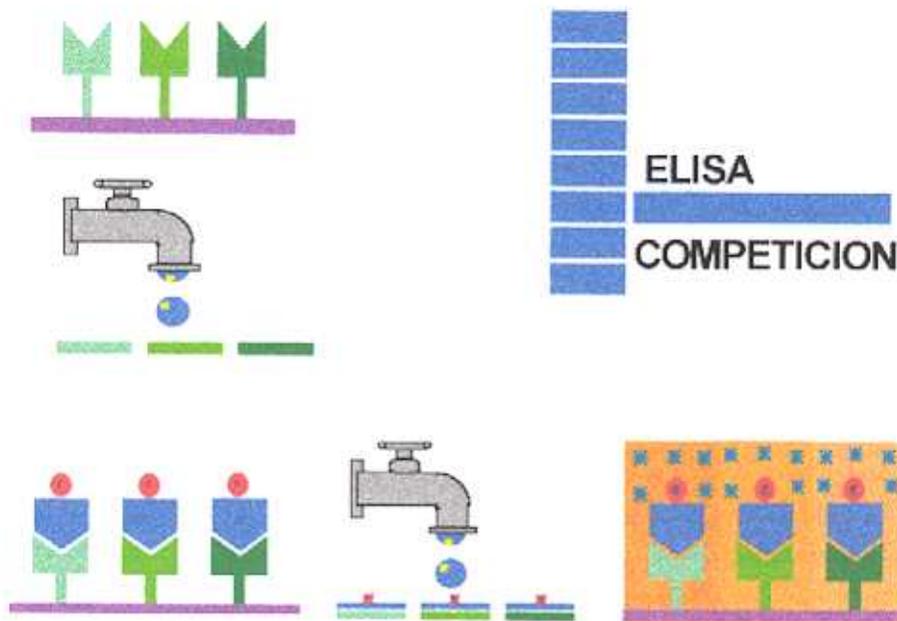
estándar, y se realiza el ensayo con el fin de establecer las medidas de densidad óptica a 450 nm.

Con las medidas de absorbancia se trazan las curvas estándar, que permiten calcular las concentraciones de hormonas esteroides a partir de los resultados que presentan las muestras problema.

El margen empleado para cada curva estándar varía según la concentración que se espera obtener para cada hormona:

- ⇒ 17β-Estradiol: 0,1 pg - 1 ng
- ⇒ Progesterona: 1 pg - 1ng
- ⇒ Androstenodiona: 1 pg - 1ng
- ⇒ Cortisol: 1 pg - 1ng
- ⇒ Corticosterona: 1 pg - 1ng

DESARROLLO DE LA TÉCNICA ELISA DE COMPETICIÓN



Comprende las siguientes etapas:

- 1.- Adsorción de los anticuerpos a la fase sólida
- 2.- Reacción de competición: adición de la muestra o el estándar y el conjugado.
- 3.- Separación de las fracciones de hormona libre y unida a los anticuerpos de la fase sólida.
- 4.- Adición del sustrato y frenado de la reacción.
- 5.- Lectura de la placa y procesado de los resultados.

1.- Adsorción de los anticuerpos a la fase sólida:

Consiste en tapizar los pocillos con 100 μ l de la dilución del anticuerpo específico, menos uno (A1) que se deja como blanco. Las diluciones pertinentes del anticuerpo se llevan a cabo en una solución tampón carbonato-bicarbonato 0,05M.

A continuación las placas se cubren con selladores adhesivos de acetato, incubando durante 16 h a 4°C.

Con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo que no haya sido adsorbido a la placa, se practican 5 lavados con solución de lavado (200 μ l, por pocillo) así como un secado completo mediante volteo en papel de filtro.

2.- Reacción de competición

Esta reacción tiene lugar entre la hormona libre (estándar o problema) y la conjugada a la enzima. Tanto las muestras estándar como las problema se mezclan con la dilución de conjugado apropiada para cada hormona. Estos conjugados han sido diluidos, utilizando una solución tampón EIA.



Las muestras estándar y problema se determinan por duplicado y se distribuyen en la placa de la siguiente forma:

Columna 1 (A-F): La denominamos E₀; en ella solamente se añade dilución de conjugado.

Columnas 1 (G y H), 2 y 4 (A y B): En ellas se añaden las distintas diluciones de las hormonas estándar diluídas en el conjugado.

Columnas 4 (C- H),5,6,7,8,9,10,11,12 (A-D): En ellas se añaden las muestras problema diluídas en el conjugado.

Columna 12 (E-H): En ella se añade la dilución de conjugado nuevamente.

El tapizado de las placas en la reacción de competición, se lleva a cabo añadiendo 50 µl de solución tampón de EIA, en todos los pocillos y añadiendo después 50 µl de los reactivos siguiendo la anterior distribución.

Las placas son cubiertas, de nuevo, con selladores adhesivos, dejándose dos horas a temperatura ambiente.

3.- Separación de las fracciones de hormona libre y unida a los anticuerpos adsorbidos en la fase sólida.

Se realiza mediante volcado de placas seguidos de cinco lavados con solución de lavado así como un secado completo.

4.- Adición del sustrato y frenado de la reacción.

Ayudados de una pipeta multicanal se añaden 100 μ l de TMB Substrato K, por pocillo. Después, se vuelven a sellar las placas dejándolas reaccionar, para que se desarrolle color durante un periodo de diez minutos, añadiendo después 100 μ l de ácido ortofosfórico (solución de frenado) por pocillo para provocar el frenado de la reacción de color.

5.-Lectura de las placas y procesado de los resultados.

Una vez añadida la solución de frenado se puede pasar a realizar la lectura de la densidad óptica del color desarrollado. Esta lectura se lleva a cabo a través de un lector automático ELISA (*Biotek*), la medición se realiza a doble longitud de onda a 450 nm y 600 nm.

El procesado de los resultados obtenidos del análisis hormonal, en las muestras de plasma, se realiza con la ayuda de un software diseñado especialmente para ello en el Departamento de Informática de la Universidad de California, Davis y consiste en:

a) Trazado de las curvas patrón.

Se realiza enfrentando en el eje de abscisas, las concentraciones estándar de cada una de las hormonas y en el eje de ordenadas, la relación $E/E_0 \times 100$, es decir el porcentaje de unión de las muestras estándar con el anticuerpo.

Estas curvas patrón sirven de referencia para el cálculo de las concentraciones hormonales de las muestras problema.

b) Cálculo de las concentraciones hormonales de las muestras de plasma

El ordenador calcula las concentraciones de las muestras problema tomando como referencia las curvas patrón. Para expresar estas concentraciones en las unidades correctas es

necesaria la introducción de un factor de corrección, ya que las muestras sufren distintas diluciones, por lo que la concentración calculada es inferior a la real, al obtenerse absorbancias superiores a las que se obtendrían si la muestra se añadiese sin diluir.

Las concentraciones de progesterona, androstenodiona, cortisol y corticosterona se expresan en ng/ml en plasma. Las concentraciones de 17 β -estradiol se miden en pg/ml.

Análisis de hormonas esteroides en las muestras obtenidas de los animales.

Puesta a punto la técnica ELISA de Competición, las muestras de plasma son sometidas a una extracción previa al análisis.

Para el 17 β -estradiol se toman 500 μ l de muestra y se añaden 2 ml de dietil éter, se agitan vigorosamente durante 40 s y se colocan en un baño de metanol y nieve carbónica; el sobrenadante se decanta y se extrae con una corriente de nitrógeno, en tubos de cristal de 12 x 10 mm. Una vez extraídos se añaden 150 μ l de solución de conjugado.

La progesterona se extrae añadiendo 100 μ l de muestra a 2 ml de éter de petróleo, se agitan vigorosamente durante 40 s y se colocan en un baño de metanol y nieve carbónica, el sobrenadante se decanta y se extrae con una corriente de nitrógeno, en tubos de cristal de 12 x 10 mm. Una vez extraídos se añaden 150 μ l de solución de conjugado.

La corticosterona y el cortisol se extraen añadiendo 100 μ l de muestra a 1 ml de etanol absoluto, se agitan vigorosamente durante 20 s y se centrifugan durante 20 min a 3.500 rpm a 4° C. Se recogen 100 μ l del sobrenadante y se extrae con una corriente de nitrógeno, en tubos de cristal de 12 x 10 mm. Una vez extraídos se añaden 150 μ l de solución de conjugado.

Determinación de las concentraciones plasmáticas de insulina

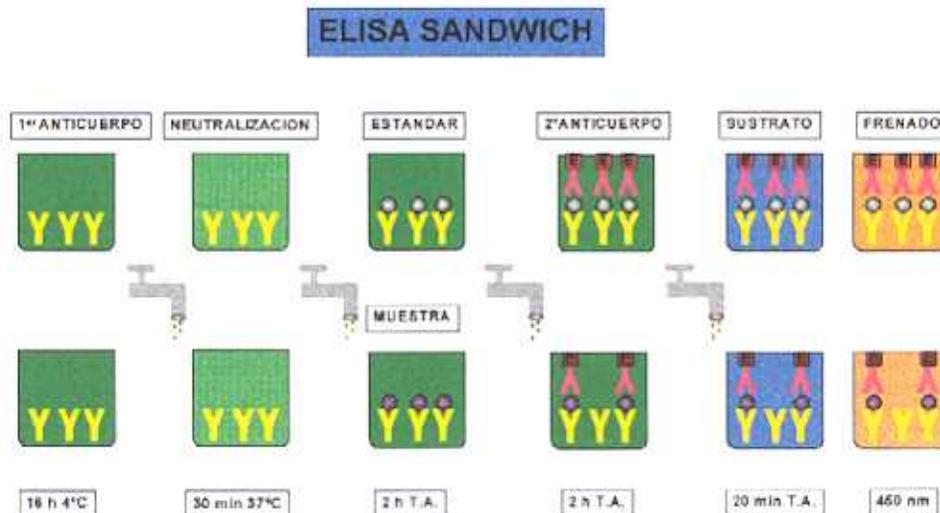
Esta hormona fue analizada mediante la técnica ELISA sandwich.

*** Descripción de la técnica**

El ELISA sandwich o de "dos sitios" consiste en lo siguiente: un primer anticuerpo que se adhiere a una fase sólida (tubo de plástico), a él se une un antígeno (si lo hubiera en la muestra)

y la unión se detecta mediante la adición del mismo anticuerpo específico marcado.

En una primera incubación, el antígeno insulina de la muestra, se liga a los anticuerpos anti-insulina, fijados a la pared de los tubos



Debido a que la insulina tiene varios determinantes antigénicos, se realiza una segunda incubación, añadiendo anticuerpos anti-insulina marcados con Ortofenileno Diamina (OPD), de tal manera que se forman complejos sandwich-insulina-OPD

La cantidad de los complejos formados es proporcional al contenido de insulina de la muestra.

Para eliminar el conjugado OPD no ligado, se efectúa una fase de lavado. Seguidamente, se añade el sustrato cromógeno (ABTS) determinando fotométricamente la actividad de OPD, ligada a la pared de los tubos.

Los valores obtenidos, se llevan a la curva patrón, elaborada con anterioridad.

Reactivos

- ✓ Tubos de plástico, recubiertos de anticuerpos monoclonales antiinsulina.
Capacidad de fijación aproximada 110 ng de insulina/tubo.

- ✓ Tampón de incubación
Tampón fosfato 40 mmol/l, pH= 7,0

- ✓ Conjugado anticuerpos anti-insulina-OPD
OPD \geq 3 U/ml.

- ✓ Estándar
Insulina en matriz bovina con las siguientes concentraciones expresadas en μ U/ml: 0,00; 23,20; 92,00; 180,00 y 275,00.

- ✓ Sustrato /tampón
Fosfato/citrato 100 mmol/l, pH 4,4 H₂O₂ (perborato sódico) 3,2 mmol/l

- ✓ Cromógeno
2,2-azino-di-(3-etil-benzotiazolina ácido sulfónico-6)- sal diamónica.
ABTS 1,9 mmol/l

Preparación de las muestras

Para la realización del análisis, se procede a la descongelación de las alícuotas de plasma de los distintos grupos de animales ya que se utiliza un método directo, sin extracción previa de la muestra.

Todos los reactivos utilizados, se mantuvieron a temperatura ambiente, como paso previo a su posterior uso.

Intervalo de medición

0-250 μ U de insulina/ml

Límite de detección

El límite de detección inferior, definido como $E + 3S$ del primer estándar (μ U/ml), es aproximadamente $< 3 \mu$ U/ml.

Preparación del ensayo

Después de la colocación de la cadena y alcanzar todos los reactivos la temperatura idónea (temperatura ambiente), se procede a dispensar manualmente 100 μ l de estándar, plasma control y muestras problema en los tubos correspondientes.

Se añade luego, de forma automática 1,0 ml de la solución de conjugado, procediéndose a una incubación durante 60 minutos a 25°C ó 70 minutos si la temperatura del laboratorio es menor de 25°C. Una vez pasado el tiempo de incubación, los tubos se lavan con solución de lavado de forma automática.

Posteriormente, se añade 1 ml de la solución sustrato-cromógeno, incubándose durante 30 minutos para que se produzca la reacción de color.

Pasado el tiempo de incubación, se procede a la medida de las densidades ópticas a una longitud de onda de 405 nm.

Por medio de un software específico (Boehringer Mannheim), se calculan, de una manera automática, las curvas estándar y las concentraciones, utilizando el factor de corrección apropiado, al igual que se realiza para las hormonas esteroides.

DETERMINACIÓN DE CLENBUTEROL

Se realizó el análisis del clenbuterol (plasmático y hepático) de las muestras siguiendo la técnica ELISA, puesta a punto en el Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad Complutense de Madrid (Blass , 1997).

Para determinar la concentración hepática de clenbuterol, se utilizaron macerados de los hígados de los animales de nuestra experimentación. Estos macerados se obtuvieron a partir de 0,5 g de hígado, procedente de cada animal, a los que se añadió 5 ml de CIH, 0,1N y cuya preparación fue realizada manualmente, con un homogeneizador de tejidos con émbolo de vidrio de 8 ml de capacidad (Pobel). La mezcla obtenida se centrifugó, (20 minutos, 6.000 r.p.m., 4°C) y se recogió el sobrenadante, que posteriormente se congeló hasta realizar el análisis pertinente.

Curva estándar

Se preparan nueve estándares, partiendo de la solución madre de clenbuterol, que tiene una concentración de 2 µg/ml (solución A). De esta solución se toman 25 µl y se añaden 975µl de plasma control 50 ng/ml (solución B).

Método

- 1.- Añadir a la placa con los anticuerpos 75 µl de plasma control, estándar o muestra problema por duplicado, según corresponda.
- 2.- Agitar 15 minutos a temperatura ambiente en agitador de placas.
- 3.- Añadir 25 µl de tampón EIA al pocillo A1.
- 4.- Añadir 25 µl de conjugado a la dilución requerida en tampón EIA.

- 5.- Agitar durante 10 minutos en el agitador de placas (Bioblock Scientific, Agitateur Microtitration 86247, Heidolph), a temperatura ambiente.
- 6.- Volcar el contenido de la placa y realizar 3 lavados consecutivos con solución de lavado. En cada pocillo se dispensan 250 μ l de Tween 20 al 0,005%.
- 7.- Añadir 75 μ l de TMB a cada pocillo con una pipeta multicanal.
- 8.- Agitar durante diez minutos.
- 9.- Añadir 50 μ l de solución de frenado (ácido sulfúrico al 10%) con una pipeta multicanal.
- 10.- Por último, se lee la placa a 450 nm.
- 11.- Procesado de los resultados.

Material

- ✓ Placas ELISA de poliestireno de 96 pocillos de alta adsorción (Biohit).
- ✓ Selladores adhesivos de acetato para placas (ICN Biomedicals Inc.).
- ✓ Pipetas automáticas de 10-100 μ l y de 200-1000 μ l (Eppendorf).
- ✓ Pipeta multicanal 8 canales de 50-250 μ l (Costar).
- ✓ Agitador Reax 2.000 (Heidolph).
- ✓ Agitador de placas (Heidolph).
- ✓ Tubos de ensayo de diferentes tamaños (Becton Dickinson).
- ✓ Puntas, de un sólo uso, para pipetas Eppendorf de 10-200 μ l y de 100-1.000 μ l.
- ✓ Lector automático ELISA (Biotek).
- ✓ Reloj cronómetro digital.

Reactivos

- ✓ Cloruro sódico: NaCl (Panreac).
- ✓ Fosfato de sodio dihidrógeno monohidrato: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck).
- ✓ Fosfato sódico: NaHPO_4 (Sigma).
- ✓ Tween 20 (Merck).
- ✓ Conjugado clenbuterol-peroxidasa (Departamento Fisiología Animal).
- ✓ TMB (Tetrametilbenzidina) sustrato K (Labsystems).
- ✓ Acido sulfúrico: H_2SO_4 (Panreac).

Soluciones tampón

Tampón EIA:

Para 1L de solución:

1. 2,758 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
2. 4,26 g de Na_2HPO_4 pH 7,0
3. 9,00 g de NaCl

Solución de lavado: (Tween-20 al 0,05 %)

50 ml de Tween-20 en 1L de agua purificada

Solución de frenado:

Acido sulfúrico al 10% en agua purificada

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el paquete estadístico BMDP (Biomedical Data Program = Programa de Tratamiento de Datos Biomédicos) (Dixon, 1992) en el Centro de Cálculo de Moncloa de la Universidad Complutense de Madrid.

El nivel de significación de los test estadísticos utilizados fue el del 95%, correspondiente a una $p < 0,05$.

1.- Análisis de la Varianza

Se realizó un Análisis de Varianza con medidas repetidas para cada uno de los parámetros determinados. Esta prueba nos permite comparar, indirectamente, varias medias aritméticas, por medio de la comparación directa de sus dispersiones y además nos permite comprobar la influencia que los factores grupo y tiempo tienen sobre nuestros parámetros. De esta forma se determinó:

1.1.- Efecto grupo: nos indica si existen diferencias, estadísticamente significativas, entre los grupos de animales de nuestra experimentación.

1.2.- Efecto tiempo: nos indica si existe una diferencia, estadísticamente significativa, entre los diferentes momentos de la experimentación.

1.3.- Interacción: nos indica si el efecto tiempo difiere de un grupo a otro.

2.- Test de Mann-Witney

Se realizó un análisis de diferencia de medias, no paramétrico, utilizando el test de Mann-Witney, que no impone ningún requisito a la distribución de las variables. Todos los valores determinados en nuestra experimentación se incluyeron para realizar este análisis.

ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO DEL HÍGADO

Se consideró conveniente realizar el estudio del hígado bajo dos puntos de vista, Microscopía óptica (MO) y Microscopía electrónica (ME), para procurar que éste fuera lo más completo posible y nos permitiera un diagnóstico preciso y exacto de los animales tratados, tomando siempre como referencia de los sanos a nuestros animales controles, es decir los que no habían consumido clenbuterol, ni clenbuterol asociado a dexametasona. Dicho estudio, fue llevado a cabo en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, perteneciente a la Universidad Complutense.

Microscopía óptica

Se decidió llevar a cabo el examen histológico para detectar la posible existencia de lesiones a nivel hepático. Para ello se siguieron distintos pasos:

- Hepatectomías de los animales utilizados, control y problema.
- Conservación de los órganos en formol al 10%.
- Preparación de los bloques de parafina procediendo de la manera siguiente:

- 1º- **Tallaje** de la muestra.
- 2º- **Procesado** de tejidos.
- 3º- **Corte** del bloque.
- 4º- **Montaje**.
- 5º- **Tinción** de la preparación.

1º- El **tallaje**, consiste en el corte o sección, con bisturí o escalpelo, de la zona del órgano que va a ser sometido a estudio.

2°- El **procesado**, comprende distintas fases en las que la muestra, introducida en las cápsulas de inclusión, se mantiene en formol, alcoholes de distintos grados y parafina a distintas temperaturas, todo ello, con la finalidad de producir como resultado final, la deshidratación del tejido, para posteriormente constituir lo que se llaman, los **bloques** que ya serán las piezas sobre las cuales se practicará el corte histológico. Todas estas operaciones tienen una duración aproximada de 12 horas y se realizan, introduciendo las cápsulas de inclusión con el órgano, en el procesador de tejidos (Autotecnicon). Esquemáticamente así:

- Se mantienen los bloques en formol al 10% hasta que se mete en el procesador, como mínimo, 12 horas.
- En formol al 10%, 2 horas a 40°C.
- En alcohol al 70%, durante 30 minutos a 40°C.
- En alcohol al 96%, durante 30 minutos a 40°C.
- En alcohol al 96%, durante 45 minutos a 40°C.
- En alcohol absoluto (100%), durante 40 minutos a 45°C.
- En alcohol absoluto (100%), durante 45 minutos a 40°C.
- En alcohol absoluto (100%), durante 45 minutos a 40°C.
- En xylol, durante 45 minutos a 40°C.
- En xylol, durante 45 minutos a 40°C.
- En parafina, durante 30 minutos a 60°C.

- En parafina, durante 30 minutos a 60°C.
- En parafina, durante 30 minutos a 60°C.
- En parafina, durante 30 minutos a 60°C.

Al día siguiente, ya se preparan los bloques introduciendo el tejido procesado en unos moldes sobre los cuales se vierte la parafina, con el dispensador correspondiente (P Selecta), metiéndolos en la nevera para que se enfríen. Es lo que se conoce con el nombre de **inclusión en parafina**.

- 3º- Una vez formado el bloque, se procede al corte del mismo con el microtomo (Anglia Scientific), a 4 µm. Las cuchillas utilizadas pertenecen a la casa comercial Jung Disposable Microtome Blades.
- 4º- Se monta la preparación en los portaobjetos (Objektträger 76 x 26 mm, Knittel Glaser, Geschliffen Mattrand): una vez realizado el corte, se lleva éste a un baño termostataado (Leica España S.A.) y se coge la preparación del baño con el portaobjetos.
- 5º- Posteriormente, se introducen en la estufa (P Selecta) para que se sequen a una temperatura de 60°C. También podrían secarse a temperatura ambiente, pero tardaría más.
- 6º- El penúltimo paso, consiste en la tinción de las preparaciones, bajo campana extractora, para lo cual hemos empleado tres tipos diferentes:
 - ✓ Hematoxilina-Eosina
 - ✓ Tricrómico de Masson
 - ✓ Plata metenamina

Hematoxilina-Eosina (HE):

- 1°- Desparafinación con xylol, durante 10 minutos.
- 2°- Hidratación con alcohol absoluto, alcohol de 96° y agua (se realiza en un pase por cada uno).
- 3°- Introducción de la preparación en Hematoxilina de Carazzi, durante 8 minutos.
- 4°- Lavado con agua, durante 10 minutos, para eliminar la Hematoxilina.
- 5°- Introducción de la preparación en Eosina escasos segundos, que es lo que se denomina 1 pase.
- 6°- Deshidratación con alcohol de 96°, alcohol absoluto, xylol y montaje de la preparación y se espera hasta que se seque la misma.

Tricrómico de Masson:

- 1°- Desparafinar e hidratar.
- 2°- Hematoxilina de Harris, 5 minutos.
- 3°- Lavar en agua, 3 ó 4 minutos.
- 4°- Rojo Mallory, 2 minutos.
- 5°- Lavar en agua.

- 6º- Un pase por ácido fosfomolibdico al 1%.
- 7º- Verde luz, 2 minutos.
- 8º- Lavar en agua.
- 9º- Deshidratar y montar.

Plata Metenamina:

- 1º- Desparafinar e hidratar.
- 2º- Ácido periódico al 0,5%, durante 10 minutos.
- 3º- Lavar en agua.
- 4º- Ácido crómico al 5%, durante 45 minutos.
- 5º- Lavar en agua.
- 6º- Bisulfito sódico al 2%, durante 2 minutos.
- 7º- Lavar en agua.
- 8º- Se mete la preparación en la estufa a 60°C, hasta que toma un aspecto de color tabaco una vez que se ha añadido lo siguiente:
 - ✓ Plata metenamina 50 cc.
 - ✓ Nitrato de plata al 5%, 2.5 cc.
 - ✓ Borax al 5%, 3 cc.

- 9°- Lavar en agua destilada.
 - 10°- Cloruro de oro, 2 minutos.
 - 11°- Hiposulfito sódico, durante 2 minutos.
 - 12°- Lavar con agua destilada.
 - 13°- Hematoxilina, 2 minutos.
 - 14°- Un pase opcional, por Eosina.
 - 15°- Deshidratar y montar.
- 7°- El paso final de este proceso consiste en el montaje de la preparación utilizando un gel o bálsamo (Eukit), que es el responsable de que el cubreobjetos (Objektträger Knittel Glaser, Geschliffen Mattrand 50 x 25 mm) se adhiera a la superficie del porta y se deja secar a temperatura ambiente. De este modo se ha conseguido finalmente la preparación histológica.

Microscopía electrónica

Una vez realizado el diagnóstico de las muestras, donde los resultados obtenidos no indicaron la existencia de ningún tipo de lesión hepática a nivel de Microscopía óptica y para confirmarlo definitivamente, se procedió al estudio ultraestructural, basándonos en que si un tóxico queda almacenado en un órgano y no provoca lesiones detectables a nivel histológico, es aconsejable el estudio ultraestructural de dicho órgano, dada la importancia de la actividad del citocromo P₄₅₀ sobre los ribosomas y su estructura, pudiendo, en el caso de existir lesión, alterar la conformación de éstos y aumentar la actividad del citocromo.

La Microscopía electrónica (ME) consta de dos partes claramente diferenciadas:

- ✓ ME de Barrido
- ✓ ME de Transmisión

En la ME de Barrido se realiza un estudio superficial del órgano, aunque eso sí, más profundo que en la óptica. El aparataje empleado fue el siguiente:

- ✓ Procesador, para deshidratar en acetona.
- ✓ Cámara de punto crítico para llevar a cabo la desecación.
- ✓ Sistema de metalización de muestras (Sputtering) con oro o platino.
- ✓ Campana de vacío para almacenar las muestras.
- ✓ Destilador.
- ✓ Microtomo donde se realizan los llamados cortes "semifinos" de 1 micra.
- ✓ Microscopio electrónico de barrido.

En cuanto a la conservación de la muestra, a diferencia de la Microscopía óptica, aquí en vez de emplear formol, se utiliza glutaraldehído al 3%, y, por supuesto, a la hora de tomar la muestra, ésta se fracciona en secciones lo más pequeñas posible. El resto de los pasos, en cuanto a corte etc. es igual que lo detallado anteriormente.

En la M.E. de transmisión es donde se lleva a cabo realmente el estudio ultraestructural. Para ello se necesitan:

- ✓ Procesador automático para realizar la inclusión en plástico.
- ✓ Fijadores con glutaraldehído al 25% y nitróxido de Osmio, que a la vez tiñe.
- ✓ Ultramicrotomo para cortes ultrafinos, de 60-90 nanómetros.
- ✓ Estufas para la polimerización de los bloques.
- ✓ Destilador.

✓ Microscopio electrónico de transmisión.

En cuanto a los pasos a seguir, son los siguientes:

- 1°- INCLUSIÓN de las muestras: se recogen fragmentos de hígado muy diminutos y lo más rápidamente posible, después de la muerte del animal.
- 2°- FIJACIÓN en glutaraldehído al 6% en tampón durante 1-2 horas.
- 3°- Lavado en Buffer Milloning a pH 7,3 con sacarosa, 2 veces.
- 4°- POSTFIJACIÓN en Osmio al 1%, durante 30 minutos a una hora.
- 5°- Lavado, con tampón con sacarosa, 2 veces durante 10 minutos.
- 6°- DESHIDRATACIÓN:
 - ✓ en etanoles crecientes, 10 minutos en cada uno. Dos pases de diez minutos, por etanol absoluto.
 - ✓ Óxido de propileno, 2 pases de 10 minutos.
 - ✓ Óxido de propileno + Epon (1:1) de 2-3 horas a toda la noche.

Una vez realizados estos pasos, se ponen en las cápsulas con la mezcla y se incuban durante 24 horas como mínimo, a 60°C. También se puede poner de 4 a 5 horas a 40°C de temperatura y luego aumentar ésta a 65°C hasta 24 horas.

Los reactivos empleados para la formación de los distintos tampones son los siguientes:

Buffer Milloning

Se emplean los reactivos que se indican a continuación:

✓ Fosfato monosódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$)	22,6 g en 1.000 ml de agua destilada
✓ Hidróxido sódico (NaOH)	2,52 g en 100 ml de agua destilada
✓ Glucosa	5,4 g en 100 ml de agua destilada
✓ Cloruro Cálcico (CaCl_2)	0,5 g en 50 ml de agua destilada

A) Mezclar:

Solución fosfato monosódico	830 ml
Solución hidróxido sódico	170 ml

De esta mezcla, se retiran 100 ml y a los 900 restantes se les añade:

Solución glucosa	100 ml
Solución cloruro	5 ml

Posteriormente, se ajusta el pH a 7,3

B) Para lavador, se añaden 68,4 g de Sacarosa por cada 1.000 ml

Mezcla de Mullenhauer 1963 Epon-araldita

✓ Epon 812	25 ml
✓ Araldita (502, 6005 epoxyresina)	15 ml
✓ Endurecedor (DDSA)	55 ml
✓ Plastificador (Dibutiltalato)	2-4 ml
✓ Acelerador (DMP-30)	1,5- 3 /ml

En cuanto a los métodos de tinción empleados, destacamos:

*** Acetato de uranilo**

A) Solución saturada al 11 %. Reposar 24 h.

B) Solución al 2% en agua destilada, filtrado y centrifugado.

Preparar en el día.

*** Citrato de plomo**

✓ Nitrato de Plomo ($\text{Pb NO}_3)_2$	1,33 g
✓ Citrato de Sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	2 hidrato, 1,76 g
	5 1/2 hid., 2,14 g
✓ Agua desmineralizada	30 ml

Se agita fuertemente durante 30 minutos con intervalos de descanso de un minuto, hasta la total formación de nitrato en citrato de plomo.

Posteriormente se añade Hidróxido Sódico 1N (8 ml) y se ajusta el pH a 12.

Se realizaron fotos de las preparaciones, tanto de Microscopía óptica como electrónica.

RESULTADOS

I- Validación de la técnica EIA de Competición para hormonas esteroides y clenbuterol**1. Diluciones óptimas de anticuerpo**

Los resultados obtenidos tras las pruebas realizadas para calcular la dilución óptima de trabajo a emplear de anticuerpo para EIA de competición fueron:

★ Anti-cortisol:	1/16.000.
★ Anti corticosterona:	1/16.000.
★ Anti-progesterona:	1/16.000.
★ Anti-17β-estradiol:	1/2.000.
★ Anti-androstenodiona:	1/16.000.
★ Anti-clenbuterol:	1/4.000.

2. Diluciones óptimas de conjugado

Este factor es crítico para una puesta a punto óptima del método. Los resultados fueron los siguientes:

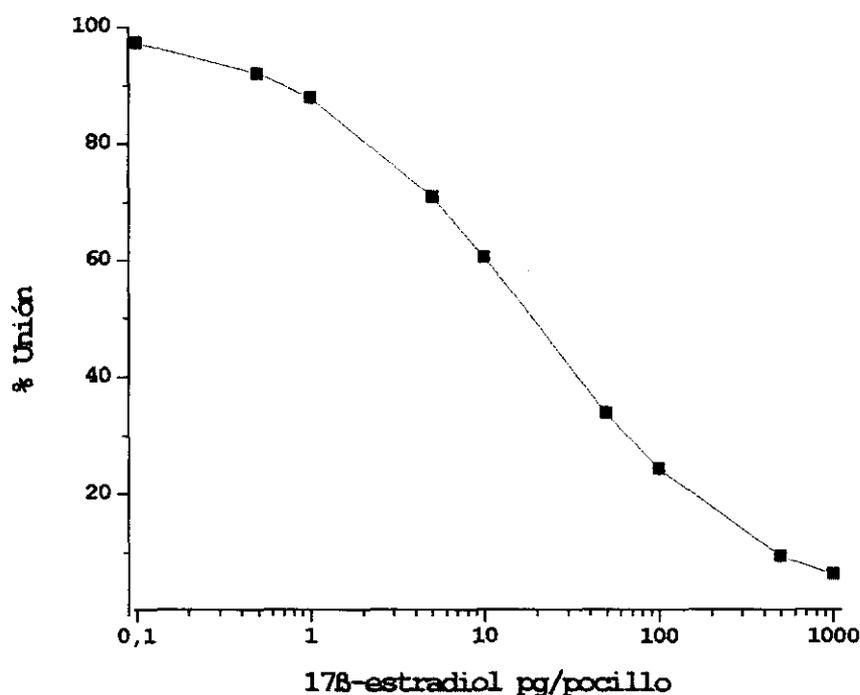
★ Conjugado HRP-cortisol:	1/160.000.
★ Conjugado HRP-corticosterona:	1/160.000.
★ Conjugado HRP-progesterona:	1/160.000.
★ Conjugado HRP-17β-estradiol:	1/20.000.
★ Conjugado HRP-androstenodiona:	1/160.000.
★ Conjugado HRP-clenbuterol:	1/10.

3. Trazado de las curvas patrón:

El trazado de las curvas patrón para cada una de las hormonas esteroides, se realizó como ya se ha dicho mediante un software especialmente diseñado por el Departamento de

Informática de la Universidad de Davis, U.S.A.

En la siguiente figura, se encuentra reflejada la curva patrón de 17 β -estradiol.



4. **Parámetros de validación del EIA de competición para las hormonas cortisol, corticosterona, progesterona, 17 β -estradiol, androstenodiona y clenbuterol.**

- *Precisión y repetibilidad*

Cálculo de los coeficientes intra e interensayo: %CV= Desviación estándar/media x 100. En nuestro caso los %CV intra e inter-ensayo fueron siempre menores del 10% para todas las hormonas estudiadas y para clenbuterol.

- *Exactitud*

Se completa mediante el cálculo de los porcentajes de recuperación de distintas cantidades conocidas de hormona o clenbuterol, añadidas a un pool de muestras.

Los porcentajes de recuperación oscilaron en todos los casos entre 85-95%.

- Sensibilidad

Se determinó de dos formas:

- Límites de Detección:

- ✓ Cortisol: 3 pg/pocillo.
- ✓ Corticosterona: 3 pg/pocillo.
- ✓ Progesterona: 1 pg/pocillo.
- ✓ 17β-estradiol: 0,3 pg/pocillo.
- ✓ Androstenodiona: 6 pg/pocillo.
- ✓ Clenbuterol: 0,008 ng/ml.

- Sensibilidad al 50% de unión:

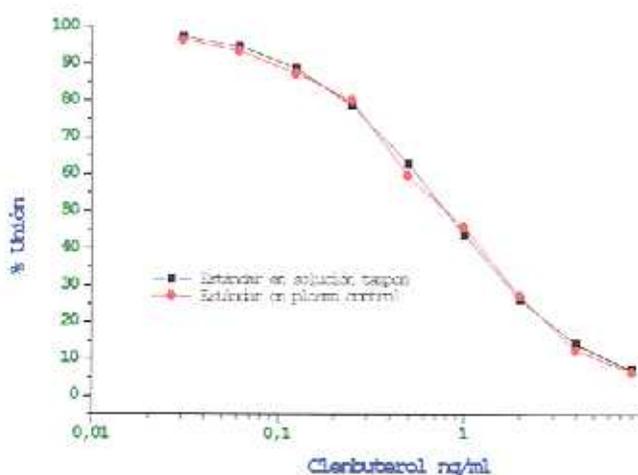
- ✓ Cortisol: 58,82 pg/pocillo.
- ✓ Corticosterona: 58,82 pg/pocillo.
- ✓ Progesterona: 83,17 pg/pocillo.

- ✓ 17 β -estradiol: 8,3 pg/pocillo.
- ✓ Androstenodiona: 83 pg/pocillo.

- Prueba de paralelismo

Esta prueba cobra especial importancia en la validación ya que establece la posible interferencia del plasma sobre los resultados. Para su cálculo, se diluyen sucesivamente muestras de plasma procedentes de animales tratados con clenbuterol en el mismo plasma control que se utiliza para la preparación de las curvas estándar y se realiza un análisis estadístico entre las concentraciones medidas en la muestra diluida y las teóricas que se espera encontrar.

Realizado el análisis de regresión entre las concentraciones esperadas y las esperadas obteniéndose unos coeficientes de regresión del 97 % y 89% ($p < 0,001$). En la siguiente figura esta representada la curva de paralelismo del clenbuterol.



En el caso de las hormonas esteroideas no se realizó esta validación, ya que se extrajeron las distintas hormonas del plasma de las ratas.

GANANCIA DE PESO DE LOS ANIMALES

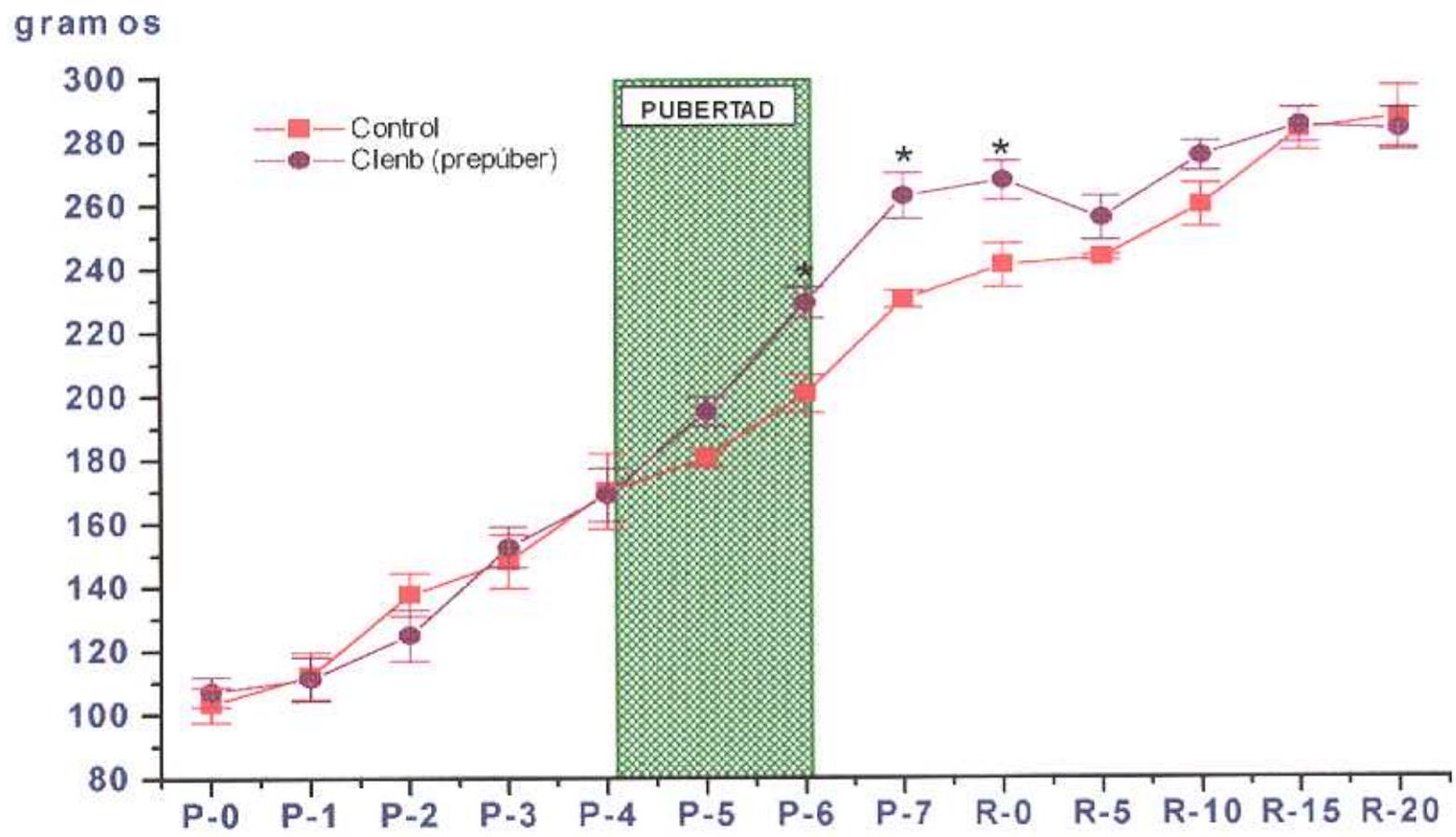
Gráfica y Tabla 1: Muestran la evolución de los pesos (g) (media \pm esm) de los animales prepúberes tratados con clenbuterol (1mg/kg), en relación a los controles, sin que aparezcan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), durante la pubertad, entre ambos grupos, hasta el final de la misma, momento a partir del cual comienzan a distanciarse los tratados ($p < 0,05$) (valores correspondientes a las pesadas 6 y 7 del tratamiento (P-6 y P-7), y en el momento de la retirada (R-0) del mismo). A partir de los cinco días del periodo de supresión, los pesos de los animales de ambos grupos, se equiparan, de tal forma que terminan por igualarse, en las dos últimas semanas, es decir transcurridos entre 15 y 20 días de la supresión del tratamiento.

Gráfica y Tabla 2: Reflejan, los resultados obtenidos referentes a los pesos (g) tras el tratamiento con clenbuterol (1mg/kg) en animales adultos. Se aprecia un manifiesto incremento de peso en los animales tratados ($p < 0,01$), que se mantiene constante desde la tercera semana de tratamiento (P-3), hasta el momento de la retirada (R-0). A partir de aquí, los animales tratados comienzan a perder peso y se igualan a los controles, al igual que ocurría con los animales prepúberes.

Gráfica y Tabla 3: Aparecen representados los pesos alcanzados por los animales adultos tras un tratamiento combinado de clenbuterol (1mg/kg) y dexametasona (0,1 mg/kg). Como se puede apreciar, el grupo tratado con la asociación de clenbuterol y dexametasona, experimenta una elevación de peso, estadísticamente significativa, con respecto a los animales utilizados como control ($p < 0,01$) desde la primera semana de tratamiento (P-1), para mantenerse durante las semanas posteriores, continuando esa evolución progresiva en cuanto a ganancia de peso se refiere, incluso durante el periodo de retirada, en que se distancian considerablemente ($p < 0,01$) de los controles, siendo en este periodo la ganancia de peso superior a los animales tratados con clenbuterol sólo.

Tabla 1.- Pesos (gr) de los animales prepúberes del experimento con clenbuterol (media \pm E.S.M.)

	Control	Clenbuterol
P-0	103,45 \pm 5,45	107,47 \pm 4,67
P-1	112,34 \pm 7,34	111,34 \pm 6,89
P-2	137,84 \pm 6,70	125,03 \pm 7,95
P-3	148,22 \pm 8,44	152,65 \pm 6,28
P-4	170,13 \pm 11,90	169,00 \pm 8,29
P-5	180,69 \pm 2,85	195,13 \pm 4,61
P-6	200,61 \pm 5,83	229,37 \pm 4,76
P-7	230,33 \pm 2,67	262,76 \pm 7,28
R-0	240,91 \pm 6,86	267,60 \pm 6,15
R-5	243,38 \pm 0,83	255,78 \pm 6,94
R-10	259,75 \pm 6,87	275,21 \pm 4,76
R-15	283,47 \pm 6,68	284,79 \pm 5,55
R-20	287,45 \pm 9,65	283,46 \pm 6,45

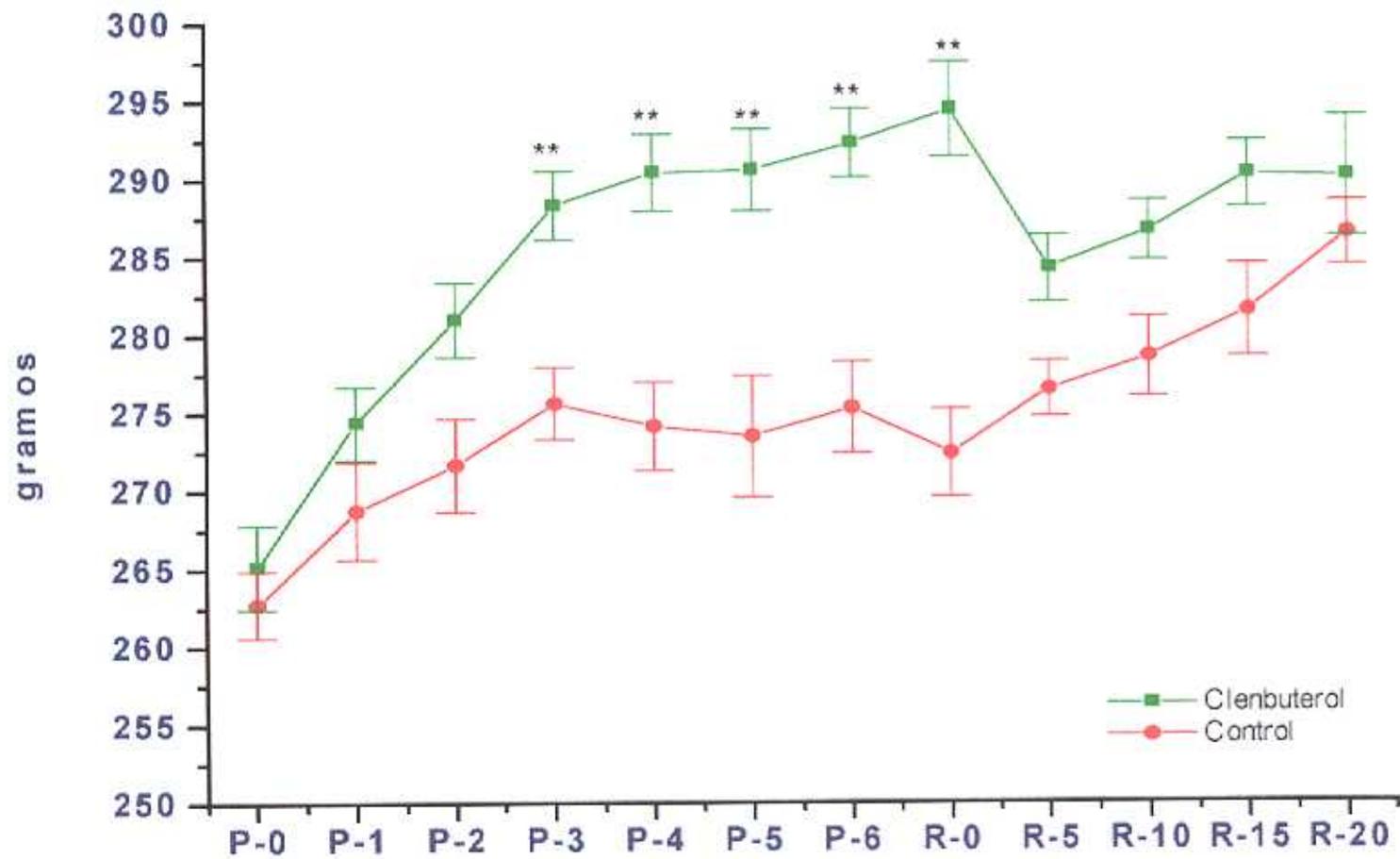


* $p < 0.05$

Gráfica 1.- Pesos (gr) en animales prepúberes *controles* (■) y tratados con *clenbuterol* (●).

Tabla 2.- Pesos (gr) de los animales del experimento con clenbuterol (media \pm E.S.M.)

	Control	Clenbuterol
P-0	262,80 \pm 2,13	265,19 \pm 2,69
P-1	268,80 \pm 3,13	274,41 \pm 2,37
P-2	271,71 \pm 2,99	281,03 \pm 2,37
P-3	275,68 \pm 2,30	288,37 \pm 2,20
P-4	274,18 \pm 2,82	290,43 \pm 2,47
P-5	273,51 \pm 3,88	290,59 \pm 2,62
P-6	275,36 \pm 2,95	292,28 \pm 2,20
R-0	272,43 \pm 2,81	294,44 \pm 3,02
R-5	276,50 \pm 1,77	284,23 \pm 2,14
R-10	278,56 \pm 2,55	286,65 \pm 1,89
R-15	281,54 \pm 2,98	290,25 \pm 2,13
R-20	286,46 \pm 2,05	290,08 \pm 3,85

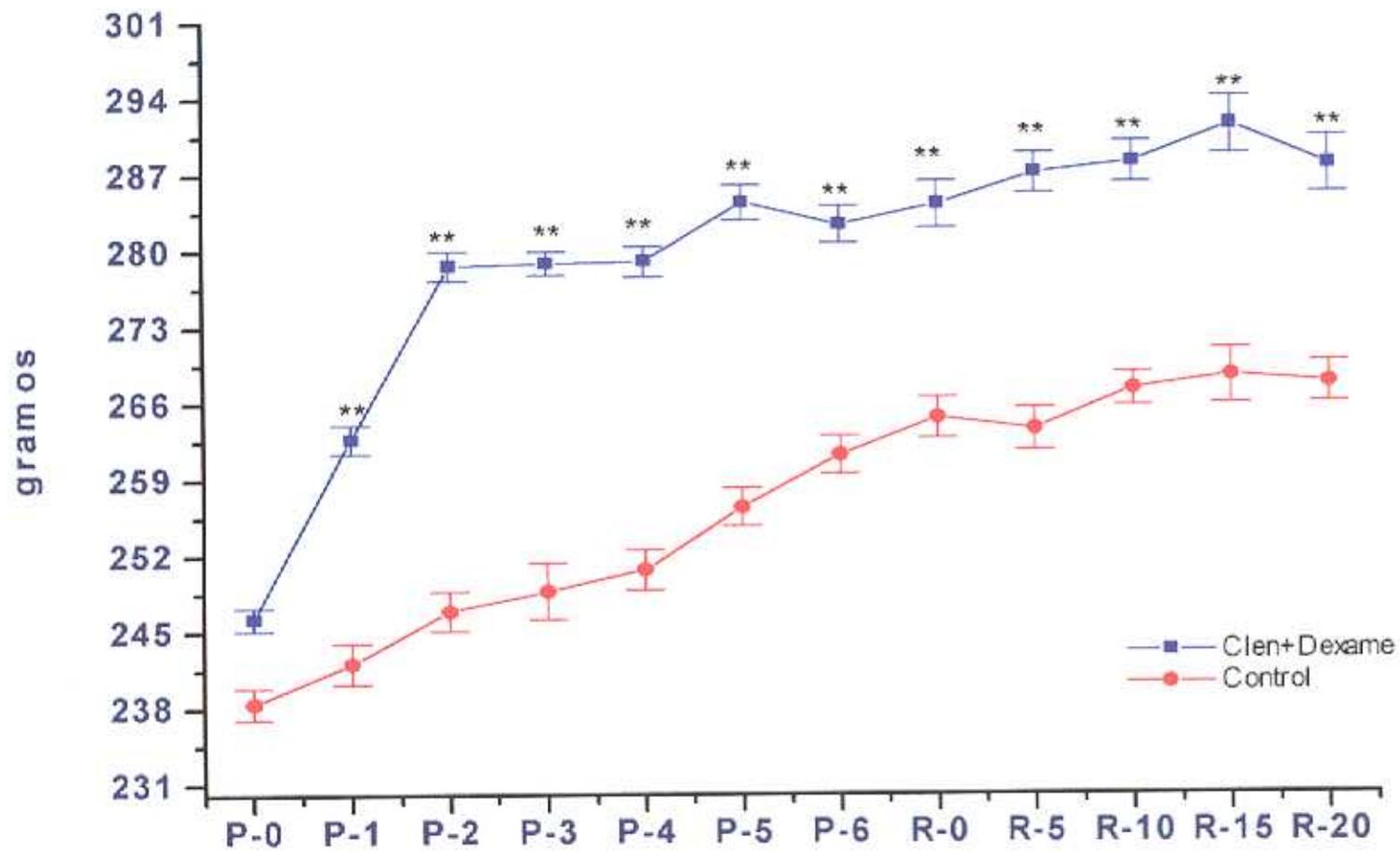


** p < 0,01

Gráfica 2.- Pesos (gr) en animales adultos *controles* (■) y tratados con *clenbuterol* (■)

Tabla 3.- Pesos (gr) de los animales del experimento con clenbuterol + dexametasona (media \pm E.S.M.)

	Control	Clenbuterol + Dexametasona
P-0	238,50 \pm 1,45	246,26 \pm 1,05
P-1	242,13 \pm 1,90	262,75 \pm 1,33
P-2	246,98 \pm 1,79	278,69 \pm 1,34
P-3	248,80 \pm 2,61	278,91 \pm 1,09
P-4	250,76 \pm 1,86	279,08 \pm 1,38
P-5	256,49 \pm 1,76	284,45 \pm 1,59
P-6	261,25 \pm 1,78	282,40 \pm 1,65
R-0	264,68 \pm 1,88	284,23 \pm 2,14
R-5	263,60 \pm 1,98	287,09 \pm 1,88
R-10	267,26 \pm 1,54	288,08 \pm 1,86
R-15	268,45 \pm 2,55	291,47 \pm 2,62
R-20	267,87 \pm 1,86	287,82 \pm 2,60



** p < 0,01

Gráfica 3.- Pesos (gr) en animales adultos *controles* (■) y tratados con *clenbuterol + dexametasona* (■).

VARIACIONES DEL PESO DEL HÍGADO

Gráfica y Tabla 4: Se puede contemplar la evolución de los pesos (g) (media \pm esm) del hígado de los animales prepúberes, en el transcurso de la fase experimental. Los pesos están expresados en forma de porcentajes relativos con respecto al peso corporal total. Se observa que, desde la primera semana de tratamiento con clenbuterol (1mg/kg), el peso hepático de los animales tratados es muy similar al de los controles, o ligeramente inferior, careciendo de significación estadística ($p > 0,05$). Estas oscilaciones se mantienen en el periodo puberal y, cuando cesa éste, se produce un considerable descenso en los pesos hepáticos, de los animales tratados ($p < 0,01$), que comprende desde la última semana de tratamiento (P-7), hasta la retirada del mismo (R-0). A partir de entonces, (R-5 y R-10), la diferencia entre ambos grupos aunque es menor, continúa teniendo significación ($p < 0,05$). Posteriormente (R-15 y R-20), los animales se recuperan, y los pesos de los hígados en los dos grupos se igualan.

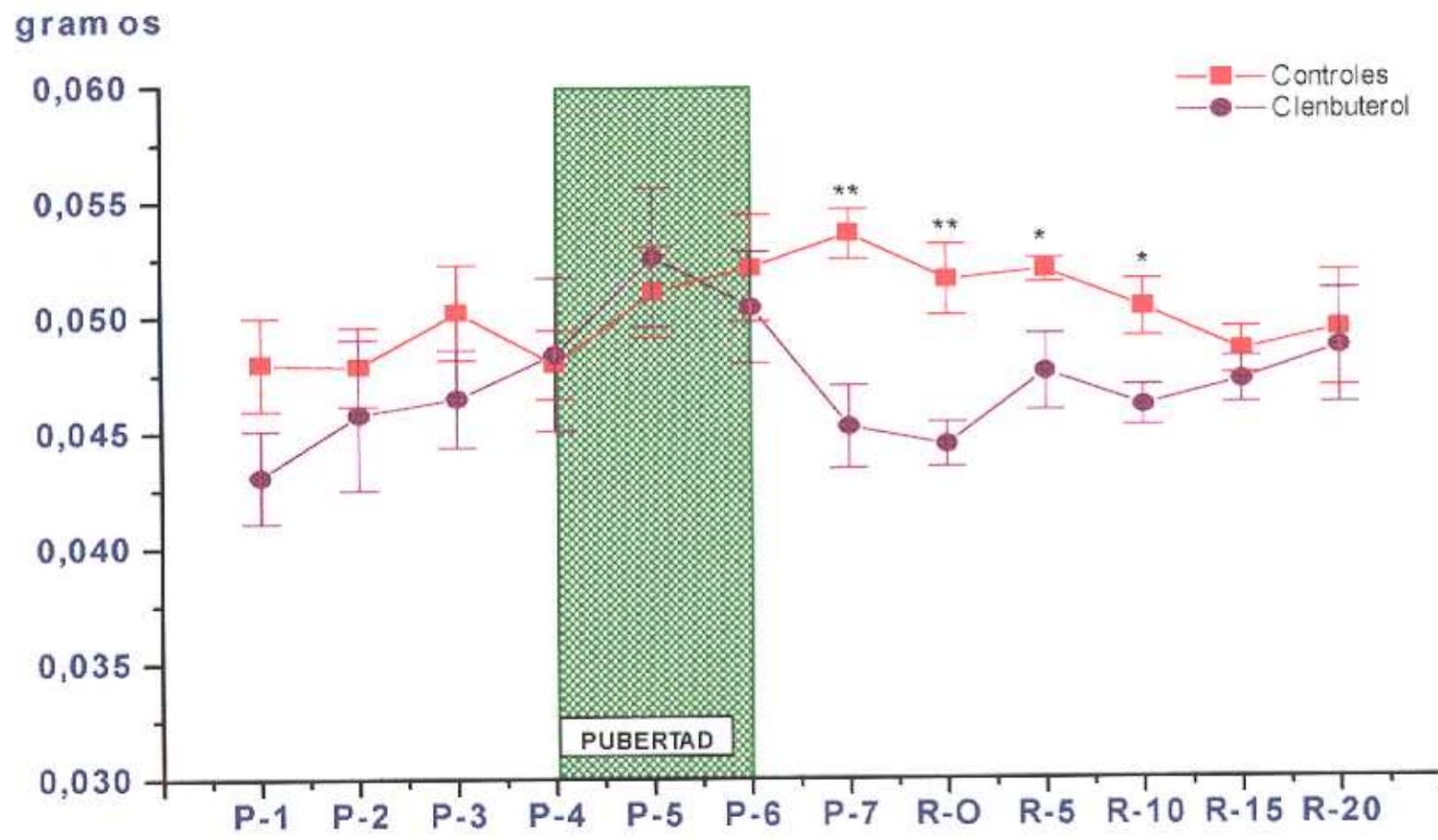
Gráfica 4-a: En esta gráfica, se puede apreciar, con mayor detalle, las diferencias existentes entre los pesos del hígado de los animales prepúberes, tratados con clenbuterol (1mg/kg) y los controles. Es de destacar la reducción en el peso de los animales tratados, estadísticamente significativa ($p < 0,01$), desde el inicio del periodo de supresión (R-0) hasta diez días después (R-10). En los últimos 10 días, hasta completar la retirada (R-15 y R-20), los pesos hepáticos de los animales se igualan, indicando una clara recuperación de los mismos, una vez terminado el periodo de exposición al medicamento.

Gráfica 5 y Tabla 5: Se pueden contemplar las variaciones de los pesos hepáticos de los animales adultos (expresados en porcentajes de gramos con respecto al peso corporal total) sometidos a los tratamientos con clenbuterol (1mg/kg), y clenbuterol con dexametasona, en las distintas fases de la retirada del medicamento. Como podemos observar, existen diferencias, estadísticamente significativas ($p < 0,01$), entre los distintos grupos con respecto a los controles, hasta transcurridos 10 días de la

supresión del tratamiento, en que se igualan los pesos del hígado de todos los animales, hasta el día 20, en que concluyen los experimentos. Hemos de destacar que, en el grupo tratado con clenbuterol + dexametasona, los pesos hepáticos se aproximan más tempranamente a los de los controles, que en el caso de los animales tratados única y exclusivamente con clenbuterol, aunque siguen manteniendo diferencias significativas con respecto a éste, y a partir del día 15 de la retirada (R-15) se igualan definitivamente al control.

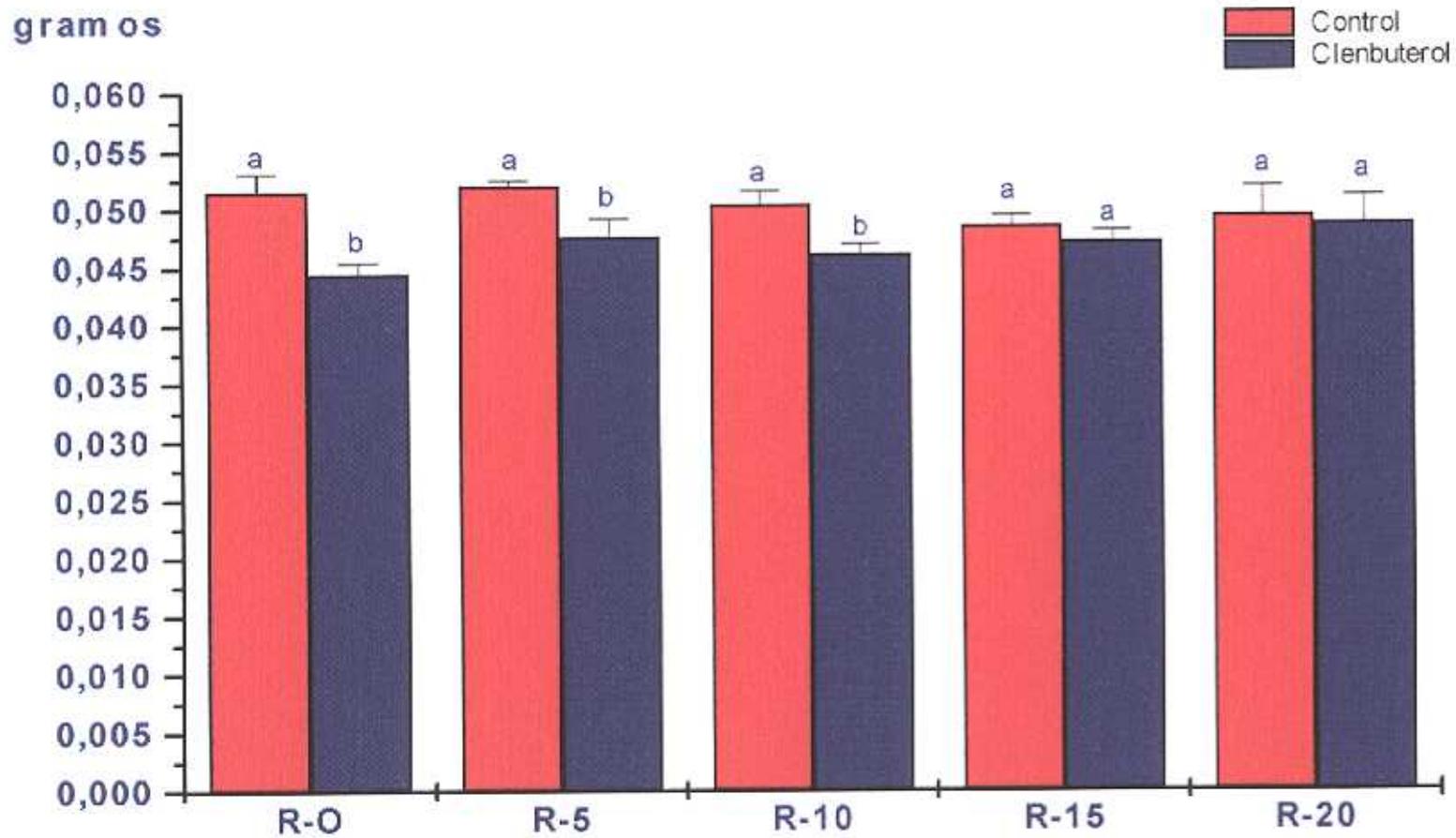
Tabla 4.- Pesos (gr) de los hígados de los animales prepúberes del experimento con clenbuterol (media \pm E.S.M.)

	Control	Clenbuterol
P-1	0,048 \pm 0,002	0,043 \pm 0,002
P-2	0,047 \pm 0,001	0,045 \pm 0,003
P-3	0,050 \pm 0,002	0,046 \pm 0,002
P-4	0,047 \pm 0,001	0,048 \pm 0,003
P-5	0,051 \pm 0,001	0,052 \pm 0,003
P-6	0,052 \pm 0,002	0,050 \pm 0,002
P-7	0,053 \pm 0,001	0,045 \pm 0,001
R-0	0,051 \pm 0,001	0,044 \pm 0,001
R-5	0,052 \pm 0,000	0,047 \pm 0,001
R-10	0,050 \pm 0,001	0,046 \pm 0,001
R-15	0,048 \pm 0,001	0,047 \pm 0,001
R-20	0,049 \pm 0,002	0,048 \pm 0,002



* p < 0,05
 ** p < 0,01
 *** p < 0,001

Gráfica 4.- Pesos hepáticos (gr) en animales prepúberes *controles* (■) y tratados con *clenbuterol* (●).



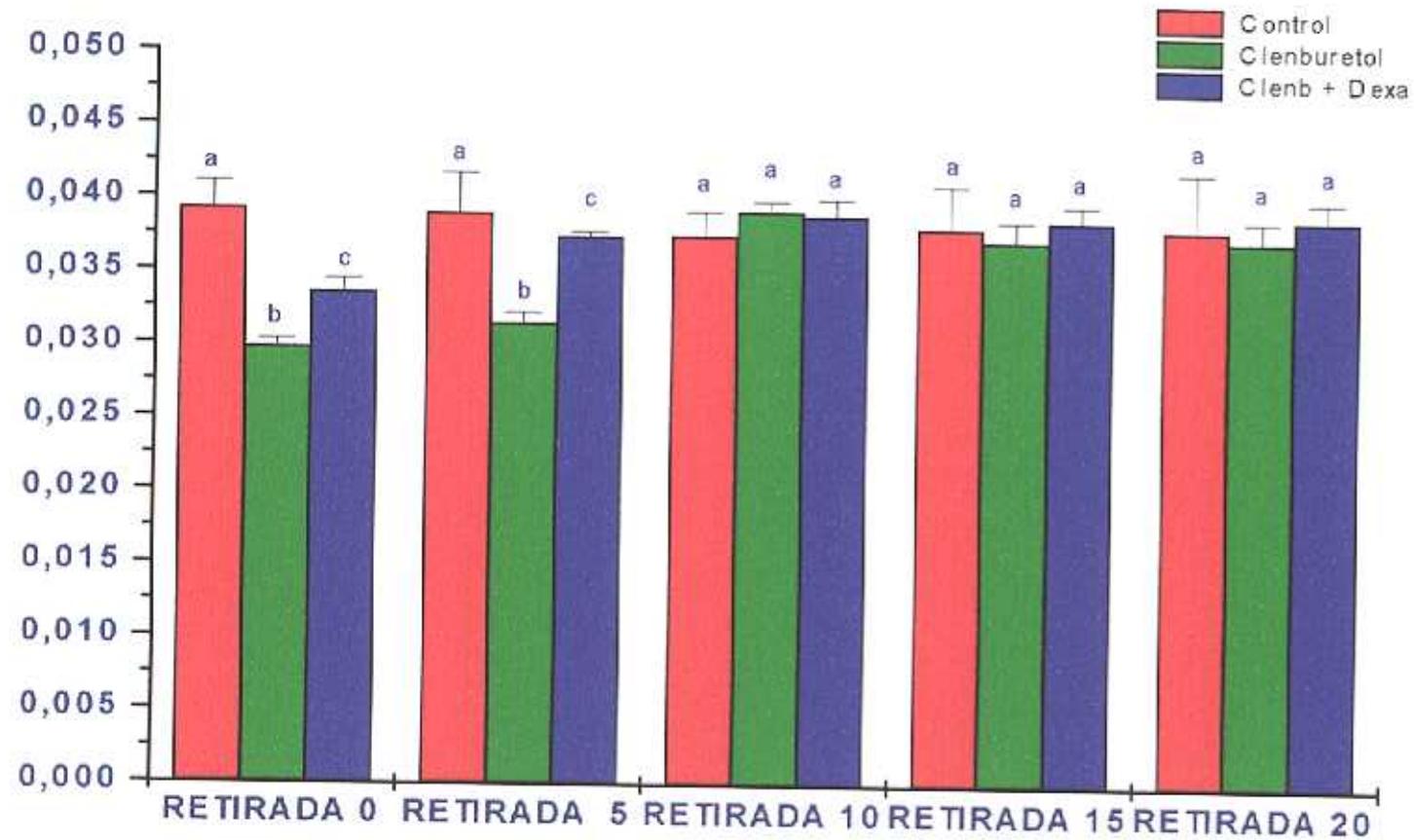
Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$)

Gráfica 4a.- Pesos hepáticos (gr) en animales prepúberes en los distintos tratamientos: *control* (■), *clenbuterol* (■).

Tabla 5.- Pesos (gr) de los hígados en los diferentes experimentos

	Control	Clenbuterol	Clenbuterol + Dexametasona
RETIRADA 0	0,039 ± 0,001	0,029 ± 0,001	0,03353 ± 0,00092
RETIRADA 5	0,038 ± 0,002	0,031 ± 0,001	0,03736 ± 0,00034
RETIRADA 10	0,037 ± 0,001	0,039 ± 0,001	0,03886 ± 0,00112
RETIRADA 15	0,038 ± 0,002	0,037 ± 0,001	0,03855 ± 0,00108
RETIRADA 20	0,037 ± 0,003	0,037 ± 0,001	0,03874 ± 0,00125

gramos



Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$)

Gráfica 5.- Pesos hepáticos (gr) en animales adultos en los periodos de retirada de los distintos tratamientos: *control* (■), *clenbuterol* (■) y *clenbuterol + dexametasona* (■).

CONCENTRACIONES DE CLENBUTEROL

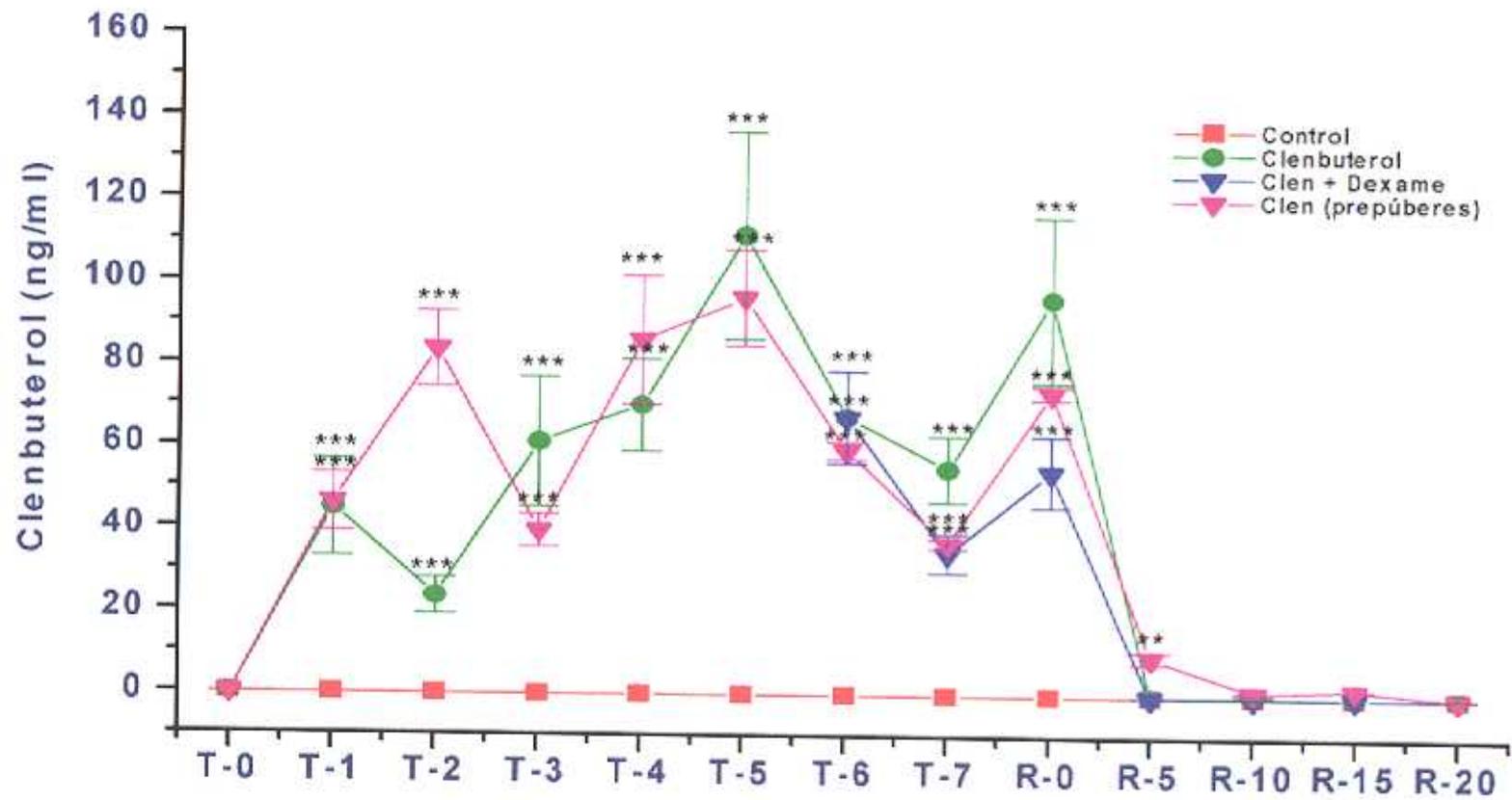
Gráfica 6 y Tabla 6: Representación gráfica de las concentraciones plasmáticas de clenbuterol, expresadas en ng/ml, obtenidas en los distintos tratamientos. Podemos observar que, tras partir de los muestreos basales de sangre, en los tres grupos tratados ($p > 0,05$) (prepúberes y adultos con clenbuterol, y adultos con clenbuterol y dexametasona) y el grupo control, se aprecian, a partir de la primera toma de sangre (T-1), diferencias con clara significación estadística ($p < 0,001$) en todos ellos, con respecto al control, casi de forma paralela. Los animales prepúberes experimentan una caída de dichas concentraciones en las tomas 3 y 7 (T-3 y T-7), mientras que en los adultos esto sucede en la segunda toma de sangre. A partir de la T-3, la evolución, en cuanto a la absorción plasmática de clenbuterol se refiere, es prácticamente similar en ambos grupos, aunque es de destacar que los adultos, alcanzan concentraciones ligeramente superiores. A partir de la T-6 todos los grupos tratados (tanto prepúberes como adultos con clenbuterol o éste asociado a dexametasona) experimentan una brusca disminución de dichas concentraciones ($p < 0,001$). En el grupo tratado con la asociación de clenbuterol y dexametasona, los niveles plasmáticos de clenbuterol se ven considerablemente reducidos, justo en el día de la retirada ($p < 0,001$). Este descenso, pero en ambos grupos, se hace más patente a los cinco días de la retirada (R-5), por lo que la significación, con respecto al control ($p < 0,01$), es ligeramente inferior. A partir de este momento, ya no se detecta clenbuterol en plasma, en ninguno de los grupos.

Gráfica 7 y Tabla 7: En esta gráfica, aparecen representadas las concentraciones hepáticas de clenbuterol, en los animales adultos que han sido sometidos a los tratamientos con clenbuterol (1mg/kg) y la asociación de éste con la dexametasona, durante el periodo de supresión o retirada del tratamiento. Mientras que en la R-0 las concentraciones de ambos grupos son exactamente iguales ($< 0,5 \mu\text{g}/\text{mg}$) y por tanto no existe significación estadística ($p > 0,05$), a partir de la R-5 se aprecian claras diferencias ($p < 0,01$) entre los grupos tratados con clenbuterol y clenbuterol + dexametasona, siendo claramente

inferiores, las concentraciones hepáticas en éste último. A partir de la R-10, las diferencias, en cuanto a las concentraciones, son menores ($p < 0,05$), y se igualan en los últimos diez días (R-15 y R-20), indicando una total eliminación del clenbuterol almacenado en el hígado en ambos grupos.

Tabla 6.- Concentraciones plasmáticas de *clenbuterol* (ng/ml) en los diferentes tratamientos.

	Control	Clenbuterol	Clenbuterol + Dexametasona	Clenbuterol prepúberes
T-0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		0,00 ± 0,00
T-1	0,00 ± 0,00	45,02 ± 11,86		46,35 ± 7,05
T-2	0,00 ± 0,00	23,67 ± 4,37		83,69 ± 9,22
T-3	0,00 ± 0,00	61,18 ± 15,73		39,65 ± 3,96
T-4	0,00 ± 0,00	70,21 ± 11,22		86,04 ± 15,66
T-5	0,00 ± 0,00	111,50 ± 25,11		96,32 ± 11,69
T-6	0,00 ± 0,00	67,51 ± 11,11	67,51 ± 11,11	59,40 ± 2,09
T-7	0,00 ± 0,00	55,09 ± 8,00	34,56 ± 4,67	36,90 ± 1,14
R-0	0,00 ± 0,00	96,30 ± 20,03	54,57 ± 8,59	73,68 ± 1,56
R-5	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,06	0,07 ± 0,03	9,67 ± 1,45
R-10	0,00 ± 0,00	0,24 ± 0,19	0,00 ± 0,00	1,42 ± 0,13
R-15	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,18 ± 0,06
R-20	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,02

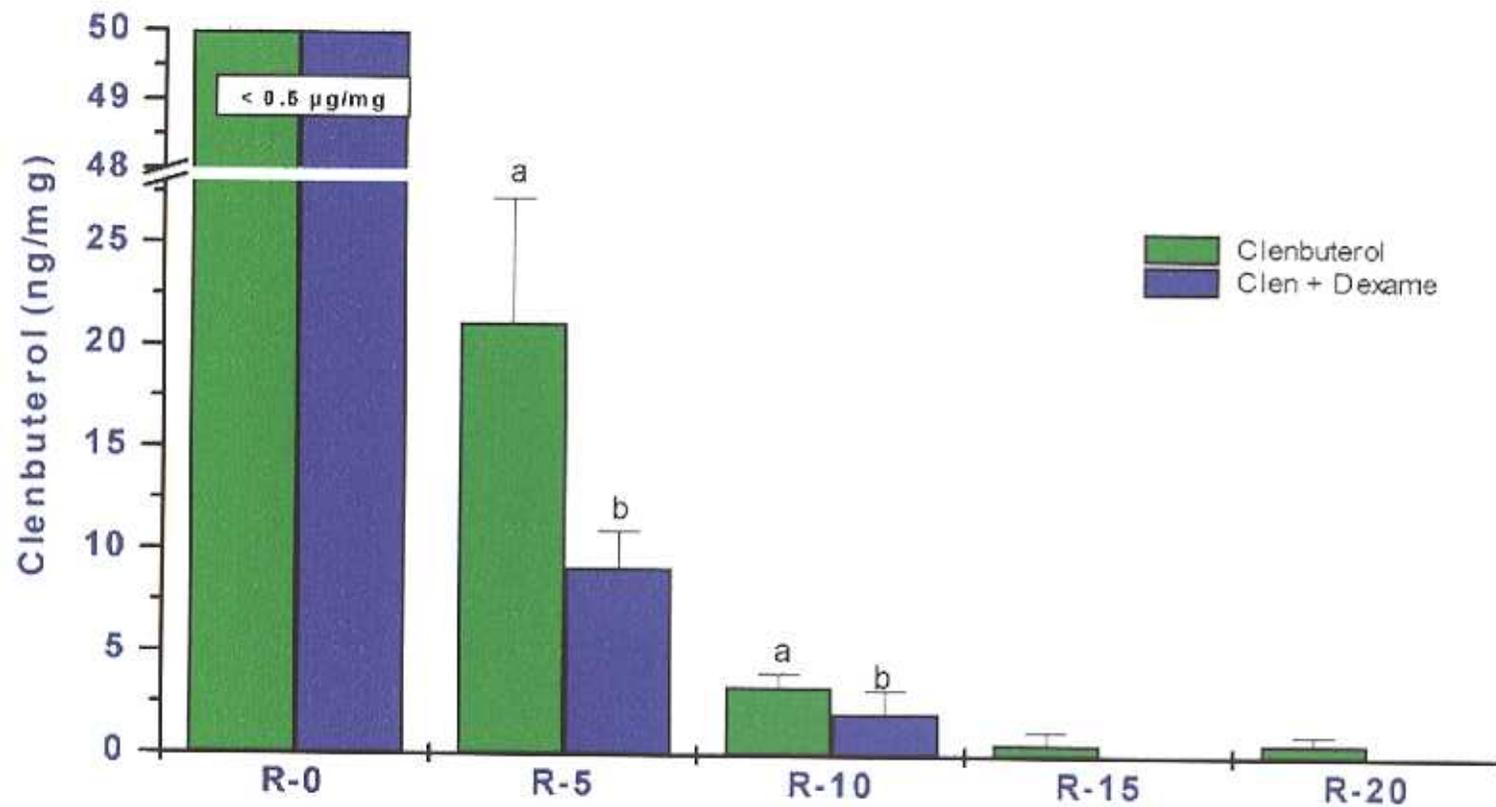


* $p < 0.05$
 ** $p < 0.01$
 *** $p < 0.001$

Gráfica 6.- Concentraciones plasmáticas de clenbuterol en los animales prepúberes y adultos en los distintos tratamientos: *control* (■), *clenbuterol* (■), *clenbuterol - dexametasona* (■) y prepúberes (■).

Tabla 7.- Concentraciones de *clenbuterol* (ng/mg) en hígado en los diferentes experimentos

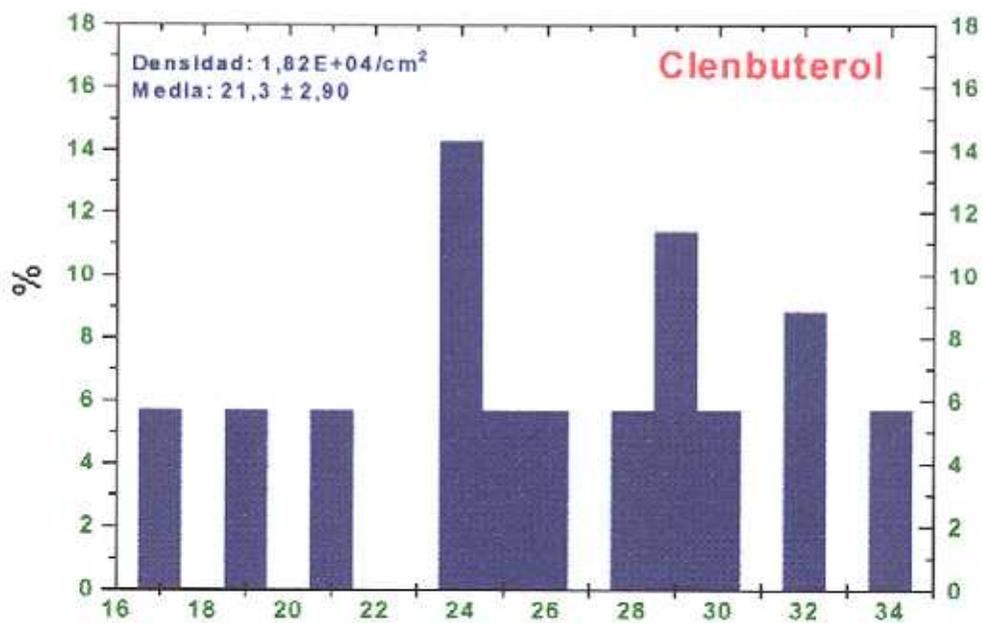
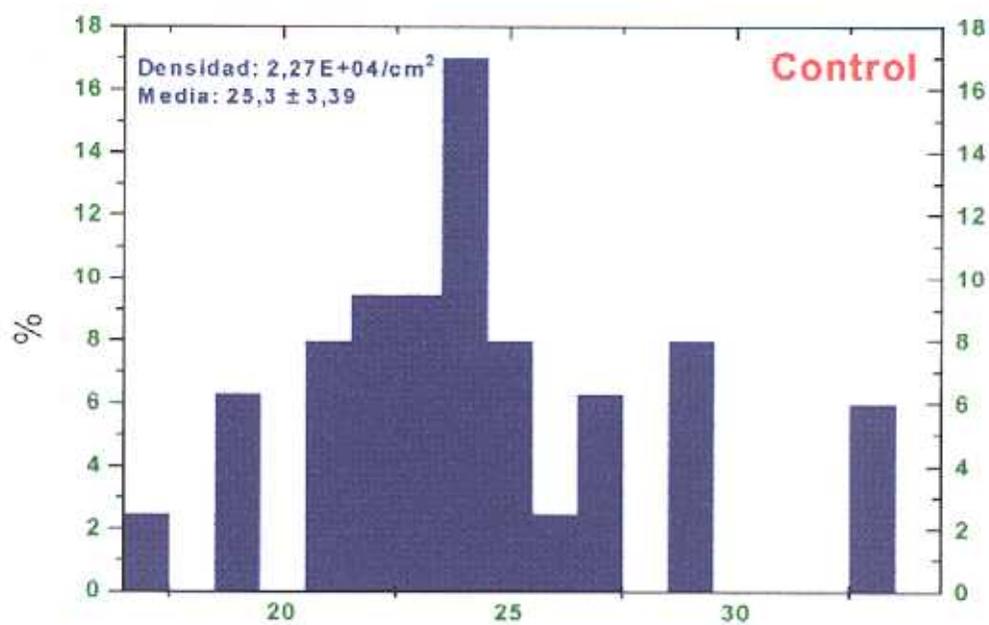
	Control	Clenbuterol	Clenbuterol + Dexametasona
RETIRADA 0	0,00 ± 0,00	> 50	> 50
RETIRADA 5	0,00 ± 0,00	21,14 ± 6,09	9,15 ± 1,80
RETIRADA 10	0,00 ± 0,00	3,36 ± 0,66	2,08 ± 1,11
RETIRADA 15	0,00 ± 0,00	0,60 ± 0,60	0,00 ± 0,00
RETIRADA 20	0,00 ± 0,00	0,66 ± 0,40	0,00 ± 0,00



Gráfica 7.- Concentraciones hepáticas de clenbuterol en los animales adultos tratados con: *clenbuterol* (■) y *clenbuterol + dexametasona* (■).

MORFOMETRÍA HEPÁTICA

Gráfica n° 8: Histograma que representa el tamaño de los hepatocitos de los animales tratados con clenbuterol (1 mg/kg) y el de los controles. Se aprecia una disminución en el tamaño de los hepatocitos de los tratados con clenbuterol, respecto a los controles.



Gráfica 8.- Morfometría de los hepatocitos de los animales tratados con clenbuterol y los animales controles.

ESTRUCTURA Y ULTRAESTRUCTURA HEPÁTICAS

Fotografía 1: Aspecto histológico del hígado de una rata Long-Evans prepúber tratada con clenbuterol (1mg/Kg) en el comienzo del periodo de supresión. Se puede observar normalidad completa en sus estructuras, apreciándose la típica disposición radial de los hepatocitos, conductos biliares y venas centrales. La técnica de tinción empleada es Hematoxilina-Eosina. (Ob. 200x).

Fotografía 2: Microfotografía de una sección del hígado de una rata prepúber tratada con clenbuterol, transcurridos diez días de la retirada (Ob. 100x) teñido con HE. Se aprecia con mayor detalle la disposición radial de los hepatocitos. Al no existir tabiques de tejido conjuntivo, la diferenciación lobular no es tan clara como en otras especies, pero ello es característico en la rata. Como podemos observar, no existen lesiones, lo que es indicativo de que el clenbuterol, en principio, no altera la morfología hepática.

Fotografía 3: Muestra una sección del hígado de una rata Long-Evans adulta tratada con clenbuterol a una dosis de 1mg/kg, en el día cero de la retirada del tratamiento. Se pueden apreciar en detalle conductos biliares, vena centrolobulillar y espacios porta cuya integridad histológica está intacta. Tinción empleada HE. (Ob. 200x.).

Fotografía 4: Podemos observar el hígado de una rata Long-Evans adulta tratada con clenbuterol (1mg/kg) a los diez días de la retirada del tratamiento. Se aprecian signos evidentes de regeneración hepática destacando la presencia de hepatocitos binucleados de distinta morfología y tamaño, mayor activación de las células de Kupffer, pero en ningún caso son indicativos de alteración hepática. Tinción HE. (Ob. 10x).

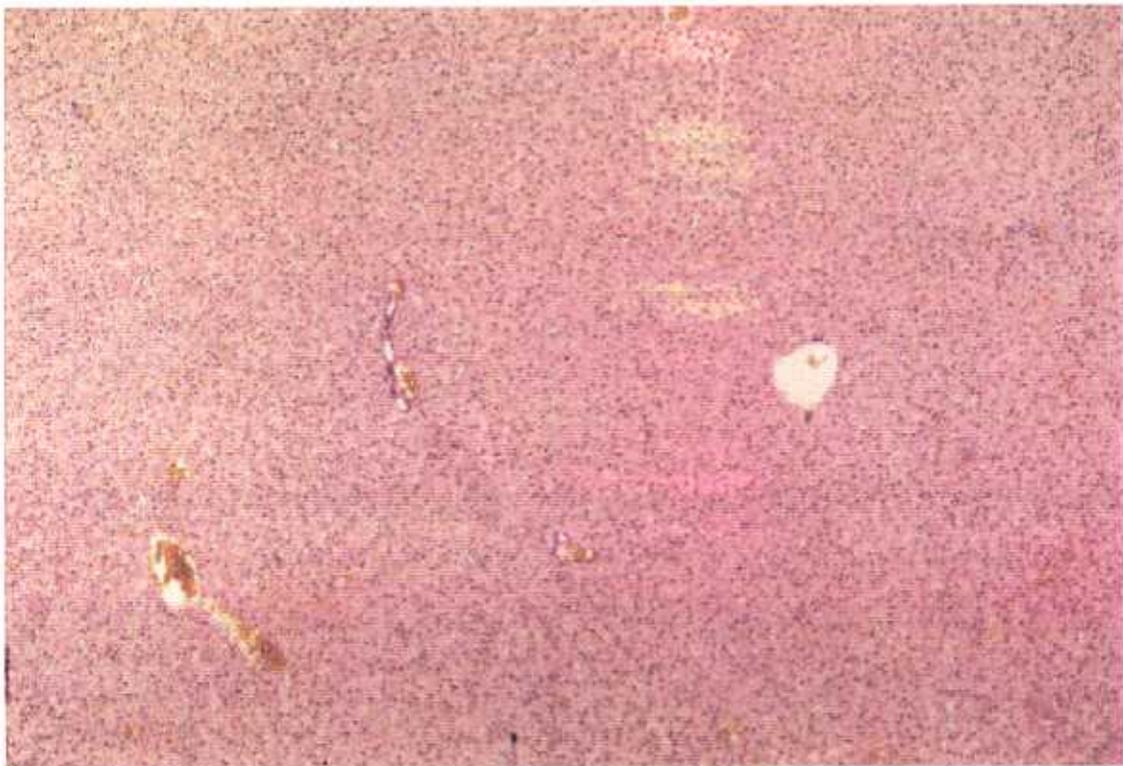
Fotografías 5 y 6: Muestran el hígado de una rata Long-Evans tratada con la asociación de clenbuterol y dexametasona, en el día cero de la retirada, a distintos aumentos (Ob. 50x y 10x, respectivamente). Persiste la normalidad estructural, destacando la presencia de conductos biliares, espacio porta, vena central, células de Kupffer y disposición radial de los hepatocitos. La técnica de tinción empleada es Hematoxilina-Eosina.

Fotografía 7: Muestra el aspecto ultraestructural de los hepatocitos de una rata Long-Evans adulta tratada con clenbuterol (1mg/kg). Se puede apreciar con claridad dos núcleos voluminosos, nucleolos, mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y partículas de glucógeno.

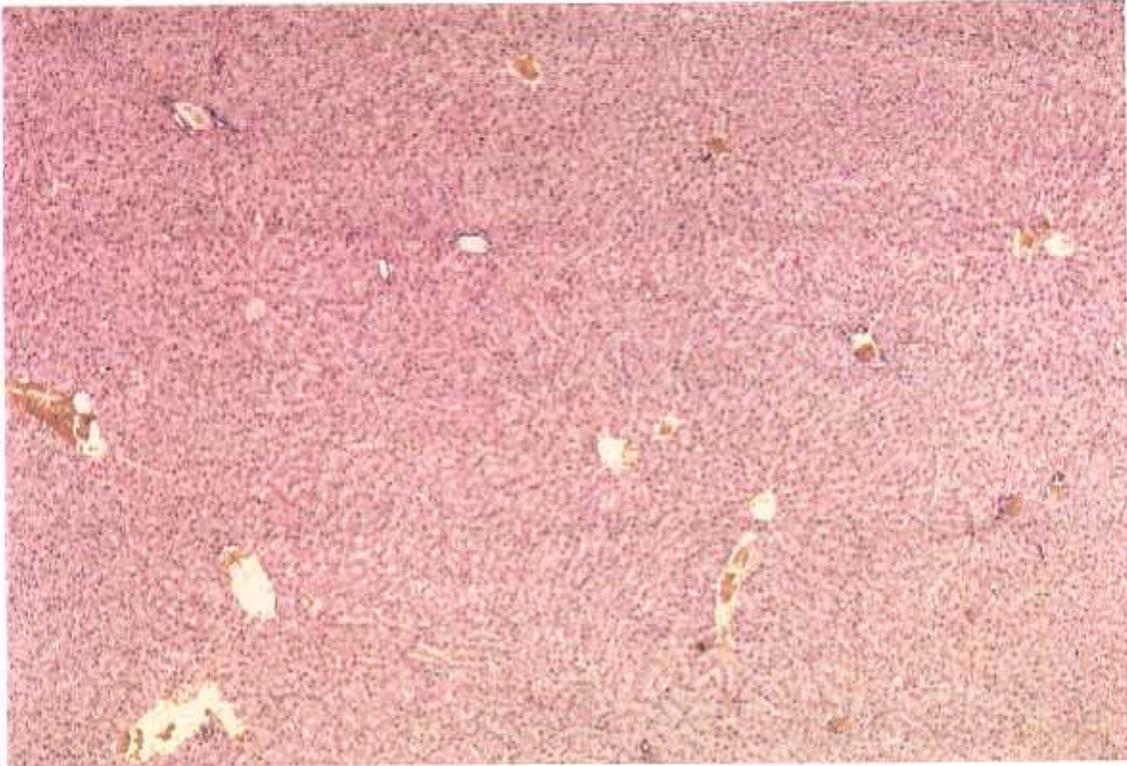
Fotografía 8: Se distinguen con mayor detalle, todas las estructuras señaladas en la fotografía 7.



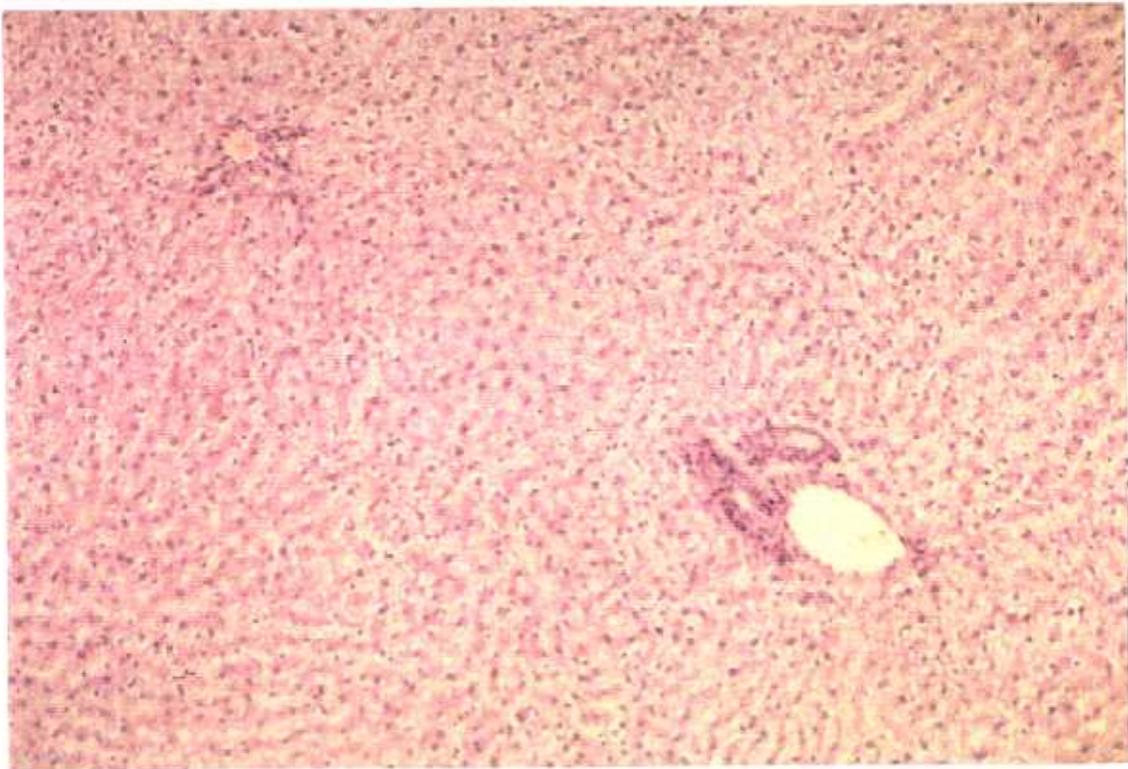
FOTOGRAFIA 1



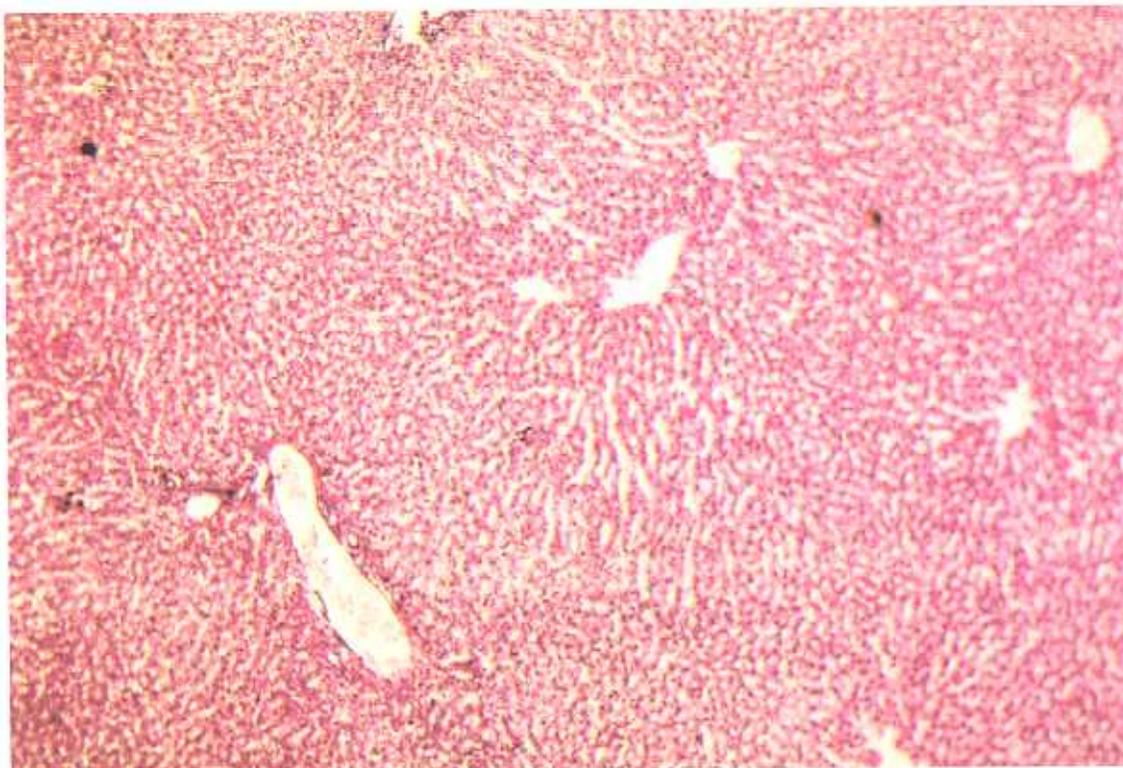
FOTOGRAFIA 2



FOTOGRAFIA 3



FOTOGRAFIA 4



FOTOGRAFIA 5



FOTOGRAFIA 6



FOTOGRAFIA 7



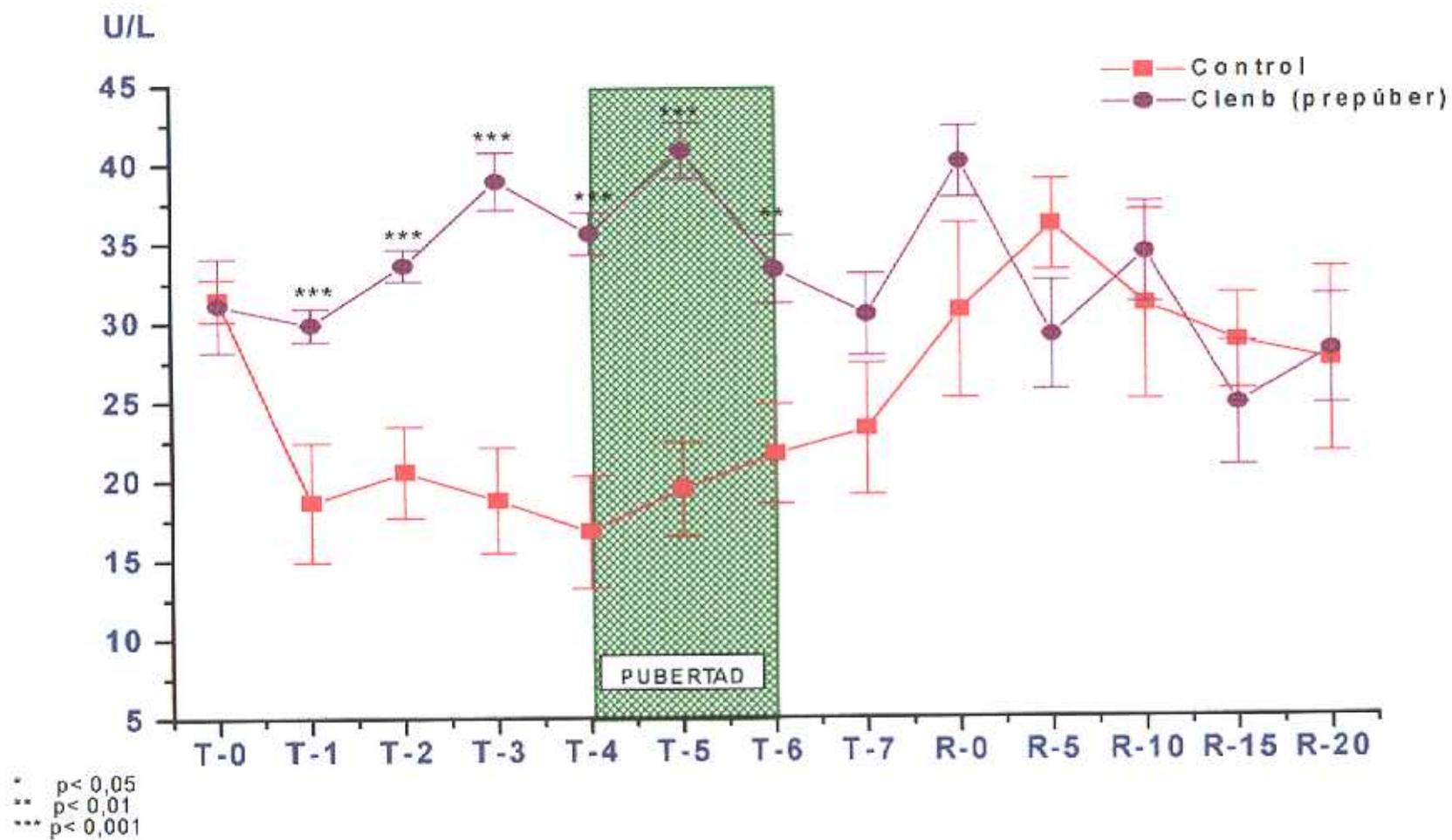
FOTOGRAFIA 8

DETERMINACIONES HORMONALES**INSULINA**

Gráfica 9 y Tabla 8: Aparecen representadas las concentraciones plasmáticas (media \pm esm) de insulina en los animales prepúberes sometidos al tratamiento con clenbuterol. Están expresadas en U/L. Se aprecia desde la primera toma de sangre (T-1) una elevación progresiva ($p < 0,001$) de las concentraciones plasmáticas de insulina hasta alcanzar los máximos niveles en la 5ª semana de tratamiento (T-5). En la sexta semana, que es cuando finaliza la pubertad, los niveles de insulina presentan una disminución, estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Este descenso persiste durante la séptima semana, momento a partir del cual, y coincidiendo con el comienzo del periodo de supresión, se producen alternativamente, elevación y descenso de dichos niveles, en los animales tratados, pero que carecen de significación estadística ($p > 0,05$) hasta transcurridos diez días de la retirada (R-10) en que comienzan a equipararse a los controles, para igualarse definitivamente al finalizar el periodo de supresión (R-20).

Tabla 8.- Concentraciones plasmáticas (media \pm E.S.M.) de *insulina* (U/L) en los animales prepúberes.

	Control	Clenbuterol
T 0	31,50 \pm 1,33	31,16 \pm 2,97
T 1	18,70 \pm 3,78	29,91 \pm 1,06
T 2	20,59 \pm 2,88	33,65 \pm 1,01
T 3	18,80 \pm 3,33	38,94 \pm 1,82
T 4	16,79 \pm 3,56	35,61 \pm 1,35
T 5	19,46 \pm 2,98	40,82 \pm 1,79
T 6	21,68 \pm 3,13	33,31 \pm 2,15
T 7	23,24 \pm 4,14	30,45 \pm 2,58
R-O	30,67 \pm 5,51	40,06 \pm 2,25
R-5	36,10 2,88	29,11 \pm 3,42
R-10	31,02 5,98	34,32 \pm 3,18
R-15	28,68 3,04	24,75 \pm 3,92
R-20	27,50 5,82	28,13 \pm 3,45



Gráfica 9.- Concentraciones plasmáticas de insulina (U/L) en animales prepúberes *controles* (■) y tratados con *clenbuterol* (●).

GLUCOCORTICOIDES

Gráfica 10 y Tabla 9: Muestran las concentraciones plasmáticas de corticosterona (ng/ml) (media \pm esm) en los animales prepúberes sometidos al tratamiento con clenbuterol. Se produce una elevación, estadísticamente significativa, en los animales tratados, desde la primera semana ($p < 0,05$) hasta la finalización del tratamiento ($p < 0,001$), reflejada en la T-7. Las máximas concentraciones de corticosterona se alcanzan a la quinta semana del mismo (T-5) ($p < 0,001$). En el momento de la retirada (R-0), se produce una caída brusca de dichas concentraciones, equiparándose a las de los controles.

Gráfica 11 y Tabla 10: Reflejan las concentraciones plasmáticas de corticosterona (ng/ml) (media \pm esm) tanto en los animales prepúberes como en los adultos sometidos a los distintos tratamientos. Se puede observar que, a partir de la segunda semana (T-2) se produce una elevación de dichas concentraciones, estadísticamente significativa ($p < 0,001$), en todos los grupos con respecto al grupo control, persistiendo hasta transcurridos cinco días (R-5) de la retirada del tratamiento.

Gráfica 11a: Representan las concentraciones plasmáticas de corticosterona (ng/ml) (media \pm esm) de los animales adultos sometidos a los tratamientos con clenbuterol, o asociado éste a la dexametasona, durante el periodo de retirada. Se produce una elevación de los niveles de corticosterona, estadísticamente significativa ($p < 0,01$), durante los 5 primeros días de la retirada. A partir de entonces (R-10) se igualan las concentraciones de corticosterona a las de los controles, tanto en el grupo tratado con clenbuterol, como en el de la asociación de éste a la dexametasona.

Gráfica 12 y Tabla 11: Muestran las concentraciones de cortisol (ng/ml) (media \pm esm) en animales prepúberes tratados con clenbuterol. Desde la primera semana de tratamiento, se produce una elevación de las mismas, estadísticamente significativa ($p < 0,001$). A partir de T-6 (finaliza la pubertad) descienden los niveles ($p < 0,01$), aunque en el día

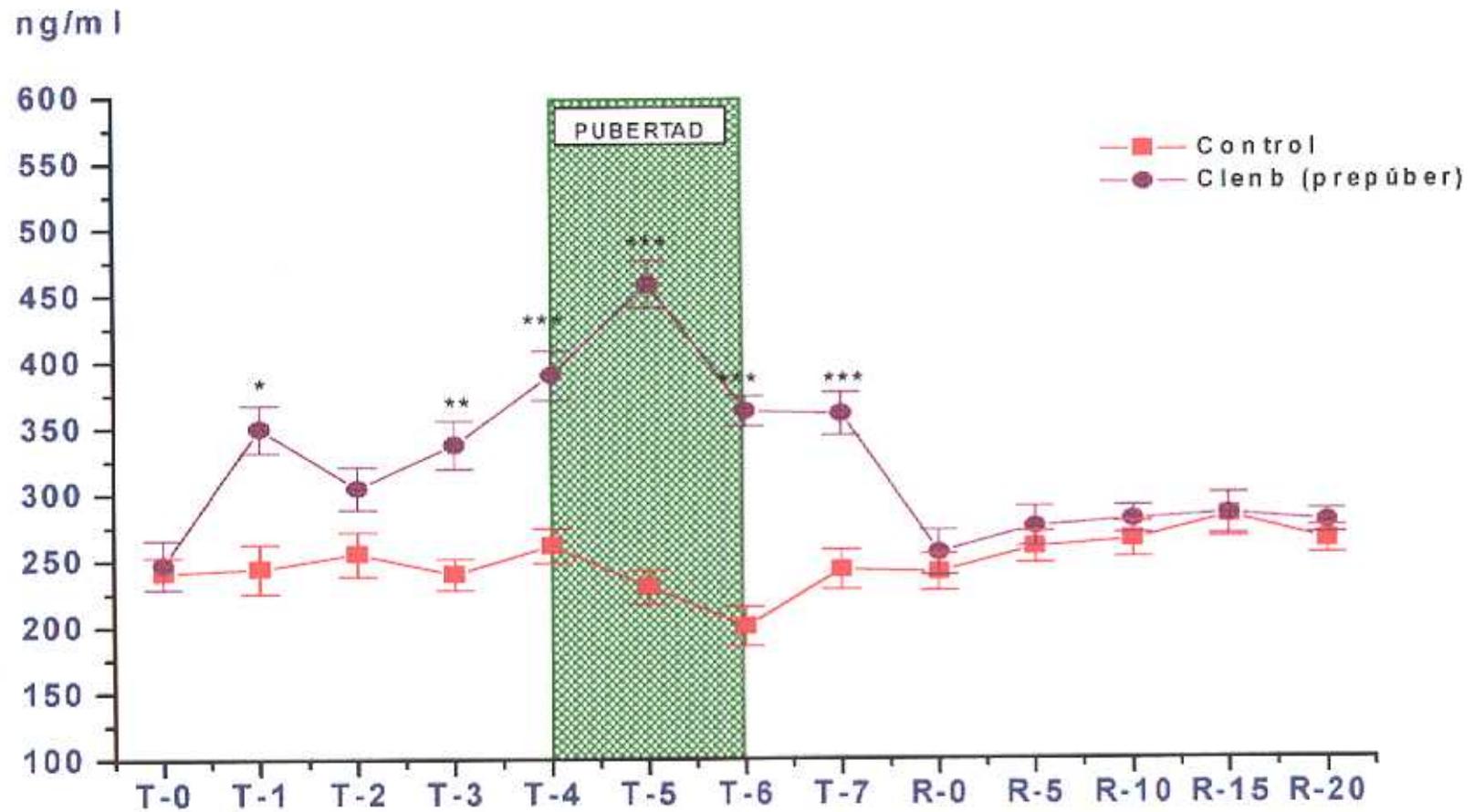
de la retirada, se produce una brusca elevación ($p < 0,001$), que va remitiendo a los cinco días ($p < 0,01$), hasta igualarse a los controles.

Gráfica 13 y Tabla 14: Indican las concentraciones plasmáticas (ng/ml) (media \pm esm) de cortisol en animales prepúberes y adultos en los distintos tratamientos. Es de destacar, a partir de la primera semana (T-1) una elevación de dichas concentraciones, con un alto nivel de significación estadística ($p < 0,001$). Como en el caso de la corticosterona, esta elevación se mantiene incluso tras el periodo de retirada (R-5). A partir de entonces (R-10), se igualan los valores plasmáticos de cortisol a los de los controles, en todos los grupos.

Gráfica 13a: Se ven reflejadas las concentraciones plasmáticas de cortisol (ng/ml) (media \pm esm) de los animales adultos en los periodos de retirada y sometidos a los tratamientos de clenbuterol sólo y asociado al corticoide dexametasona. Se observa una elevación de dichos niveles en los primeros cinco días de la retirada del tratamiento con significación estadística intergrupos ($p < 0,01$). En la R-0 los grupos tratados son estadísticamente significativos respecto al control, pero no entre ellos, alcanzando mayores concentraciones los animales tratados con clenbuterol exclusivamente. Sin embargo, a los cinco días (R-5) se pueden apreciar diferencias en los tres grupos entre sí ($p < 0,01$), produciéndose el fenómeno inverso, ya que el grupo tratado con dexametasona y clenbuterol alcanza unas concentraciones muy superiores a las del grupo tratado con clenbuterol. A partir del día 10 (R-10), los niveles, en ambos grupos descienden y se igualan a los de los controles, permaneciendo así hasta el final de la experimentación.

Tabla 9.- Concentraciones plasmáticas (media \pm E.S.M.) de *corticosterona* (ng/ml) en los animales prepúberes.

	Control	Clenbuterol
T 0	241,36 \pm 12,12	247,56 \pm 18,45
T 1	244,43 \pm 18,43	350,06 \pm 17,95
T 2	255,68 \pm 16,70	305,30 \pm 16,28
T 3	240,26 \pm 11,90	337,99 \pm 18,29
T 4	261,37 \pm 12,84	390,26 \pm 18,61
T 5	230,33 \pm 12,67	458,74 \pm 17,75
T 6	200,60 \pm 14,82	362,76 \pm 11,28
T 7	243,38 \pm 14,83	360,60 \pm 16,14
R-0	240,91 \pm 13,86	255,77 \pm 16,93
R-5	259,75 \pm 11,87	275,21 \pm 14,76
R-10	265,23 \pm 13,45	280,52 \pm 10,21
R-15	283,47 \pm 16,36	284,79 \pm 15,54
R-20	264,54 \pm 10,23	278,56 \pm 9,12

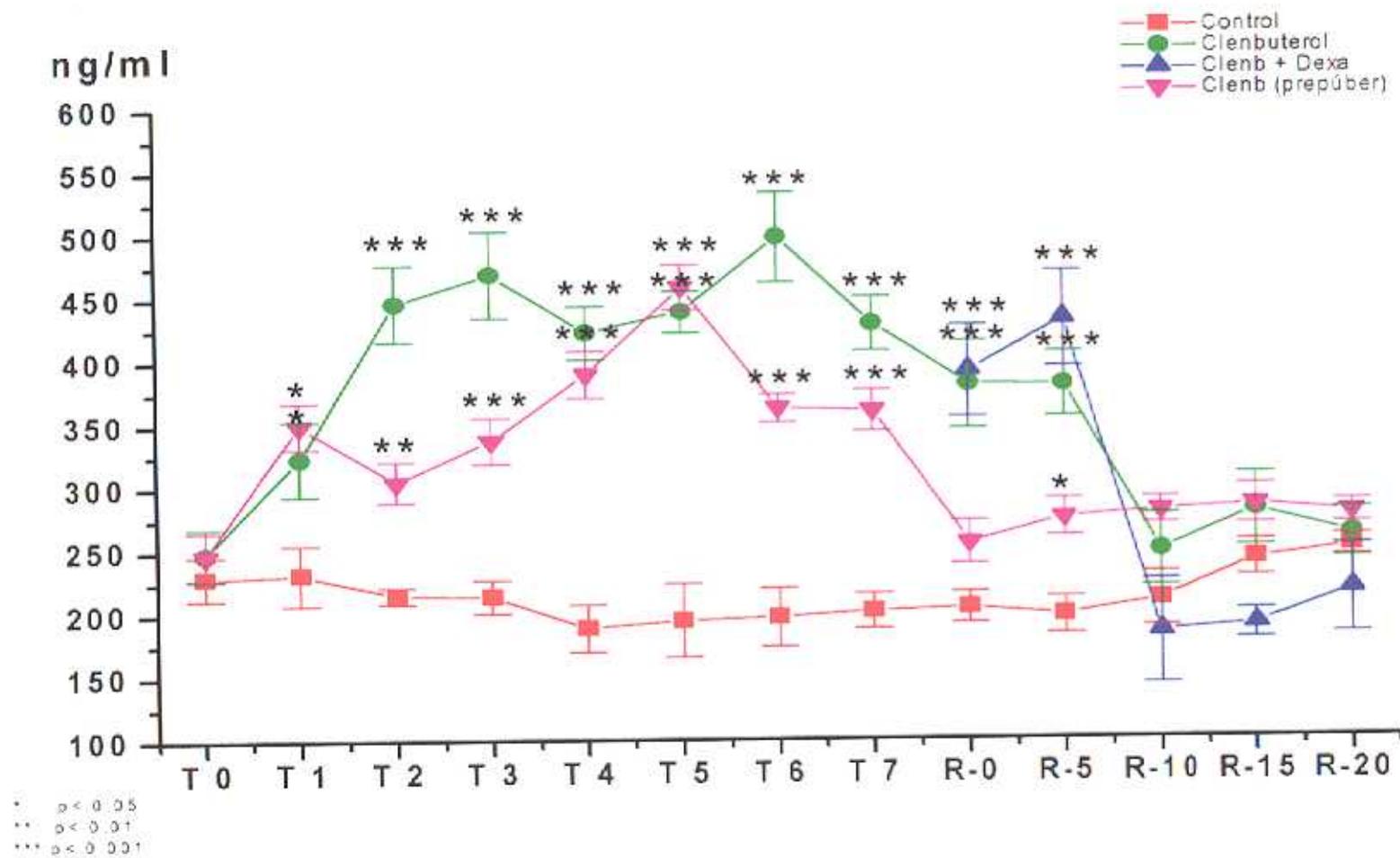


* $p < 0,05$
 ** $p < 0,01$
 *** $p < 0,001$

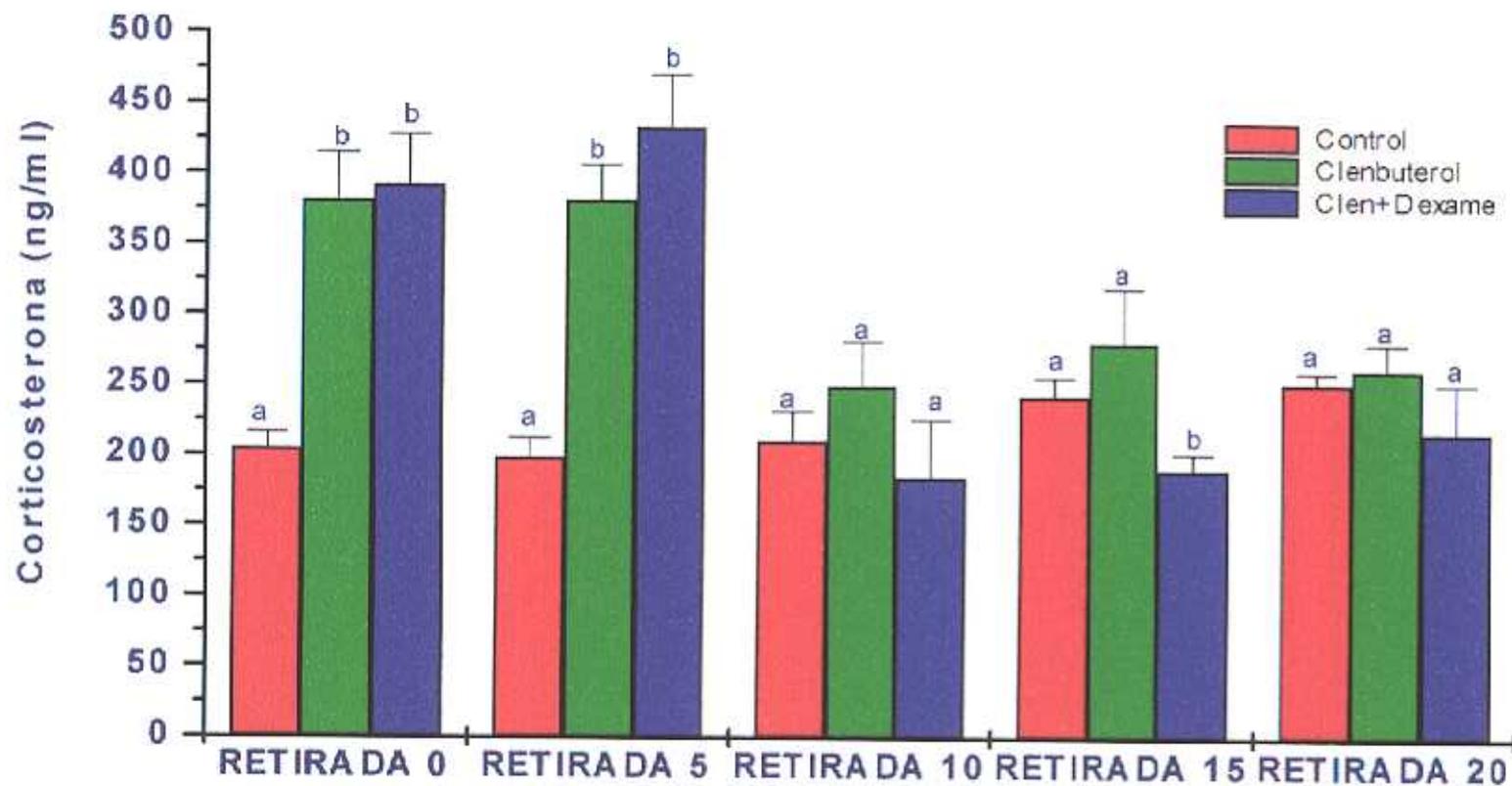
Gráfica 10.- Concentraciones plasmáticas de corticosterona (ng/ml) en animales prepúberes *controles* (■) y tratados con *clenbuterol* (●).

Tabla 10.- Concentraciones plasmáticas (media \pm E.S.M.) de *corticosterona* (ng/ml) en los diferentes tratamientos en animales adultos.

	Control	Clenbuterol	Clenbuterol + Dexametasona
T 0	229,86 \pm 37,16	288,25 \pm 20,59	
T 1	232,10 \pm 23,78	323,89 \pm 29,72	
T 2	215,36 \pm 6,63	446,65 \pm 30,46	
T 3	214,31 \pm 13,06	469,34 \pm 34,24	
T 4	189,26 \pm 18,79	423,30 \pm 20,97	
T 5	195,08 \pm 29,08	439,38 \pm 16,25	
T 6	197,21 \pm 23,25	498,11 \pm 35,68	498,11 \pm 35,68
T 7	201,92 \pm 13,98	429,29 \pm 21,26	408,43 \pm 32,45
R-0	204,36 \pm 12,35	380,86 \pm 34,44	391,46 \pm 36,30
R-5	198,18 \pm 14,56	380,54 \pm 25,67	432,38 \pm 37,86
R-10	210,34 \pm 21,46	249,26 \pm 82,36	184,73 \pm 41,17
R-15	242,09 \pm 14,14	280,45 \pm 58,97	190,21 \pm 11,54
R-20	251,55 \pm 8,49	261,23 \pm 19,28	217,29 \pm 34,62



Gráfica 11.- Concentraciones plasmáticas de corticosterona (ng/ml) en los animales prepúberes y adultos en los distintos tratamientos: *control* (■), *clenbuterol* (●), *clenbuterol + dexametasona* (▲) y *prepúberes* (▼)

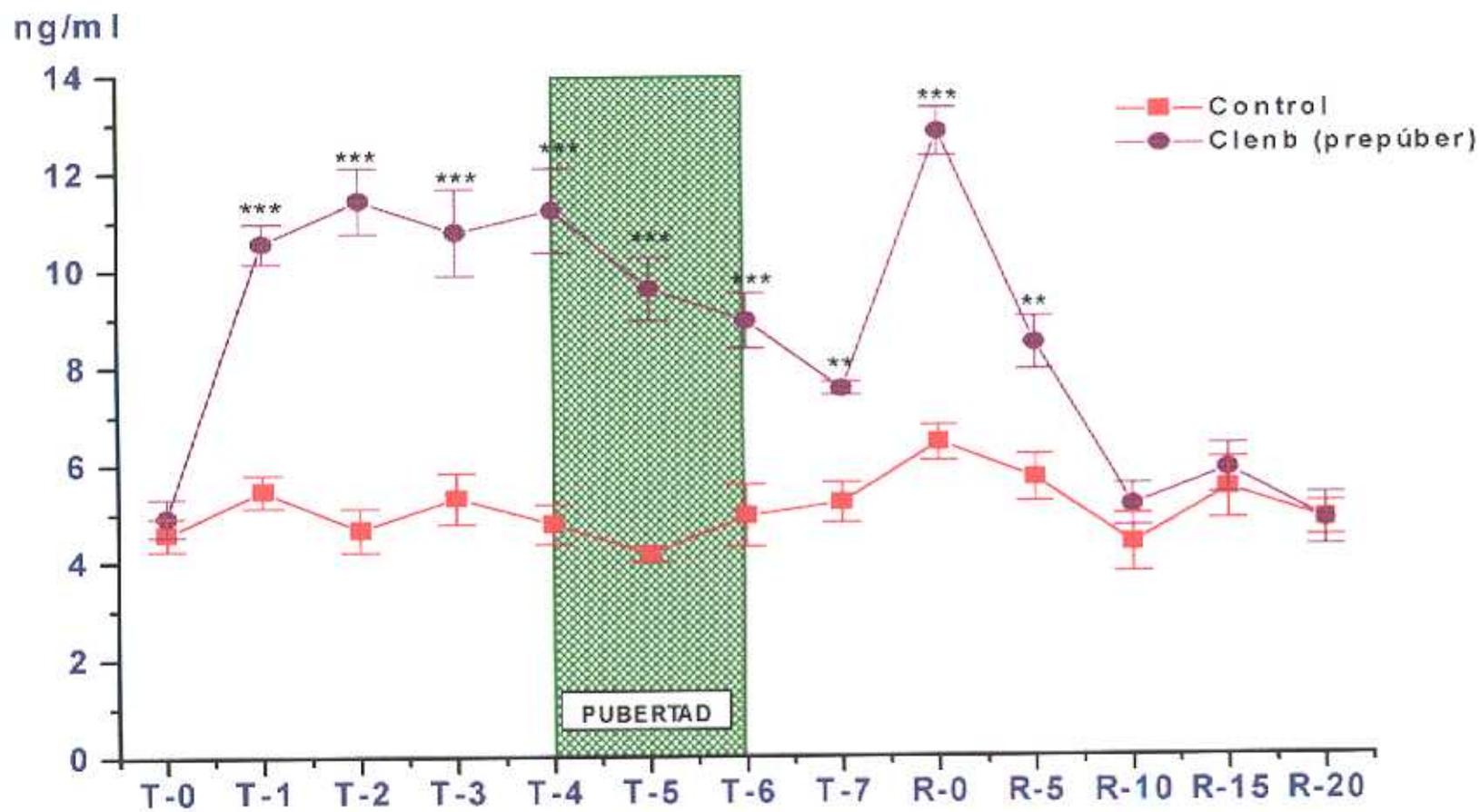


Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0,01)

Gráfica 11a.- Concentraciones plasmáticas de corticosterona (ng/ml) en animales adultos en los distintos tratamientos: *control* (■), *clenbuterol* (■) y *clenbuterol + dexametasona* (■).

Tabla 11.- Concentraciones plasmáticas (media \pm E.S.M.) de *cortisol* (ng/ml) en los animales prepúberes.

	Control	Clenbuterol
T 0	4,60 \pm 0,34	4,94 \pm 0,38
T 1	5,48 \pm 0,35	10,57 \pm 0,41
T 2	4,68 \pm 0,45	11,45 \pm 0,68
T 3	5,32 \pm 0,52	10,79 \pm 0,89
T 4	4,78 \pm 0,40	11,23 \pm 0,87
T 5	4,16 \pm 0,15	9,61 \pm 0,65
T 6	4,95 \pm 0,63	8,96 \pm 0,57
T 7	5,22 \pm 0,41	7,55 \pm 0,13
R-0	6,44 \pm 0,36	12,82 \pm 0,50
R-5	5,70 \pm 0,48	8,48 \pm 0,54
R-10	4,36 \pm 0,60	5,15 \pm 0,43
R-15	5,48 \pm 0,63	5,88 \pm 0,50
R-20	4,84 \pm 0,34	4,83 \pm 0,54

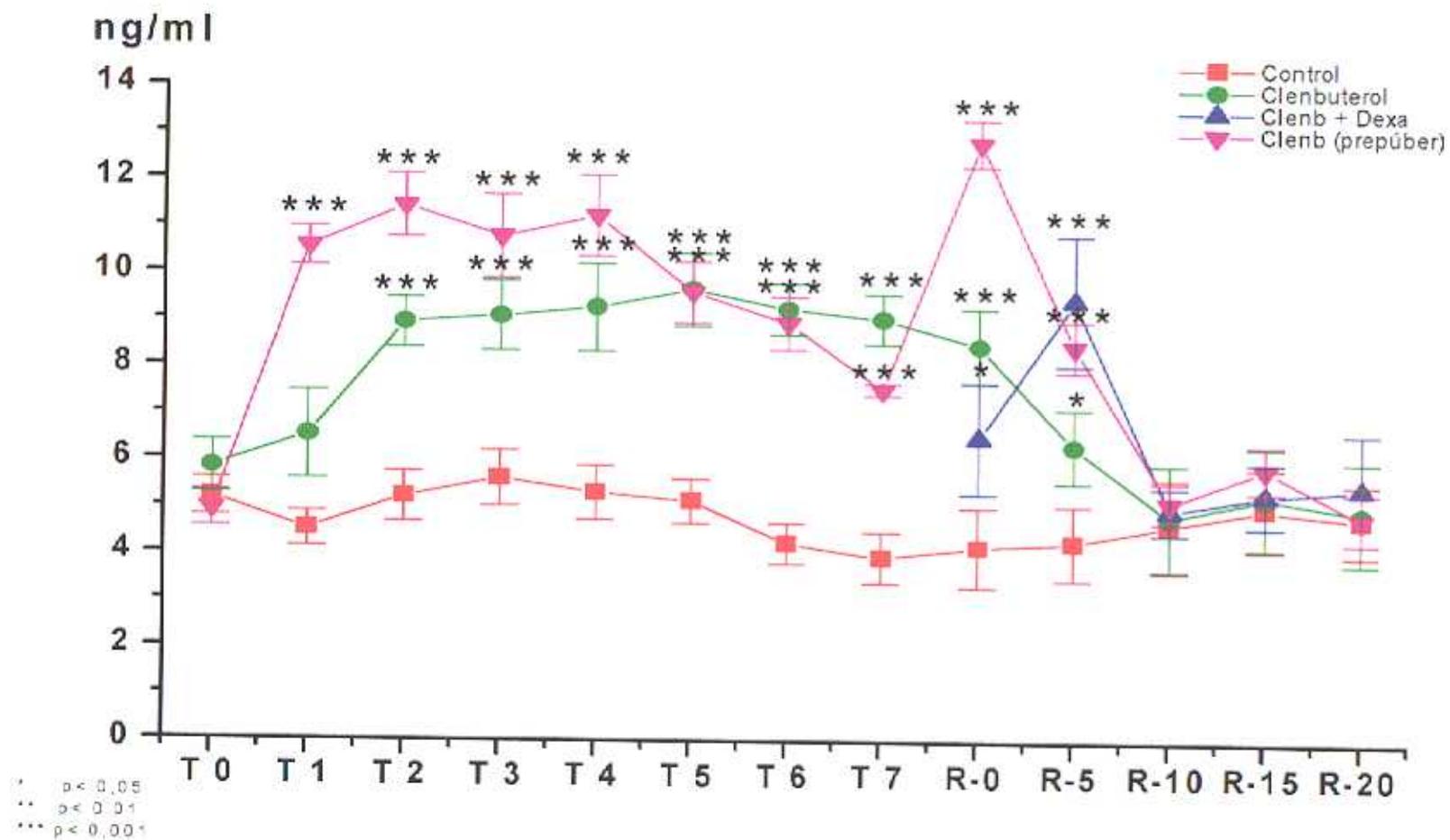


* p < 0,05
 ** p < 0,01
 *** p < 0,001

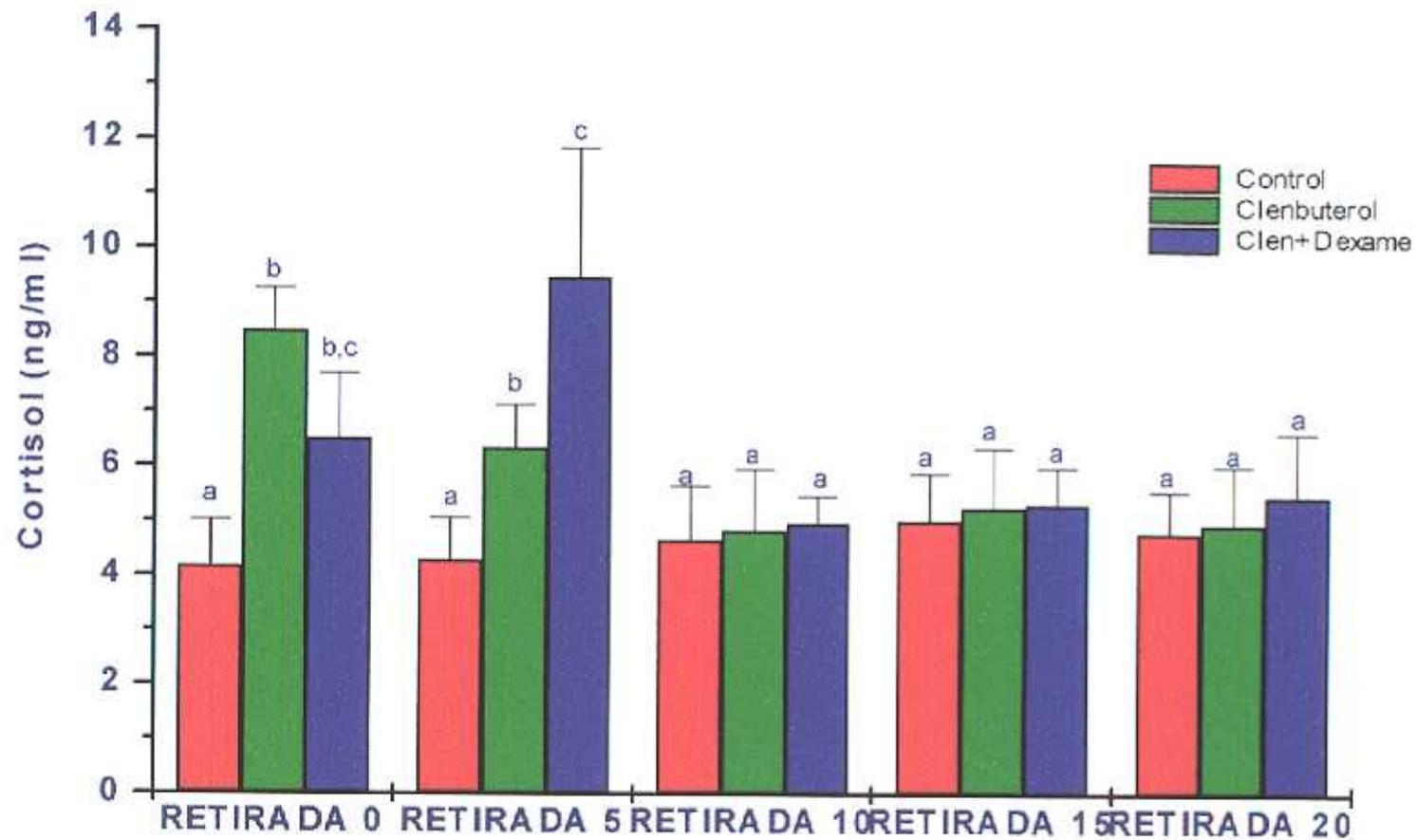
Gráfica 12.- Concentraciones plasmáticas de cortisol (ng/ml) en animales prepúberes: *control* (■), *clenbuterol* (●).

Tabla 12.- Concentraciones plasmáticas (media \pm E.S.M.) de *cortisol* (ng/ml) en los diferentes tratamientos en animales adultos.

	Control	Clenbuterol	Clenbuterol + Dexametasona
T 0	5,20 \pm 0,40	5,85 \pm 0,55	
T 1	4,52 \pm 0,38	6,54 \pm 0,94	
T 2	5,22 \pm 0,53	8,95 \pm 0,53	
T 3	5,62 \pm 0,59	9,09 \pm 0,74	
T 4	5,31 \pm 0,57	9,28 \pm 0,93	
T 5	5,14 \pm 0,47	9,67 \pm 0,79	
T 6	4,24 \pm 0,43	9,26 \pm 0,55	9,26 \pm 0,55
T 7	3,95 \pm 0,54	9,04 \pm 0,53	7,34 \pm 0,67
R-0	4,17 \pm 0,84	8,48 \pm 0,79	6,51 \pm 1,19
R-5	4,28 \pm 0,79	6,34 \pm 0,79	9,45 \pm 2,39
R-10	4,66 \pm 0,99	4,83 \pm 1,12	4,96 \pm 0,50
R-15	5,01 \pm 0,88	5,26 \pm 1,08	5,31 \pm 0,68
R-20	4,79 \pm 0,76	4,94 \pm 1,08	5,46 \pm 1,17



Gráfica 13.- Concentraciones plasmáticas de cortisol (ng/ml) en los animales prepuberes y adultos en los distintos tratamientos: control (■), clenbuterol (●), clenbuterol + dexametasona (▲) prepuberes (▼).



Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$).

Gráfica 13a.-

Concentraciones plasmáticas de cortisol (ng/ml) en animales adultos en los distintos tratamientos: control (■), clenbuterol (■) y clenbuterol - dexametasona (■).

ESTEROIDES GONADALES

Gráfica 14 y Tabla 13: En esta gráfica aparecen representadas las concentraciones plasmáticas de progesterona (ng/ml) (media \pm esm) en los diferentes tratamientos a los que han sido sometidos los animales. En los animales tratados con clenbuterol (1mg/kg), se produce un descenso de los niveles de progesterona con respecto a los controles, a partir de la 1ª semana de tratamiento ($p < 0,05$), manteniéndose esta disminución durante toda la fase experimental, y cuyo mayor grado de significación estadística ($p < 0,001$) se alcanza entre la 4ª (T-4) y 6ª (T-6) semanas de tratamiento. A partir del periodo de supresión, los animales experimentan una recuperación y comienzan a elevarse progresivamente dichas concentraciones hasta alcanzar las de los controles.

Con respecto al grupo tratado con la asociación de clenbuterol y dexametasona, los niveles de progesterona, son ligeramente superiores a los del grupo control y al tratado con clenbuterol sólo, pero careciendo de significación estadística ($p > 0,05$). A los cinco días (R-5), se produce un espectacular incremento de los niveles de progesterona ($p < 0,05$) para, posteriormente, descender e igualarse a los de los controles, y ascender, luego, el último día de la retirada (R-20), llegando a ser significativo ($p < 0,05$), con respecto al grupo control.

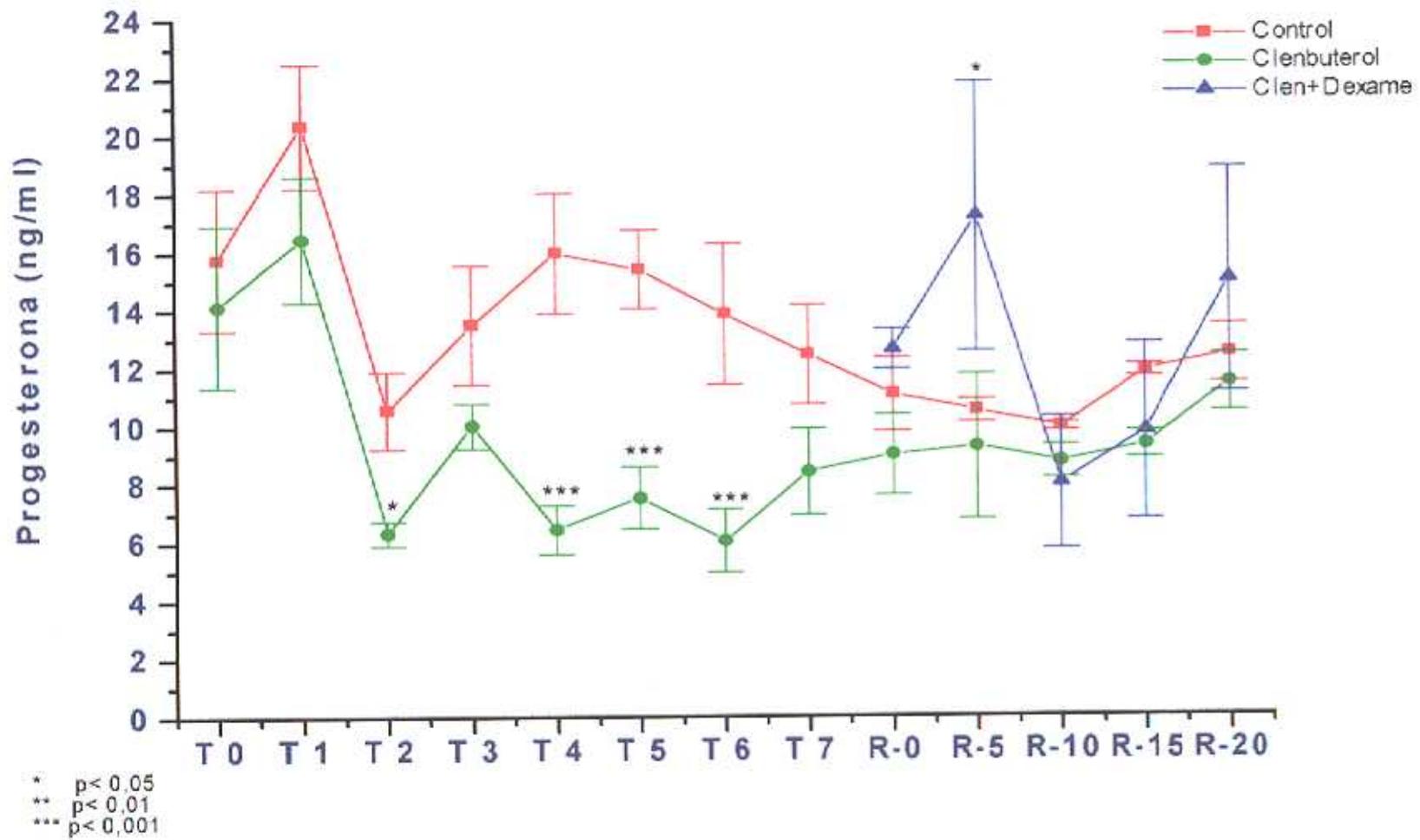
Gráfica 14-a: Indica con mayor detalle las concentraciones plasmáticas de progesterona (ng/ml) (media \pm esm) en los tres grupos (control, tratado con clenbuterol y tratado con clenbuterol + dexametasona). A los cinco días de haber finalizado el tratamiento, el grupo sometido a la asociación de clenbuterol y dexametasona muestra unas concentraciones más elevadas, con respecto al grupo tratado con clenbuterol y al control ($p < 0,05$). Posteriormente, disminuyen los niveles de progesterona, para ascender nuevamente a los 20 días del periodo de supresión (R-20), siendo estadísticamente significativas dichas concentraciones ($p < 0,05$), únicamente con respecto al grupo control.

Gráficas 15, 15-a y Tabla 14: Los resultados de las concentraciones plasmáticas de 17 β -estradiol, en los distintos tratamientos, aparecen representados en las gráficas 15 y 15-a. Están expresados en pg/ml (media \pm esm). En el grupo tratado con clenbuterol, se produce una elevación de las concentraciones de 17 β -estradiol a partir de la 4^a semana de tratamiento ($p < 0,001$), manteniéndose en esos niveles hasta el periodo de retirada (R-0) en que alcanzan las mayores diferencias, con respecto al grupo control. A partir de ese momento, se produce una caída brusca ($p < 0,001$), hasta que han transcurrido 15 días del periodo de supresión (R-15), con una significación $p < 0,05$. En los últimos cinco días se igualan las concentraciones de ambos grupos (control y tratados con clenbuterol). Los animales tratados con la asociación de clenbuterol y dexametasona mantienen la tónica del grupo anterior, en el sentido de la elevación de los niveles de 17 β -estradiol, aunque al contrario que sucede con el grupo tratado con clenbuterol, si bien se producen disminuciones estadísticamente significativas ($p < 0,001$) en las retiradas 5 (R-5) y 10 (R-10), a partir de ese momento, se elevan espectacularmente ($p < 0,001$) dichas concentraciones hasta la finalización de la fase experimental, 20 días después de concluido el tratamiento.

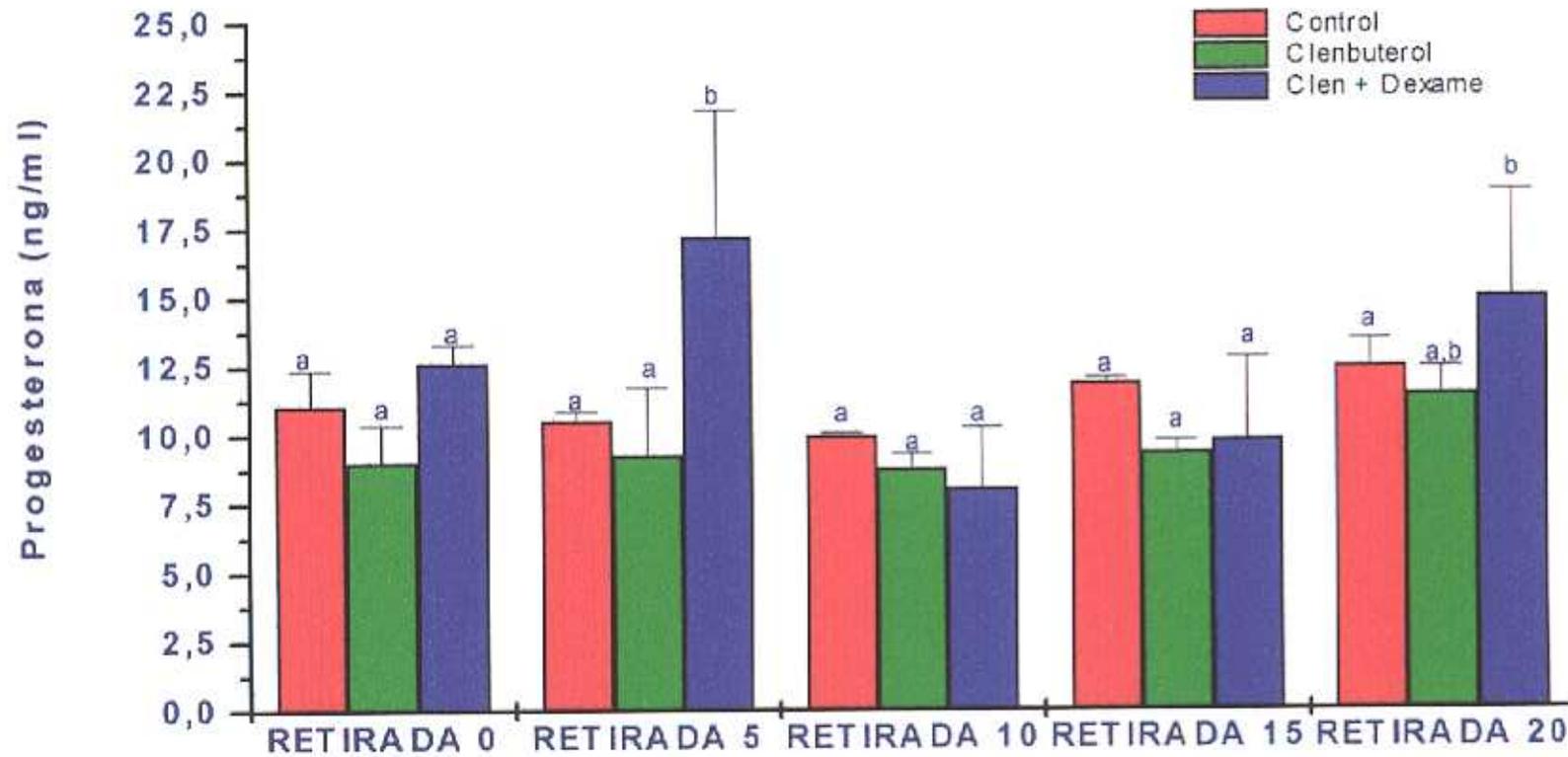
Gráficas 16, 16-a y Tabla 15: Muestran las concentraciones plasmáticas de androstenodiona (ng/ml) (media \pm esm) de los animales tratados con clenbuterol y con clenbuterol asociado a la dexametasona. En el grupo tratado con clenbuterol, se observa un ligero aumento de los niveles de androstenodiona, que carece de significación estadística ($p > 0,05$), hasta la última semana de tratamiento (T-7), en que se distancia del control y se aprecian diferencias entre ambos grupos ($p < 0,05$). Durante el periodo de retirada, no se observan diferencias entre el grupo control y el tratado. En cuanto al grupo tratado con clenbuterol y dexametasona, es de destacar una disminución de las concentraciones de androstenodiona ($p < 0,01$) con respecto a ambos grupos (control y tratado con clenbuterol), a los 10 días de la retirada del tratamiento. Esta disminución, aunque no tan acusada, persiste hasta la conclusión del mismo.

Tabla 13.- Concentraciones plasmáticas (media \pm E.S.M.) de *progesterona* (ng/ml) en los diferentes tratamientos en animales adultos.

	Control	Clenbuterol	Clenbuterol + Dexametasona
T 0	15,78 \pm 2,45	14,16 \pm 2,78	
T 1	20,37 \pm 2,13	16,47 \pm 2,17	
T 2	10,58 \pm 1,34	6,34 \pm 0,43	
T 3	13,52 \pm 2,05	10,03 \pm 0,78	
T 4	15,98 \pm 2,07	6,47 \pm 0,84	
T 5	15,41 \pm 1,36	7,55 \pm 1,06	
T 6	13,86 \pm 2,42	6,07 \pm 1,09	6,07 \pm 1,09
T 7	12,46 \pm 1,72	8,44 \pm 1,49	9,32 \pm 2,02
R-0	11,10 \pm 1,27	9,02 \pm 1,38	12,64 \pm 0,68
R-5	10,52 \pm 0,38	9,29 \pm 2,49	17,19 \pm 4,62
R-10	9,96 \pm 0,14	8,77 \pm 0,56	8,04 \pm 2,26
R-15	11,88 \pm 0,20	9,35 \pm 0,46	9,80 \pm 3,02
R-20	12,46 \pm 1,01	11,46 \pm 0,99	14,99 \pm 3,85



Gráfica 14.- Concentraciones plasmáticas de progesterona (ng/ml) en animales adultos en los distintos tratamientos: control (■), clenbuterol (●) y clenbuterol + dexametasona (▲).



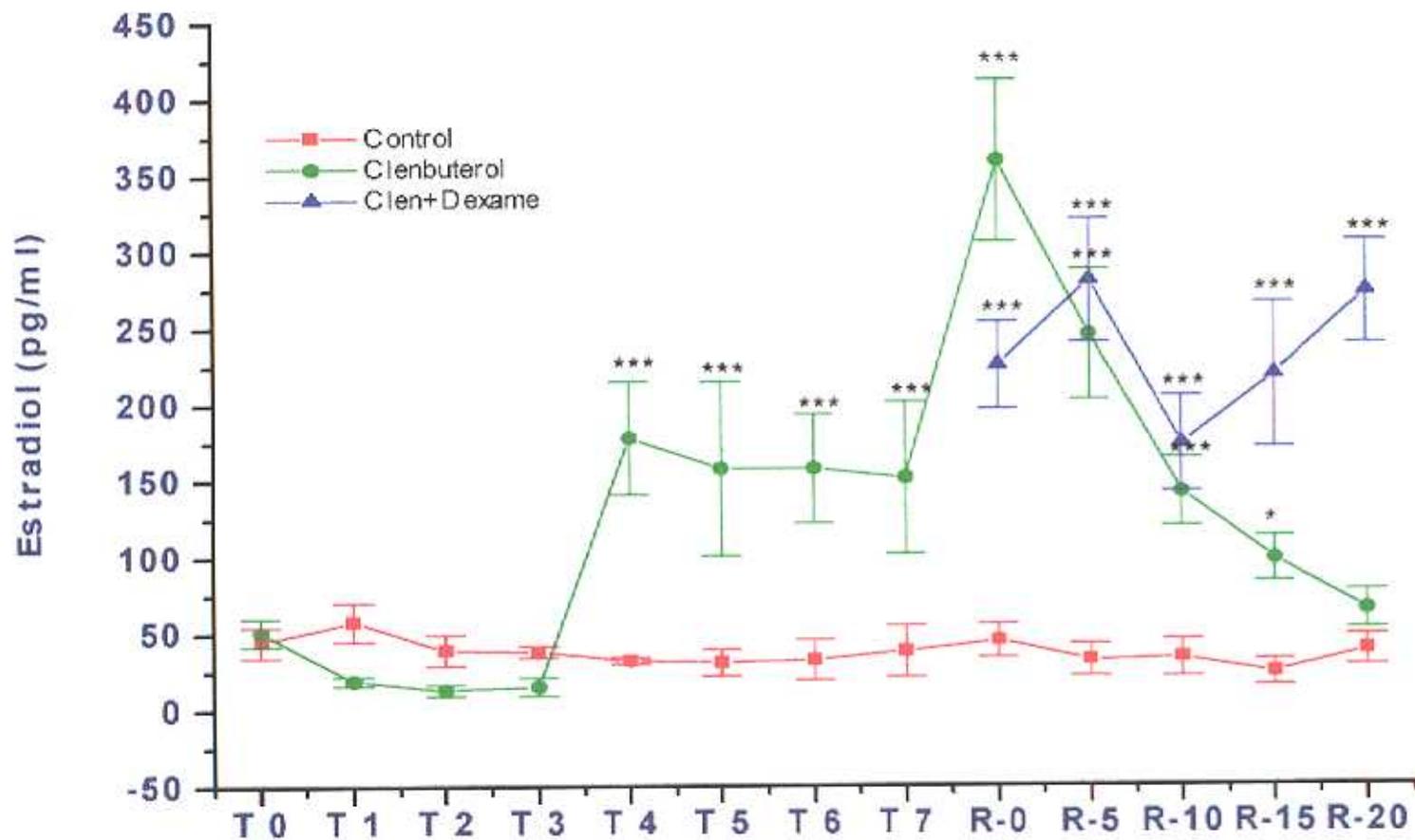
Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$)

Gráfica 14a.-

Concentraciones plasmáticas de progesterona (ng/ml) en animales adultos durante el periodo de supresión en los distintos tratamientos: *control* (■), *clenbuterol* (■) y *clenbuterol + dexametasona* (■).

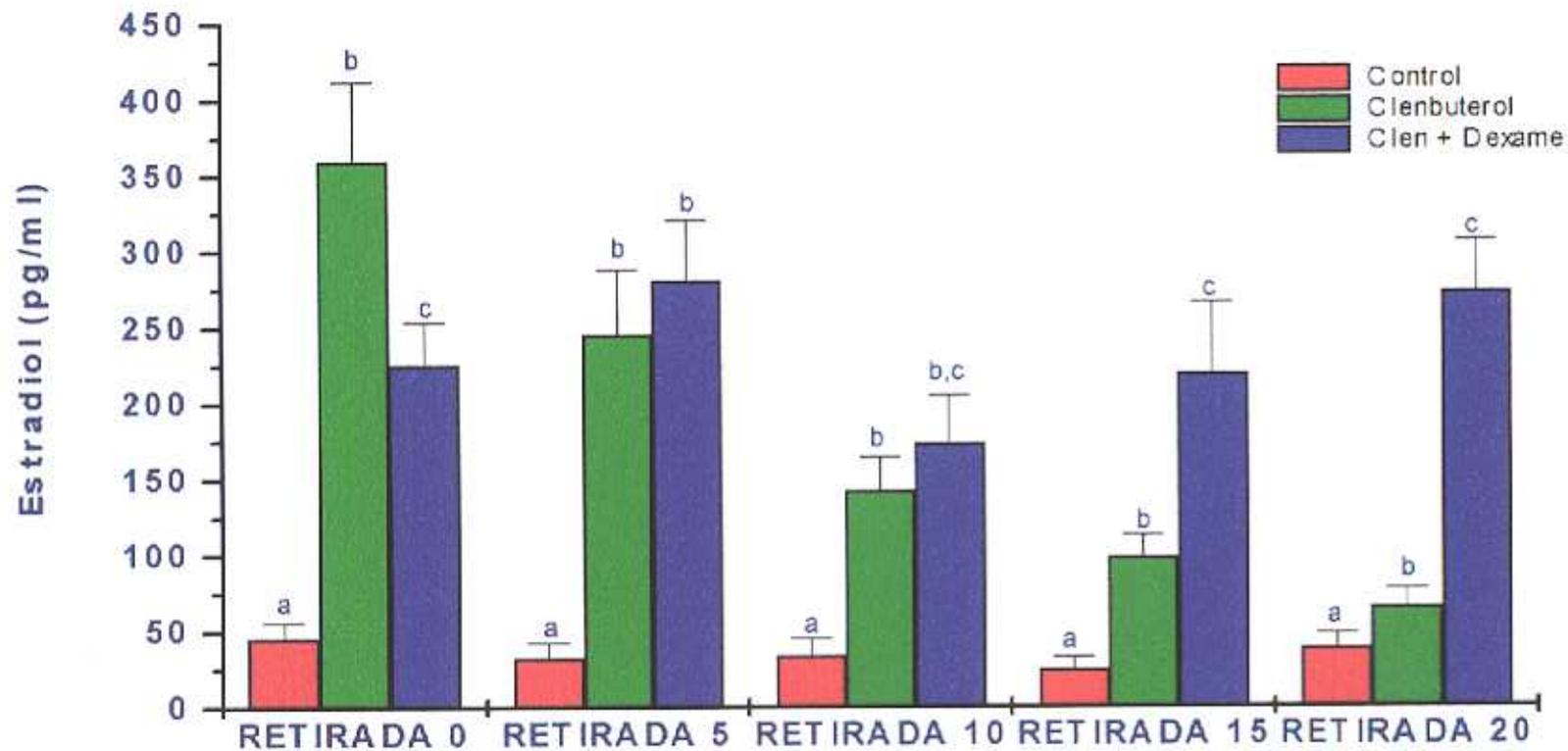
Tabla 14.- Concentraciones plasmáticas (media \pm E.S.M.) de 17β -estradiol (pg/ml) en los diferentes tratamientos en animales adultos.

	Control	Clenbuterol	Clenbuterol + Dexametasona
T 0	45,15 \pm 10,13	51,64 \pm 9,24	
T 1	58,24 \pm 12,68	19,62 \pm 2,81	
T 2	39,76 \pm 9,91	13,70 \pm 3,57	
T 3	38,59 \pm 3,79	15,91 \pm 5,89	
T 4	32,55 \pm 2,25	178,59 \pm 36,94	
T 5	31,24 \pm 8,86	158,15 \pm 57,13	
T 6	33,07 \pm 13,10	158,24 \pm 35,64	158,24 \pm 35,64
T 7	38,50 \pm 16,94	152,07 \pm 49,91	197,65 \pm 32,98
R-0	45,42 \pm 11,11	359,59 \pm 52,76	225,57 \pm 28,57
R-5	32,56 \pm 10,42	245,62 \pm 42,65	280,82 \pm 40,33
R-10	33,86 \pm 12,08	142,33 \pm 22,46	173,82 \pm 31,38
R-15	24,35 \pm 8,64	98,46 \pm 14,77	219,13 \pm 47,25
R-20	38,74 \pm 9,79	65,54 \pm 12,41	273,31 \pm 33,78



* $p < 0,05$
 ** $p < 0,01$
 *** $p < 0,001$

Gráfica 15.- Concentraciones plasmáticas de 17β -estradiol (pg/ml) en animales adultos en los distintos tratamientos: control (■), clenbuterol (●) y clenbuterol + dexametasona (▲).



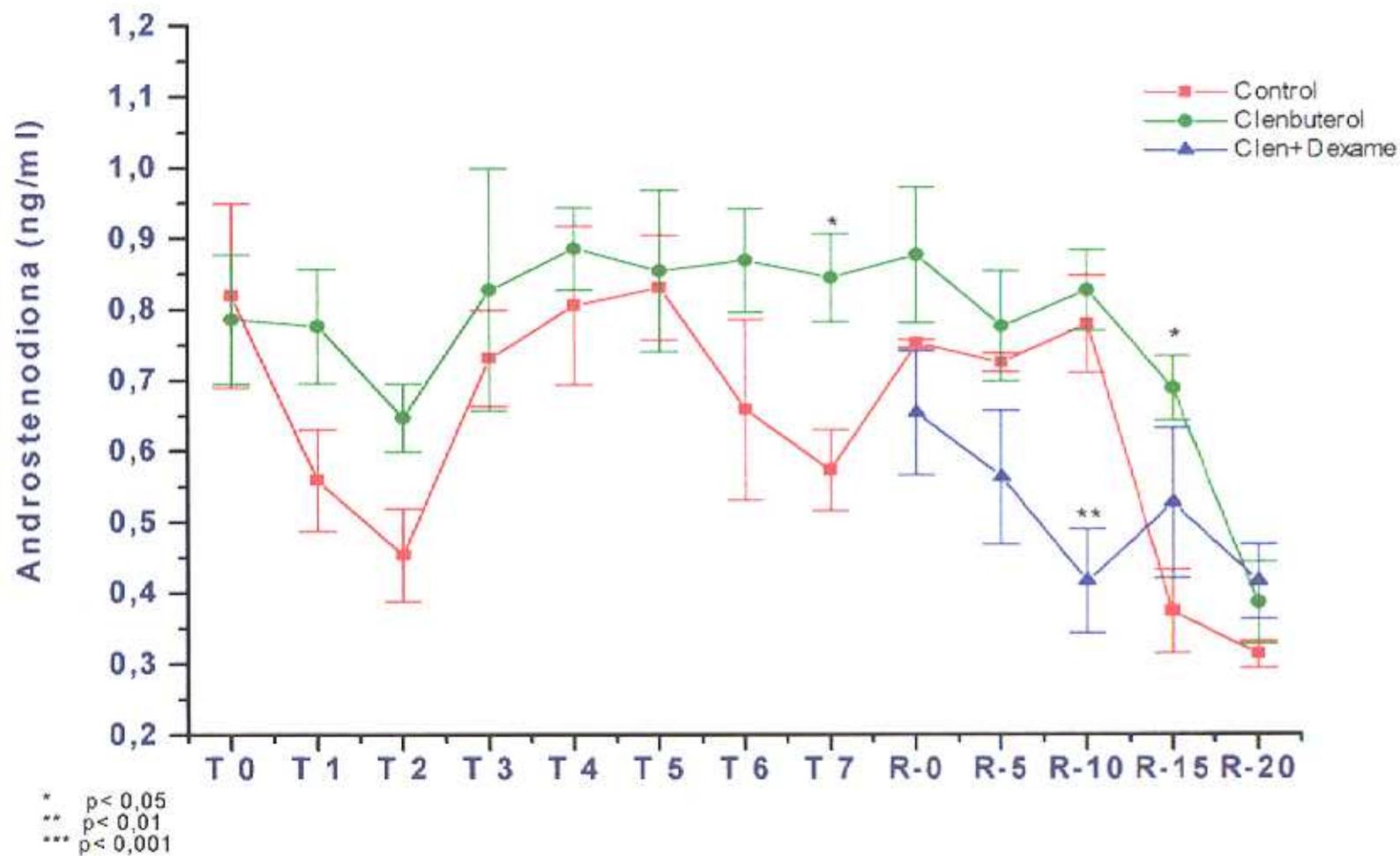
Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$)

Gráfica 15a.-

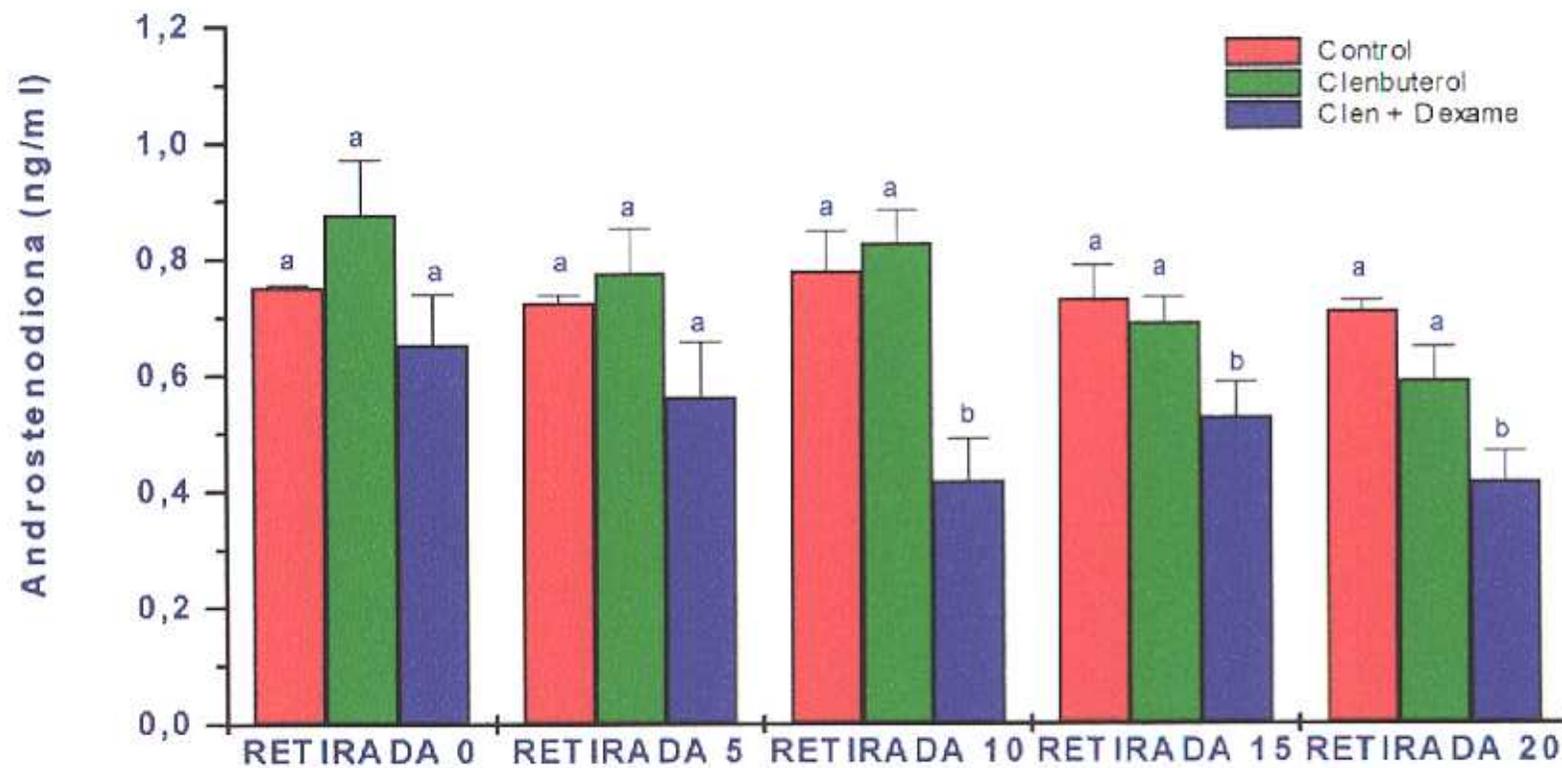
Concentraciones plasmáticas de 17β -estradiol (pg/ml) en animales adultos durante el periodo de supresión en los distintos tratamientos: *control* (■), *clenbuterol* (■) y *clenbuterol + dexametasona* (■).

Tabla 15.- Concentraciones plasmáticas (media \pm E.S.M.) de *androstenediona* (ng/ml) en los diferentes tratamientos en animales adultos.

	Control	Clenbuterol	Clenbuterol + Dexametasona
T 0	0,82 \pm 0,23	0,79 \pm 0,09	
T 1	0,56 \pm 0,07	0,78 \pm 0,08	
T 2	0,45 \pm 0,07	0,65 \pm 0,05	
T 3	0,73 \pm 0,07	0,83 \pm 0,17	
T 4	0,81 \pm 0,11	0,89 \pm 0,06	
T 5	0,83 \pm 0,07	0,86 \pm 0,11	
T 6	0,66 \pm 0,13	0,87 \pm 0,07	0,87 \pm 0,07
T 7	0,57 \pm 0,06	0,84 \pm 0,06	0,72 \pm 0,08
R-0	0,75 \pm 0,01	0,88 \pm 0,10	0,65 \pm 0,09
R-5	0,73 \pm 0,01	0,78 \pm 0,08	0,56 \pm 0,09
R-10	0,78 \pm 0,07	0,83 \pm 0,06	0,42 \pm 0,07
R-15	0,37 \pm 0,06	0,69 \pm 0,05	0,53 \pm 0,11
R-20	0,31 \pm 0,02	0,39 \pm 0,06	0,42 \pm 0,05



Gráfica 16.- Concentraciones plasmáticas de androstenodiona (ng/ml) en animales adultos en los distintos tratamientos: control (■), clenbuterol (●) y clenbuterol + dexametasona (▲).



Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$)

Gráfica 16a.-

Concentraciones plasmáticas de androstenediona (ng/ml) en animales adultos durante el periodo de supresión en los distintos tratamientos: *control* (■), *clenbuterol* (■) y *clenbuterol + dexametasona* (■).

DISCUSIÓN

GANANCIA DE PESO CORPORAL

El peso corporal, y en especial, el incremento de éste, constituye un factor importantísimo a la hora de evaluar la acción promotora del crecimiento del beta-agonista clenbuterol, tanto si se administra independientemente o asociado a la dexametasona.

Se ha comprobado que el aumento de peso tras el tratamiento con un β -agonista como el clenbuterol, se produce por un incremento en la síntesis proteica, debido a un marcado incremento de la concentración de AMPc (Choo *et al.*, 1992). Diversos autores, sugieren que la mayor ganancia de peso tras la administración de clenbuterol, se obtiene en animales que tengan más o menos un año de edad, en el caso de los animales de abasto. La variabilidad de los resultados obtenidos en los distintos trabajos experimentales, revisados en la bibliografía, puede deberse a muchos factores como por ejemplo, la especie, edad de los animales, dosis, fórmula de medicación o duración de la misma (Elliot *et al.*, 1993).

Se ha elegido la rata para llevar a cabo nuestra experimentación, porque se trata de un animal muy útil y valioso, en primer lugar, debido a su bajo coste inicial y necesidad de pocos requerimientos alimenticios y por constituir una especie cuyo crecimiento y respuesta frente a los diversos tratamientos aplicados, son extraordinariamente rápidos (Eggum y Beames, 1986). Además, la simplicidad de la evaluación de su composición corporal, unido al hecho de que se pueden utilizar un número suficiente de animales, para satisfacer las demandas de un diseño experimental e interpretación estadística de los resultados obtenidos, nos permiten asimismo, crear biomodelos útiles en estudios del empleo de anabolizantes, especialmente agonistas β -adrenérgicos, como el clenbuterol (Proyecto de la Comunidad Autónoma de Madrid, 1996).

Ya que en nuestro caso, puede existir gran diversidad de resultados, entre otras razones por la especie elegida, la rata, orientaremos nuestra discusión alrededor de cuatro puntos fundamentales:

- ☞ edad de los animales
- ☞ vía de administración y dosis empleada
- ☞ sexo de los animales
- ☞ tipo y duración del tratamiento

Los resultados obtenidos en nuestra experimentación, muestran un claro incremento del peso corporal. Dicha ganancia se estabiliza al cabo del tiempo, en todos los grupos tratados, bien con clenbuterol (en animales prepúberes y adultos) o asociado a dexametasona, como se puede apreciar claramente en las gráficas 1, 2 y 3.

✓ *Edad de los animales*

Elegimos utilizar grupos de animales de distinta edad (prepúberes y adultos), para ver cómo repercutía el tratamiento con clenbuterol en animales que comenzaron la fase experimental siendo prepúberes y la terminaron siendo adultos, y los que directamente la iniciaron siendo adultos. Ello nos permitiría observar las posibles diferencias que encontrásemos y comprender mejor el efecto que tiene la edad de un animal, cuando se le aplican tratamientos que estimulen su crecimiento.

En primer lugar vamos a analizar la variación de los pesos en función de la edad de los animales, centrandó nuestra discusión sobre los animales prepúberes. Nuestros resultados muestran que, en los animales tratados, se produce una ganancia de peso desde el inicio de la fase experimental, muy similar a los de los animales utilizados como controles, hasta la sexta semana en que el lote tratado incrementa considerablemente el peso corporal, con respecto al control ($p < 0,05$), una vez alcanzados los 200-250 g de peso, que además coincide con la finalización de la pubertad, momento a partir del cual, comienza el periodo de retirada,

resaltando de nuevo la ganancia de los animales tratados, con respecto a los controles, y comenzando una regularización de la misma hacia la octava semana, donde el incremento es menor, aunque continúa persistiendo, de acuerdo a los resultados obtenidos por McElligot *et al.* (1989), que sirven para demostrar que el efecto del clenbuterol, en cuanto a ganancia de peso se refiere, es un proceso dinámico, que remite en el momento que se produce lo que podemos denominar como "acostumbramiento" al fármaco, y ya no se produce ganancia, sino estabilización de los pesos.

Se han sugerido varias posibilidades relativas a que los β -agonistas ejerzan un escaso efecto en animales jóvenes. Este hecho puede ser debido a la variación de la regulación de los receptores β -adrenérgicos, antes y después de la pubertad y también, dependiendo del sexo del animal, alterándose la respuesta, bien aumentando o disminuyendo la misma (Fiems, 1987). Las propiedades farmacodinámicas pueden ser diversas, a distintas edades. Si la absorción y el metabolismo difieren dentro de una especie, entre animales jóvenes y viejos, entonces la respuesta a la dosis, puede ser o demasiado alta o demasiado baja en animales jóvenes. Quizá el número de receptores a edades jóvenes sea demasiado bajo. En este sentido, Lai *et al.* (1981) demostraron que el número de receptores se incrementa en un 60-70% mediante la diferenciación de preadipocitos en adipocitos. Smith y Clark (1980) no encontraron ninguna diferencia en el número de receptores β -adrenérgicos del músculo esquelético en conejos recién nacidos y de 8 semanas, ni tampoco en la localización de dichos receptores. Otra hipótesis, con respecto a la efectividad del clenbuterol dependiendo de la edad, es la alteración del estado endocrino (Beerman *et al.*, 1987). Quizá en los animales adultos un incremento del efecto de los β -agonistas pueda ser debido a una menor secreción de la hormona del crecimiento. De hecho, se ha demostrado una disminución de la concentración plasmática de la hormona del crecimiento en el ganado vacuno (Joakimsen y Blom, 1976), corderos (Johnson *et al.*, 1985) y cerdos (Machlin, 1972).

A diferencia de Lai *et al.*, (1981), que encuentran una mayor respuesta en animales jóvenes tratados, nuestros resultados indican que esta reactividad es menor, y que ésta aumenta a partir del momento en que cesa la pubertad, o que el animal es adulto como se aprecia en la

gráfica nº 1 en la que como vemos, durante y después de la pubertad, aparecen las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Con respecto a otras especies, como las aves, autores como Buyse *et al.*, (1991) y Takahashi *et al.*, (1993) sostienen que la ganancia de peso es independiente de la edad del animal, tras el tratamiento con clenbuterol, jugando un papel más importante otros factores como el sexo, localización de la grasa o duración del tratamiento.

En la gráfica nº 2 podemos observar un progresivo aumento del peso corporal en los animales adultos, desde el comienzo de la fase experimental, que alcanza sus mayores niveles de significación estadística ($p < 0,01$) desde la tercera semana de tratamiento, hasta el periodo de retirada (R-0), momento a partir del cual, a los cinco días, se produce un descenso con posterior equiparación de los pesos a los animales controles, que se realiza gradualmente a los 5 (R-5), 10 (R-10) y 15 (R-15) días del periodo de supresión. A los veinte días, ya están prácticamente igualados a los controles. Hemos de destacar, que durante el periodo de supresión del tratamiento, la evolución en cuanto a ganancia de peso se refiere, es prácticamente paralela en los animales control y los tratados, y por ello no se observan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Coincidiendo con los resultados obtenidos en nuestra experimentación con animales adultos, Chance *et al.* (1991) han demostrado que los efectos anabólicos del clenbuterol aparecen en ratas, a las tres semanas de tratamiento, al igual que Martineau *et al.* (1993), con un índice de significación de $p < 0,05$, en ese mismo periodo de tiempo.

También podemos deducir, que el clenbuterol proporciona una utilización más eficaz del alimento sin que lleve emparejado un aumento en el consumo de comida, como ya demostrara McElligot *et al.*, (1989) cuantificando la misma, o en el caso de nuestros animales, sometidos a un régimen de comida *ad libitum*, cuyos incrementos de peso y de acuerdo con Cardoso y Stock, (1998), son francamente espectaculares, tal y como reflejan los resultados obtenidos en nuestra experimentación, a partir de la tercera semana de tratamiento, reforzando

aún más la eficacia que este compuesto ejerce como promotor del crecimiento.

Por otro lado, podemos comprobar cómo, únicamente durante la primera semana, los animales tratados no ganan peso sino que lo pierden, posiblemente debido al efecto anoréxico producido por el clenbuterol durante la fase inicial. A partir de la segunda semana, la tendencia general, consiste en una mayor ganancia de peso, por parte de los animales tratados, que continúa progresivamente hasta alcanzar el máximo incremento a la sexta semana de tratamiento, momento a partir del cual se produce una estabilización en dicha ganancia. Lo mismo sucede en los animales tratados con la asociación de clenbuterol y dexametasona, aunque en éstos se observa una persistencia, estadísticamente significativa ($p < 0,01$) durante el periodo de retirada.

✓ *Vía de administración y dosis empleada*

La dosis empleada y vía de administración son de vital importancia. En este sentido hay cierta uniformidad de criterios. Un hecho importante, a tener en cuenta, es que la respuesta del animal puede variar considerablemente dependiendo de la vía de administración y también del tiempo que haya transcurrido desde la administración de dicha sustancia. Es decir, no se alcanzará el mismo nivel proteico el 4º que el 10º día de la administración del agonista, ni tampoco si se administra por vía oral o intramuscular; por ejemplo, una medida realizada después de varias semanas de tratamiento puede ser indicativa, únicamente, de un periodo de adaptación a la droga (Cartañá *et al.*, 1994). Los resultados obtenidos en nuestra experimentación muestran que el tratamiento con clenbuterol comienza a ser realmente efectivo a partir de la tercera semana de tratamiento (gráfica nº 2).

La vía de administración elegida por nosotros, fue la oral; en principio por reducir al máximo el estrés que toda manipulación de un animal de laboratorio lleva implícita (Illera, 1995), y con ello la posible alteración de los resultados esperados, y posteriormente por la mayor efectividad que suponía esta vía. De la misma opinión es Sillence *et al.*, (1991), que además demuestra en trabajos posteriores (Sillence *et al.*, 1995) que, tratando por vía oral a

ratas (tanto si están enteras como castradas), no existen diferencias considerables en cuanto a ganancia de peso se refiere, en ambos grupos. Por el contrario, otros autores, como MacLennan y Edwards, (1989), observaron, en ratas Wistar hembras, que a menor dosis y por vía subcutánea se duplica la ganancia de peso en el mismo periodo de tiempo. Moore *et al.*, (1994) destacan que la administración oral, a dosis muy altas, produce incrementos de pesos, relativamente bajos. Nebbia *et al.*, (1991) sostienen que, por vía intramuscular, la ganancia de peso es mayor a medida que aumenta la dosis del β -agonista, demostrándolo en trabajos realizados en ratas Sprague-Dawley hembras. Sin embargo, Re *et al.*, (1993) comprobaron que, a la misma dosis, la ganancia de peso es la misma, tanto si se administra el clenbuterol por vía oral, como intramuscular.

Sin embargo, Pullar y Webster, (1977) observaron que al aplicar dosis muy elevadas por vía oral, no sólo no se produce ganancia, sino que incluso llega a producirse una pérdida de peso considerable. En nuestro caso la pérdida de peso no es tan grande, quizá debido a que la estirpe empleada por nosotros es distinta (Long-Evans en nuestro caso, Hodded Lister por aquellos autores) y la duración del tratamiento mayor (45 días, frente a los quince empleados por Pullar y Webster). Por otra parte, la reactividad frente al clenbuterol también depende de la estirpe del animal. Así, se ha observado que las ratas Wistar presentan una menor reactividad frente a los efectos producidos por el clenbuterol que las Hodded Lister (MacLennan y Edwards, 1989).

En la rata también se ha confirmado la acción promotora del crecimiento cuando se administra durante un largo periodo de tiempo a dosis elevadas. En otras especies, el incremento de la ganancia de peso podría ser atribuido a los efectos de reparto del clenbuterol como lo demuestra la mejora que experimenta la calidad de la canal, al menos macroscópicamente (Portillo *et al.*, 1988; Re *et al.*, 1993). Por el contrario, otros autores sostienen que los efectos anabólicos del clenbuterol experimentados en modelos animales, son más evidentes y significativos a dosis más bajas (Carter y Lynch, 1994b).

Algunos autores (Choo *et al.*, 1992) han comprobado que el efecto anabólico en la rata

aparece muy rápidamente ya que, con tan sólo dos días de tratamiento se observan cambios en el peso, persistiendo su acción durante 10 días y descendiendo ligeramente, a pesar de una exposición continuada frente a este fármaco. Nuestros resultados indican la variación semanal de los pesos y no apreciamos descenso, sino estabilización de los mismos a partir de los quince días de experimentación, estando sometidos durante más tiempo al tratamiento, en base a lo cual podemos justificar estas diferencias, ya que en el caso de los autores citados se trata de machos sometidos a una dosis de 25 mg/kg durante 5 días (en la comida) y a nuestros animales (hembras) se les administró una dosis considerablemente menor (1mg/kg) durante 45 días, aunque este efecto puede estar relacionado con la diferencia que existe entre sexos, como veremos más adelante. Por otra parte es de sobra conocido que a elevadas dosis, se produce un bloqueo de los receptores que conduce a un fenómeno de retrofuncionalidad negativa sobre el eje hipotálamo-hipofisario, de tal manera que los receptores no son estimulados y tiene lugar la estabilización de los pesos en lugar de un incremento (Smith, 1998).

✓ *Sexo de los animales*

Se ha especulado que las hormonas sexuales están implicadas en la regulación de los receptores β -adrenérgicos, por lo que puede que el efecto de los β -agonistas sea diferente antes y después de la aparición de la pubertad y entre machos y hembras. Aunque el efecto del sexo no está claramente demostrado en roedores, en otras especies se ha comprobado que existen diferencias. Así por ejemplo, en aves el clenbuterol, reduce la grasa e incrementa las proteínas de la canal únicamente en hembras (Darymple *et al.*, 1984). En cerdos, la ganancia se redujo en los castrados que recibieron 1 ppm, pero no en cerdas jóvenes (Ricks *et al.*, 1984; Fiems, 1987).

✓ *Tipo de tratamiento*

En la siguiente tabla resumimos los resultados observados en cuanto a ganancia de peso (expresada en gramos) se refiere, por distintos autores, en hembras de distintas especies y estirpes sometidas a distintos tipos de tratamiento:

Autores	Control	Dosis	Tratados
Pullar, 1977 (H.Lister)	36 ± 1	0.1mg/kg/15d	51 ± 2
Pullar, 1977 (H.Lister)	36 ± 1	1 mg/kg/15d	56 ± 1
Pullar, 1977 (H.Lister)	36 ± 1	10mg/kg/15d	40 ± 1
Pullar, 1977 (H.Lister)	36 ± 1	50mg/kg/15d	22 ± 2
MacLennan,1989(Wist)	29 ± 3	2 mg/kg/7d	38 ± 7
MacLennan,1989(Wist)	18 ± 5	0,12mg/kg/7d	36 ± 3
Muramutsu,1990(Aves)	302 ± 4	0,25mg/kg/21	295 ± 4
Buyse, 1991 (Aves)	282 ± 9	0.42 ppm/42d	269 ± 9.90
Buyse, 1991 (Aves)	282 ± 9	0.42ppm/28d	277 ± 9.90
Buyse, 1991 (Aves)	282 ± 9	0.42 ppm/14d	288 ± 9.90
Buyse, 1991 (Aves)	916±17	0.42 ppm/42d	887 ± 17
Buyse, 1991 (Aves)	916±17	0.42 ppm/28d	915 ± 17
Buyse, 1991 (Aves)	916±17	0.42 ppm/14d	932 ± 17
Buyse, 1991 (Aves)(kg)	1.7±.02	0.42 ppm/42d	1.69± 0.02
Buyse, 1991 (Aves)(kg)	1.7±.02	0.42 ppm/28d	1.68±0.02
Buyse, 1991 (Aves)(kg)	1.7±.02	0.42 ppm/14d	1.73± 0.02
Nebbia, 1991(S.Daw)	22.1±1	2.5µg/kg/21d	36 ± 3
Nebbia, 1991(S.Daw)	22.1±1	25 µg/kg/21d/im	36 ± 4
Nebbia, 1991(S.Daw)	22.1±1	50 µg/kg/21d/im	41 ± 3
Sillence, 1991 (Wistar)	2.6±0.2	0.2mg/kg/7d/s.c	4.0 ± 0.3
Re, 1993 (S.Dawley)	41± 0.6	25 µg/kg/21d	46 ± 1.5
Re, 1993 (S.Dawley)	41±0.2	2.5µg/kg/21d/im	51 ± 1.4
Re, 1993 (S.Dawley)	41±0.2	25 µg/kg/21d/im	64 ± 1.5
Re, 1993 (S.Dawley)	41±0.2	50 µg/kg/21d/im	85 ± 0.1
Re, 1993 (S.Dawley)	41±0.6	50 µg/kg/21 días	85 ± 0.1
Takahashi, 1993 (Aves)	579±15	0.33mg/kg/14d	590 ± 9
Moore, 1994 (Wistar)	36 ± 2	1mg/kg/10 días	53 ± 3
Moore, 1994 (Wistar)	36 ± 2	4mg/kg/10 días	60 ± 3
Moore, 1994 (Wistar)	36 ± 2	83mg/kg/10 días	54 ± 4
Sillence, 1995 (Wistar)	1.1±.29	4 mg/kg/8 días	4.1 ± 0.29
Sillence, 1995(W.castr)	1.7±.29	4 mg/kg/8 días	5.0 ± 0.29

Podemos observar las diferencias existentes entre unos autores y otros, con nuestros

resultados, tras los tratamientos con clenbuterol, en función de la dosis, vía de administración, estirpe animal o duración del tratamiento.

En cuanto al grupo tratado con la asociación de clenbuterol y dexametasona (gráfica nº 3) y teniendo en cuenta que la dexametasona fue administrada 10 días antes de finalizar el tratamiento con clenbuterol, podemos apreciar que hasta ese momento se produce un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,01$), de los pesos corporales de los animales, a partir de la segunda semana manteniendo una evolución constante hasta la quinta semana, donde la elevación es ligeramente superior, coincidiendo con la administración simultánea del corticoide. De esta manera, los animales siguen experimentando elevaciones de peso significativas ($p < 0,01$), incluso durante todo el transcurso del periodo de retirada del clenbuterol.

Comparando los resultados obtenidos en este experimento y los del grupo tratado única y exclusivamente con clenbuterol, existe una diferencia importante, ya que en este último caso, hemos de recordar que una vez iniciado el periodo de supresión, se producía un descenso de los pesos de los animales tratados, y estabilización de los mismos, hasta igualarse prácticamente a los controles. Sin embargo, con la asociación de la dexametasona, no sólo no pierden, sino que ganan peso durante el periodo de retirada. Ello pudiera justificarse debido a que la dexametasona, al ser un glucocorticoide de síntesis, produciría una retención hídrica, que pudiera ser la responsable de este hecho, aunque al carecer de efecto mineralocorticoide, más bien nos inclinaríamos hacia el efecto "permisivo" de los corticoides, siendo lo más probable que se manifiesten cambios en la síntesis de proteínas, inducidos por esteroides que, a su vez, modificarán la capacidad de reacción de los tejidos, de acuerdo a las características generales de estos compuestos (Goodman y Gilman, 1997).

Por el contrario, para Agbenyega y Wareham, (1991), en estudios realizados en ratones, sería el clenbuterol el responsable de prevenir la pérdida de proteínas musculares inducidas por la dexametasona, antagonizando la actividad catabólica de ésta, y de ahí el hecho de que no se produzca en el periodo de retirada una disminución de peso, tan acusada como

en los dos grupos tratados única y exclusivamente con clenbuterol.

Como conclusión, a la discusión relativa a la ganancia de peso corporal, hemos de decir que el tratamiento con clenbuterol, a dosis superiores a las anabolizantes en roedores, produce un espectacular incremento del peso, directamente relacionado con la edad de los animales, vía de administración y duración del tratamiento. Su asociación a la dexametasona estimula también la ganancia de peso corporal, persistiendo incluso durante el periodo de retirada del medicamento, probablemente debido a la estimulación directa del glucocorticoide sobre la glándula adrenal.

EFFECTOS SOBRE HÍGADO

Nuestra discusión va a centrarse sobre dos apartados diferentes:

☞ peso del hígado

☞ estudio anatomopatológico del mismo

*** Peso del hígado**

El peso del hígado puede proporcionar una información muy valiosa a la hora de establecer la posible toxicidad de un fármaco, tanto en lo que se refiere a su aumento como a su disminución, aunque en ocasiones no constituye un parámetro que evalúe al 100% el grado de toxicidad (Zimmerman e Ishak , 1997). Así, si se observa un aumento del peso puede ser debido a que el hígado es un órgano que se hipertrofia rápidamente cuando se incrementa la demanda fisiológica, y el incremento del peso no tiene por qué ser debido necesariamente a la acción tóxica de un tratamiento en concreto. Frecuentemente, los resultados procedentes del examen anatomopatológico del hígado no se corresponden con los procedentes de las pruebas funcionales hepáticas, siendo en numerosas ocasiones la histología la que establece el verdadero grado de lesión celular (Culter, 1974).

En los resultados obtenidos en nuestra experimentación, con animales prepúberes (gráfica nº 4), se observa una clara disminución del peso hepático de los animales tratados con clenbuterol, con respecto a los controles ($p < 0,01$), que se prolonga hasta los quince días de la retirada del tratamiento, momento a partir del cual experimentan una manifiesta recuperación, igualándose al peso del hígado de los animales utilizados como control.

Nebbia *et al.* (1991) encontraron que el peso del hígado en ratas Sprague-Dawley hembras, sometidas a un tratamiento de 21 días mediante solución inyectable de clenbuterol, se ve reducido. En el caso de nuestros animales, no se manifiesta tanto la disminución del peso

hepático con respecto a los controles, como en el caso de Nebbia, salvo en la última semana de tratamiento, en que ya se aprecian diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$), pero ésto se produce justo cuando termina el periodo de la pubertad y los animales ya se hacen adultos. El hecho de que nuestros resultados no coincidan con los obtenidos por Nebbia, puede que sea debido a varios factores: en primer lugar los animales utilizados por nosotros eran de distinta estirpe, Long Evans; por otra parte, los pesos iniciales de los animales eran menores en nuestro caso, ya que comenzamos con animales de un mes y un día, es decir, prepúberes y por tanto en plena fase de crecimiento, lo que justificaría un incremento natural de dicho órgano pero por ambas partes, tanto controles como animales tratados, mientras que este autor utilizó animales adultos, y por último, la vía de administración es distinta, en nuestro caso la oral, frente a la parenteral de Nebbia *et al.*, (1991).

Sin embargo, cuando estudiamos los resultados obtenidos con los animales adultos (véase gráfica nº 5) observamos una gran disminución del peso del hígado, estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Esta disminución es más pronunciada durante la primera semana de tratamiento e iría asimismo emparejada a la disminución del peso corporal total, lo que es perfectamente justificable, por la influencia negativa que ejerce el clenbuterol sobre el centro del apetito, de ahí su carácter anorexígeno descrito por distintos autores como Maltin *et al.*, (1992) o Bates (1991). Al influir el tratamiento con clenbuterol sobre el peso corporal, provocando una reducción del mismo (al inicio del tratamiento), es lógico pensar, que a nivel hepático ocurra lo mismo.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Reeds *et al.*, (1986), quien también observa una reducción del peso hepático, aunque ésta se manifiesta a los 11 días de tratamiento. En nuestro caso, cuando tiene lugar la mayor pérdida de peso es en la primera semana de tratamiento (a los 7 días), pudiendo atribuir este hecho a la pérdida correlativa de peso corporal experimentado por los animales en ese periodo de tiempo.

Comparando ambos grupos, prepúberes y adultos, podemos comprobar en los primeros, cómo desde el inicio del tratamiento el peso del hígado es menor en los animales

tratados, hasta la cuarta semana, justo en el comienzo de la pubertad, en que se equipara en ambos casos, control y tratado, para volver a descender hacia la sexta semana, en que los animales ya son púberes y vuelven a experimentar una caída de peso, alcanzando el mayor índice de significación estadística ($p < 0,01$) en la última semana de tratamiento y el día de la retirada del mismo, para ir reduciéndose estas diferencias ($p < 0,05$) a los 5 y 10 días de supresión, equiparándose de nuevo a los diez días siguientes del periodo de supresión. A la vista de estos resultados, podemos deducir, que los efectos del clenbuterol sobre el peso del hígado pueden estar directamente relacionados con la edad, ya que como podemos observar en las gráficas 4 y 5, que representan los resultados de los tratamientos de los animales que empezaron la experimentación siendo adultos, y sobre todo durante el periodo de retirada, tienen los mismos niveles de significación estadística en los mismos periodos de tiempo que los prepúberes ($p < 0,01$), aunque en el caso de los adultos, comienzan a equipararse más tempranamente, a partir del día 10, mientras que en prepúberes esto sucede a partir del 15 de la retirada del tratamiento.

Con respecto a los resultados obtenidos, aplicando el tratamiento de la asociación de clenbuterol y dexametasona, aparece una disminución del peso hepático de los animales tratados con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) respecto a los controles y al grupo de adultos tratados con clenbuterol sólo, a partir de los 5 días del periodo de supresión. Podríamos afirmar, a la luz de esos resultados, que el grupo tratado con la asociación del β -agonista y corticoide alcanza unos niveles de reducción, en cuanto al peso hepático se refiere, intermedios entre los de los controles y los tratados con clenbuterol únicamente, quizá debido a un cierto papel de "enmascaramiento" ejercido por este corticoide. Así, se puede observar que durante el periodo de retirada, a los cinco días, mientras entre el grupo tratado con clenbuterol sólo, las diferencias con respecto a los controles son estadísticamente significativas, los pesos de los animales tratados con la asociación de dexametasona, prácticamente se igualan a los controles, hecho, por otra parte, que pone de manifiesto que la recuperación de estos animales es más rápida, una vez suspendido el tratamiento que en el caso de los animales sometidos únicamente a la influencia del clenbuterol.

Hay otros autores que sostienen que lo que se produce realmente es una disminución del peso del hígado. Mientras en otras especies esto sí está perfectamente demostrado, en la rata dicha evidencia no es tan clara, ya que en esas variaciones siempre hay que tener en cuenta, factores tan importantes como sexo, estirpe, edad del animal, dosis empleada, duración del tratamiento o vía de administración, como se refleja en la siguiente tabla, donde hemos recopilado, los resultados (expresados en gramos) obtenidos por otros autores:

Autor	Control	Dosis	Tratados
Pullar,1977(S.Dawley-♀)	6.03±0.14	0.1mg/kg/15 d	6.08 ± 0.14
Pullar,1977(S.Dawley-♀)	6.03±0.14	1mg/kg/15 días	6.60 ± 0.15
Pullar,1977(S.Dawley ♀)	6.03±0.14	10mg/kg/15 días	5.85 ± 0.07
Pullar,1977(S.Dawley-♀)	6.03±0.14	50mg/kg/15 días	4.78 ± 0.13
Pullar,1977(S.Dawley-♂)	3.58±0.32	2mg/kg/4 días	3.52 ± 0.32
Pullar,1977(S.Dawley-♂)	5.71±0.32	2mg/kg/11 días	5.41 ± 0.32
Pullar,1977(S.Dawley-♂)	8.37±0.32	2mg/kg/21 días	7.72 ± 0.32
Pullar,1977(S.Dawley-♂)	8.58±0.32	2mg/kg/21 días	7.91 ± 0.32
Portillo,1988(Wistar♂)	4.05 ±0.1	1mgOrc/kg/23d/sc	3.78 ± 0.14
Choo, 1990 (Wistar ♂)	13.5 ±0.3	0.6mg/kg/7 días	8.50 ± 0.50
Choo, 1990 (Wistar ♂)	12.4±0.2	2mg/kg/3 días	6.20 ± 0.17
Muramutsu, 1990 (Aves)	15.4±0.4	0.25mg/kg/21 días	13.8 ± 0.4
Bates,1991(Ratón ♂,mg)	340 ± 13	3µg/4 días	298 ± 13
Bates,1991(Ratón ♂,mg)	346 ± 13	3µg/8 días	345 ± 13
Buyse,1991(Aves ♂)	17.8 ±1.6	0.42ppm/42 días	19.9 ± 0.8
Buyse, 1991 (Aves ♂)	17.8± 1.6	0.42ppm/21 días	20.8 ± 1.1
Buyse, 1991 (Aves ♂)	17.8±1.6	0.42ppm/14 días	17.9 ± 1.07
Buyse, 1991 (Aves ♀)	19.1±1.7	0.42ppm/42 días	20.4 ± 1.0
Buyse, 1991 (Aves ♀)	19.1±1.7	0.42ppm/21 días	19.5 ± 0.6
Buyse, 1991 (Aves ♀)	19.1±1.7	0.42ppm/14 días	18.8 ± 0.7
Nebbia,1991(S.Dawley ♀)	10.3 ±0.2	2.5µg/kg/21 días	9.1 ± 0.3
Nebbia,1991(S.Dawley♀)	10.3± 0.2	25µg/kg/21 días	9.7 ± 0.4
Nebbia,1991(S.Dawley ♀)	10.3±0.2	50µg/kg/21 días	9.9 ± 0.1
Choo, 1992 (S.Dawley ♂)	10.3±0.3	4mg/kg/4 días	9.4 ± 0.3
Choo,1992(S.Dawley♂)	14.3±0.3	25mg/kg/5 días	11.9 ± 0.3
Takahashi,1993(Aves ♀)	14.9±0.01	0.33 mg/kg/14d	16.34 ± 0.01

Autor	Control	Dosis	Tratados
Moore, 1994 (Wistar ♀)	9.9 ± 0.4	1mg/kg/10 días	10.4 ± 0.2
Moore, 1994 (Wistar ♀)	9.9 ± 0.4	4mg/kg//10 días	10.1 ± 0.3
Moore, 1994 (Wistar ♀)	9.9 ± 0.4	83mg/kg/10 días	9.8 ± 0.4
Cardoso, 1996(Wistar ♂)	12.6±0.64	4mg/kg/15 días	12.87 ± 0.86
Spencer,1996(Corderos ♀)	741 ± 28	400 µg/Kg/49d	664 ± 25.8

De acuerdo a los resultados obtenidos por nosotros, trabajos realizados en ratas por Re *et al.*, (1993), demuestran que el peso del hígado puede llegar a disminuir, aunque muy levemente, tras el tratamiento prolongado con dicho fármaco. Los resultados obtenidos en nuestra experimentación, reflejan una clara disminución del peso del hígado desde el inicio del tratamiento ($p < 0,01$), así como una recuperación progresiva del mismo, una vez que se inicia el periodo de supresión, hasta igualarse a los pesos de los controles.

Si tenemos en cuenta la variación interespecie, Brambilla *et al.*, (1994), observaron en ratones, tras la administración intraperitoneal de una sólo dosis de clenbuterol, pero muy elevada (30 µg/g de peso vivo), hepatomegalia y por consiguiente incremento de peso, que pueden ser debidos a la acción metabólica del clenbuterol. En nuestro caso, no se producen estos fenómenos, debido quizá a la dosis empleada, que es más reducida (1 µg/g), pero también más continuada (45 días de tratamiento), sin obviar por supuesto que la especie considerada es distinta (rata).

Muramutsu *et al.*, en 1991 observaron que, a diferencia de otras especies de mamíferos, en las aves existen variaciones del comportamiento de los β-agonistas en cuanto se refiere al sexo, ya que los efectos de éstos son mucho más acentuados en hembras que en machos. En pollos de tres a seis semanas de edad, el peso del hígado se ve reducido considerablemente, mientras que el contenido proteico hepático, RNA y el contenido de grasa no presentan cambios significativos. Todo ello puede ser debido a la duración del tratamiento (tres semanas), dosis empleada (0,25 mg/kg) demasiado baja o la vía de administración (en la comida). Nuestros resultados muestran un descenso del peso del hígado que alcanza los

máximos niveles en la tercera semana de tratamiento, aunque carece de significación estadística ($p > 0,05$). En nuestra opinión, ello podría ser debido a que justo en ese periodo de tiempo (tres semanas) es cuando tiene lugar la máxima absorción del fármaco (Sauer *et al.*, 1995) y comienza lo que se denomina "dosis de acostumbramiento", a partir del cual los efectos del clenbuterol parecen estabilizarse y no se observan las diferencias espectaculares del comienzo.

*** Estructura y ultraestructura hepáticas**

El examen histológico del hígado resulta de gran utilidad, para asegurar la sensibilidad de los parámetros séricos, ya que en caso de una alteración mínima de éstos, la evidencia histológica de daño tisular es detectable a dosis muy bajas de una sustancia supuestamente hepatotóxica (Kosrud *et al.*, 1973; MacSween y Scothorne, 1997).

El examen anatomopatológico de nuestros animales a nivel microscópico está representado en las fotografías y demuestra la clara ausencia de lesiones hepáticas en los distintos periodos de la fase experimental, que comprenden desde el inicio del tratamiento al periodo de retirada o supresión del medicamento. A nivel macroscópico tanto coloración como consistencia eran normales, exceptuando algunos casos aislados (tanto en controles, como en animales tratados), en los que se detectaba una ligera congestión. Ésto lo atribuimos a la recolección de sangre, que en esos casos, fuese menor, y por tanto al quedar acumulada en hígado, macroscópicamente adquirirían una ligera tonalidad oscura.

Al igual que nosotros, Biolatti *et al.*, (1994) ya habían detectado en cerdas tratadas con clenbuterol (1 ppm/48 días), hígados más oscurecidos, pero estos autores lo atribuyeron al mayor acúmulo de glucógeno, alrededor de la vena central en los animales tratados o del lóbulo hepático en los controles. Mediante la tinción H/E, nosotros pudimos comprobar que el acúmulo de glucógeno era normal, y siempre alrededor de la vena central. En otros casos, y coincidiendo con Maltin *et al.*, (1992), mediante estudios de morfometría, comprobamos una ligera disminución del tamaño de los hepatocitos (gráfica nº 8). La explicación a este fenómeno se debería a que el clenbuterol es un potente vasodilatador, por lo que se produce un aumento

del fluido sanguíneo hepático, lo que conduce a una mayor compresión de los hepatocitos y, lógicamente, éstos disminuyen de tamaño, como indican los valores medios de nuestros resultados ($25,3 \pm 3,39 \mu\text{m}$ los controles, $21,3 \pm 2,90 \mu\text{m}$ los tratados), aunque esta reducción no va acompañada de lesión celular.

Para confirmar la normalidad, respecto a la estructura hepática, procedimos al examen ultraestructural, reforzando aún más los resultados obtenidos tras el examen microscópico. En nuestra opinión, y por la evidencia de las pruebas realizadas, el clenbuterol administrado a los animales no supuso ninguna alteración con respecto a funcionalidad y estructura hepáticas. Por el contrario, Cerruti Sola *et al.*, (1996) afirman que en aves hembra, las lesiones más consistentes son hipertrofia linfoide e infiltración en la mayoría de los tejidos, aunque estos cambios son particularmente evidentes en riñón, musculatura esquelética, hígado y tracto gastroentérico. Entre los cortes de hígado de los animales tratados, se observa un descenso del porcentaje global de glucógeno, comparado con los controles, el glucógeno se concentra alrededor de la vena central en lugar de su habitual localización sobre toda la superficie de los lóbulos hepáticos. Estos autores también observa degeneración hialina en los hepatocitos y afirma que las lesiones aumentan en los animales tratados a mayor dosis.

En contraposición, Marcato y colaboradores, (1985) publicaron un estudio relativo a las úlceras de abomaso, y observaron que los hígados de los animales tratados con clenbuterol, al cabo de cuatro meses, no presentaban lesiones orgánicas a nivel hepático, mientras que en los controles aparecían dos casos de lesiones degenerativas o fibrosis hepáticas. Este estudio refuerza los hechos anatomopatológicos comprobados por nosotros en las ratas, en las cuales ni macro ni microscópicamente se aprecian lesiones y además, en nuestro caso, los controles, incluso presentan a veces peor aspecto histológico que los animales tratados, destacando la presencia de hepatocitos esmerilados que nos hicieron recurrir a otras técnicas de tinción, (Tricrómico de Masson y Plata metenamina), para descartar definitivamente lesiones en estos animales que, insistimos, no habían sido tratados.

Como resumen, indicamos que el tratamiento con clenbuterol produce una reducción

del peso del hígado, cuya magnitud puede estar relacionada con la edad de los animales.

Cuando se asocia el clenbuterol a la dexametasona, la disminución del peso hepático dura menos tiempo, lo que indica una recuperación más temprana de los animales frente al tratamiento, una vez concluido éste. En ninguno de los tratamientos (clenbuterol o clenbuterol y dexametasona) la pérdida transitoria de peso hepático no lleva emparejada la aparición de lesiones *macroscópicas, microscópicas ni ultraestructurales, independientemente de la edad de los mismos*. Posteriormente, los hígados de los animales tratados, recuperan peso progresivamente, una vez que se produce el periodo de supresión del medicamento.

CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS Y HEPÁTICAS DE CLENBUTEROL

Para llevar a cabo un examen exhaustivo de los efectos producidos por el clenbuterol en nuestra experimentación, creímos conveniente completar dicho estudio mediante la determinación de las concentraciones de este beta-agonista, tanto en sangre como en hígado, ya que mediante la administración de una dosis determinada (1mg/kg) podríamos establecer la cantidad exacta de la misma vehiculada por la sangre y la almacenada en el hígado, para poder probar o descartar lesiones orgánicas a este nivel, como ya realizamos mediante el estudio anatomopatológico del mismo.

No administramos el tratamiento del clenbuterol asociado a la dexametasona a los animales prepúberes, para evitar el posible efecto inmunosupresor que la dexametasona (Ballarín y Sala, 1995) podría dar lugar a estos animales y obtener resultados que pudieran resultar contradictorios (Jiang *et al.*, 1996).

Los resultados obtenidos, muestran unas concentraciones plasmáticas de clenbuterol prácticamente paralelas en todos los grupos, desde el inicio del tratamiento, hasta la retirada del mismo. Cabe señalar, sin embargo, que encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre los mismos con respecto al grupo control desde la primera toma de sangre, que tiene lugar a los siete días de iniciado el tratamiento. Por otra parte, en el grupo integrado por los animales prepúberes, se observa, en determinadas tomas de sangre (T-2 y T-4), una mayor concentración de clenbuterol que en los adultos, justo antes del inicio de la pubertad, hasta las cinco semanas (T-5) en que los niveles de clenbuterol, tanto en púberes ya, como en adultos, son prácticamente similares, aunque ligeramente superiores en estos últimos hasta llegar al periodo de supresión en que no se detectan concentraciones plasmáticas de clenbuterol en ninguno de los grupos (en adultos a los 5 días de la retirada y en prepúberes a los diez). El grupo de adultos tratado con clenbuterol y dexametasona, muestra en el momento de la retirada (R-0), unas concentraciones inferiores a las de los dos grupos tratados con clenbuterol, de tal manera que a los cinco días están igualadas a los controles.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos deducir que la acumulación plasmática del clenbuterol y su eliminación están relacionados con la edad, comparando los resultados procedentes de los animales prepúberes y adultos, con unos altos niveles de significación estadística ($p < 0,001$). Así, podemos observar que los animales prepúberes comienzan a alcanzar las máximas concentraciones a los 15 días del tratamiento mientras que los adultos tardan una semana más, aunque también logran unos niveles plasmáticos mayores. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Meyer y Rinke, (1991) y Sauer *et al.*, (1995) en terneras. Sin embargo, tanto la dosis empleada ($10\mu\text{g}/\text{kg}$), vía de administración (pienso medicado) y especie (terneras) elegidas por estos autores son distintas a las de nuestra experimentación.

En cuanto a las concentraciones hepáticas de clenbuterol, podemos observar, que, en el momento de la retirada, los niveles son iguales (concentraciones superiores a $50\text{ ng}/\text{ml}$) en los adultos tratados con clenbuterol o la asociación de éste a la dexametasona, no apareciendo en ese momento diferencias estadísticamente significativas. A partir del quinto día de la supresión de ambos tratamientos ya se observan claras diferencias ($p < 0,001$) entre ambos grupos, igualándose a partir de los quince días, lo que indica la eliminación y detoxicación de ambos compuestos. Puede que la dexametasona actúe sobre los receptores β_2 hepáticos produciendo un bloqueo de los mismos, de tal manera que no son estimulados por la presencia de clenbuterol y por ello se observa esa gran desproporción, en el quinto día de la retirada, entre los dos grupos (Lindell *et al.*, 1994).

Por lo que respecta al grupo tratado con la asociación de clenbuterol y dexametasona, es claro el "efecto borrador" que ejerce ésta al manifestar unos niveles plasmáticos detectables de clenbuterol significativamente inferiores ($p < 0,001$), con respecto a los grupos tratados con clenbuterol únicamente y con respecto a los controles, a partir de las tomas 6 y 7. Ello podría ser debido, en nuestra opinión, bien a un efecto supresor de la dexametasona sobre la glándula adrenal, de acuerdo con Toutain *et al.*, (1984), o a un cierto "secuestro" del clenbuterol a nivel hepático, producido por el corticoide, de acuerdo con Foucauld *et al.*, (1998) y Falkner (1998), de tal forma que en virtud de un fenómeno de retrofuncionalidad negativa sobre los

receptores hepáticos, las concentraciones sanguíneas de clenbuterol serían menores, en el grupo tratado con la asociación, hasta que han transcurrido los quince días de retirada del fármaco y los niveles son iguales a los de los controles; es decir, ya no se detecta clenbuterol.

Como conclusión final, podríamos establecer que si bien la edad del animal puede jugar un papel importante en lo que a metabolismo del clenbuterol se refiere, el hecho de ser administrado junto a otras sustancias como glucocorticoides sintéticos (dexametasona), puede enmascarar los niveles detectables en sangre o en hígado, dando lugar a falsos negativos en las distintas técnicas analíticas empleadas, lo que supondría un fraude con respecto a la verificación de si un animal está tratado o no con clenbuterol.

INSULINA

La insulina es una hormona estrechamente ligada a los procesos metabólicos que tienen lugar en el organismo. A corto plazo, incrementa la oferta intracelular de sustratos para el almacenamiento de energía, activando sistemas de transporte, intensificando la absorción de la glucosa, aminoácidos y ácidos grasos. En esta fase, el hígado es una excepción, ya que el paso de glucosa y ácidos grasos, es independiente de la insulina (Goberna, 1992).

A medio plazo, los efectos más notorios producidos por la insulina, se centran sobre la actividad enzimática, orientada a la síntesis de triacilglicéridos y glucógeno. Todo ello, se traduce en un incremento de las actividades enzimáticas relacionadas con la formación de las reservas energéticas (Prior y Smith, 1982).

Decidimos determinar las concentraciones plasmáticas de insulina por el papel tan fundamental que ésta desempeña en el metabolismo de los glúcidos, ácidos grasos y proteínas. Se analizaron dichas concentraciones en los animales prepúberes única y exclusivamente, para ver como influía el tratamiento con clenbuterol sobre los niveles de esta hormona en la fase del crecimiento de los animales, ya que mientras que en la pubertad aumenta la secreción de GH (hormona del crecimiento), esta elevación no va acompañada de un aumento importante de los factores de crecimiento insulínicos (IGF) en plasma (Devesa *et al.*, 1992).

De los resultados obtenidos en nuestra experimentación, se puede observar que, partiendo de una toma basal, durante la primera semana de tratamiento se elevan progresivamente las concentraciones plasmáticas de insulina en los animales tratados, alcanzando los niveles máximos a la cuarta semana de tratamiento (T 5), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). A partir de la quinta semana de tratamiento (T 6), y durante los periodos de retirada, se observan variaciones que no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$), en tanto en cuanto, los valores de insulina oscilan y descienden en los animales tratados, mientras que en los controles al mismo tiempo van elevándose.

Resultados obtenidos por otros autores demuestran también, al igual que ocurre en nuestros animales, que tras los tratamientos con clenbuterol, se produce un incremento, bien en la liberación de insulina o en el incremento de la sensibilización de los receptores insulínicos, sobre todo a nivel de los tejidos muscular y adiposo, y no en hígado (Ahren y Lundquist, 1981; Bonen *et al.*, 1986; Morgan 1990). La administración crónica de clenbuterol disminuye el tamaño de los adipocitos subcutáneos y perirrenales y hay una relación inversa entre el tamaño de las células grasas y la subida de glucosa estimulada por la insulina. De este modo, el tratamiento con clenbuterol estimula a estas células empequeñecidas para que sean más sensibles a la insulina (Torgan *et al.*, 1993).

Emery *et al.*, (1984) y Mc Elligot *et al.*, (1987) no observan cambios en los niveles de insulina, en tratamientos crónicos, y si éstos se producen la tendencia es hacia un descenso, pero carece de significación estadística, mientras que en nuestro caso observamos, desde el inicio del tratamiento, una elevación progresiva de dichos niveles. En nuestra opinión esto puede ser debido en primer lugar a la vía de administración empleada, en nuestro caso la oral, y se sabe que los efectos del clenbuterol son más duraderos cuando se utiliza esta vía, como ya señaló Lafontan *et al.*, (1988); por tanto, daría más tiempo a la activación, por parte del beta-agonista, de los receptores insulínicos tanto pancreáticos como del tejido adiposo. Por otra parte y en segundo lugar, estos autores, realizaron sus trabajos con machos, y nosotros con hembras, además de incluir como es el caso de Mc Elligot *et al.*, (1987), ratas diabéticas, para su estudio, y lógicamente la respuesta no es la misma, aunque paradójicamente, observa un ligero descenso, en las ratas tratadas con clenbuterol.

Otro factor que creemos de vital importancia, en nuestro trabajo y de acuerdo con Reeds *et al.*, (1987), es la edad de los animales, ya que se trata de impúberes que alcanzan las diferencias con mayor índice de significación estadística ($p < 0,001$), justo hasta el periodo en que terminan la pubertad. Podría existir, a nuestro juicio, una relación muy directa con respecto a la hormona del crecimiento, hecho que pudimos comprobar mediante la observación externa del desarrollo de la masa muscular, en los animales tratados de acuerdo a los estudios realizados en corderos jóvenes por Young *et al.*, (1995), y por ello, al administrar el

clenbuterol, se producen esas diferencias con respecto a los controles, aunque ambos grupos tengan la misma edad, además de no olvidar que uno de los tejidos de elección por excelencia de la insulina es el muscular.

El clenbuterol actúa sobre los receptores musculares β_2 frente a la insulina (Illera, 1993), dando lugar a un aumento de la acción anabolizante de esta hormona, a nivel muscular. Por el contrario, Yang y McElligot (1989) y Liu y Mills (1990) sostienen que el número de receptores β a nivel muscular y de tejido adiposo desciende en roedores y, en tratamientos crónicos con beta-agonistas, las concentraciones plasmáticas de insulina, permanecen invariables o descienden, pero Yang y McElligot (1989) no especifican si se refiere al clenbuterol o a otro agonista β -adrenérgico. En nuestro caso, y como ya hemos explicado anteriormente, aunque no hemos determinado la proporción de receptores, hemos observado un incremento, estadísticamente significativo, de las concentraciones plasmáticas de insulina ($p < 0,05$ hasta $p < 0,001$), en tratamientos crónicos con clenbuterol (45 días) y ello nos induce a pensar que quizá la densidad de estos receptores, sobre todo a nivel muscular, se vea incrementada y la respuesta por tanto, sea diferente. Liu y Mills (1990) atribuyen este efecto a la presencia de agentes que estimulan la producción de AMP-c, en este caso el clenbuterol, pero estos autores han realizado sus trabajos en adipocitos de cerdo mediante cultivos *in vitro*, mientras que nuestra experimentación se realizó con animales vivos y además roedores, pudiéndose encontrar diferencias por este motivo.

En definitiva, el tratamiento con clenbuterol produce un aumento de las concentraciones plasmáticas de insulina, debido al aumento de la sensibilización de los receptores en tejido adiposo y muscular, aunque también es variable dicho efecto en función de la edad de los animales y vía de administración empleada.

GLUCOCORTICOIDES: CORTICOSTERONA y CORTISOL

Algunos animales de laboratorio, tales como hámsters, cobaya, y gerbillos, se parecen al hombre en lo referente a que el cortisol es el glucocorticoide más secretado, mientras que otros roedores, tales como la rata y el ratón, principalmente secretan corticosterona (Woodman, 1997). Esta escasa capacidad para producir cortisol, según Conley y Bird (1997), se debe a las rutas metabólicas de la esteroidogénesis adrenal en las distintas especies, ya que la rata produce mayor cantidad de corticosterona por un déficit de la enzima cP450 17 α hidroxilasa 20 liasa, responsable de la transformación de pregnenolona en los precursores del cortisol.

Entre las funciones llevadas a cabo por los glucocorticoides, al mismo tiempo que se encargan de regular el metabolismo de glúcidos, proteínas y grasas, intervienen, de una manera fundamental, en dotar al organismo de una mayor capacidad de reacción frente al estrés (De Paolo y Masoro, 1989). Por esta razón, en lo que a efectos metabólicos se refiere, determinamos las concentraciones de ambos.

De los resultados obtenidos en nuestra experimentación, con respecto a las concentraciones plasmáticas de corticosterona (gráficas 10 y 11), se observa una elevación, estadísticamente significativa, en los grupos tratados con clenbuterol (prepúberes y adultos) desde la primera semana ($p < 0,05$), hasta que transcurren 5 días del periodo de retirada ($p < 0,001$), momento a partir del cual se produce un descenso drástico de dichas concentraciones, hasta equipararse a las de los controles, durante los quince días restantes que completan el periodo de supresión.

En el grupo tratado con clenbuterol y dexametasona, la evolución de las concentraciones de corticosterona es igual que en el caso anterior, pero la caída de las mismas, a partir del quinto día es mucho más pronunciada, llegando a situarse a unos niveles inferiores a los de los controles, a partir de los 10 días de la retirada del tratamiento, aunque carece de significación estadística ($p > 0,05$).

Las concentraciones de cortisol en animales prepúberes experimentan (gráfica 12) a partir de la primera semana de tratamiento, una elevación estadísticamente significativa ($p < 0,001$) con respecto a los controles, alcanzando los máximos niveles en el día de la retirada del tratamiento, justo cuando termina la fase de la pubertad.

Las concentraciones de cortisol, en los animales adultos, aparecen reflejadas en la gráfica 13 y, son también, superiores a las de los controles ($p < 0,001$), elevándose, en este caso, a partir de la segunda semana de tratamiento ($p < 0,001$).

Con respecto al grupo tratado con la asociación de clenbuterol y dexametasona (gráfica 13), también se produce un incremento de las concentraciones de cortisol ($p < 0,05$) comparadas con las de los controles.

Nuestros resultados indican un claro aumento de las concentraciones de ambas hormonas, coincidiendo con los resultados obtenidos en ratas por Sillence *et al.*, (1993) y Bruckmaier y Blum (1992) en terneras. Esto puede ser debido a que el número de receptores β_2 tisulares se vea incrementado por los glucocorticoides, pudiendo ser ésta una razón por la cual el grupo tratado con dexametasona y clenbuterol, alcanzase las concentraciones más altas de estos dos parámetros. Para Yang y McElligot (1989), las concentraciones de cortisol no varían, ni en corderos ni en ratas, aunque coincide en nuestras apreciaciones, al destacar que, regulan el número de receptores.

Por otra parte, y de acuerdo con Spencer y Oliver (1996), la elevación de los glucocorticoides va precedida y acompañada de alteraciones en la actividad del Sistema Nervioso Simpático, en particular una elevada secreción de epinefrina y norepinefrina, siendo el clenbuterol el responsable de esta elevación por su estímulo sobre la ACTH hipofisaria que produce la descarga de catecolaminas, aumentando la producción de glucocorticoides procedentes de la corteza adrenal, por lo que, lógicamente, sus niveles en sangre periférica se encuentran muy elevados. De la misma opinión es Buyse *et al.*, (1991) que, en trabajos con aves, demuestra que los tratamientos con clenbuterol aumentan la producción de

glucocorticoides, especialmente corticosterona, pero, al contrario que en nuestro estudio, ésta es mayor en animales más jóvenes y en machos. En nuestro caso, los niveles más altos de corticosterona se detectan en los animales adultos, mientras que los que iniciaron el tratamiento siendo prepúberes experimentan una gran subida, pero ésta no es tan espectacular como en los anteriores, debido quizá a que estén implicados otros mecanismos hormonales. Las concentraciones de cortisol, por el contrario, alcanzan unos valores plasmáticos más altos que las de corticosterona en los animales prepúberes y ello podríamos justificarlo, de acuerdo con Cardoso y Stock (1998), a las concentraciones de insulina obtenidas en este grupo, claramente superiores a las de los controles, lo que provoca una caída de las concentraciones plasmáticas de glucosa, que estimula la producción de ACTH, dando lugar a la elevación de los niveles de cortisol y los de corticosterona.

Por otro lado, Ait-Chaoui *et al.* (1995), en ratas Long-Evans de distintas edades, observan un incremento en las concentraciones de corticosterona más acentuado en animales jóvenes. Ésto podría ser debido, en la opinión de esos autores, a que a medida que el animal va envejeciendo la esteroidogénesis adrenal va reduciéndose, quizá porque la edad puede alterar las concentraciones de las moléculas a las cuales pueden estar expuestas las adrenales y por tanto la sensibilidad frente a la ACTH.

Con respecto al tratamiento combinado de clenbuterol y dexametasona, discrepamos con Bette y Kietzmann (1991) y Ait-Chaoui (1995) ya que éstos destacan una disminución de los niveles de corticosterona *in vivo* en ratas tratadas con dexametasona. Nosotros, hemos observado un aumento de dichas concentraciones en los animales tratados con clenbuterol y dexametasona, aunque bien es cierto, que éstas son menores que en los animales tratados únicamente con clenbuterol, lo cual es lógico, ya que por una parte el clenbuterol aumenta las concentraciones de corticoides y por otra, la dexametasona bloquea la producción endógena de ACTH (Almeida *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 1998), y por ello disminuyen los niveles plasmáticos de esta hormona, en relación a los grupos tratados exclusivamente con clenbuterol. Estos dos hechos, son los responsables, desde nuestro punto de vista, de que el aumento de las concentraciones de corticosterona observado en los animales tratados con la asociación de

clenbuterol y dexametasona, se sitúe en unos valores inferiores a los de los animales expuestos solamente al clenbuterol.

En definitiva, el tratamiento con clenbuterol sólo o asociado a la dexametasona, en ratas, da lugar a un incremento de las concentraciones de corticosterona y cortisol al provocar un incremento del número de receptores β_2 tisulares, o al estimular directamente el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, pudiendo jugar también un papel importante la edad de los animales y determinados estados endocrinos de los mismos.

**ESTEROIDES GONADALES: PROGESTERONA, 17- β ESTRADIOL Y
ANDROSTENODIONA**

PROGESTERONA

Conforme a los resultados obtenidos en nuestra experimentación, podemos comprobar que los niveles de progesterona, en los animales tratados con clenbuterol, son claramente inferiores a partir de la segunda semana de tratamiento ($p < 0,05$), alcanzando las máximas diferencias justo en las tres últimas semanas anteriores (T-5, T-6 y T-7) a la finalización del mismo ($p < 0,001$). A partir de la sexta semana, se inicia un periodo de recuperación en los animales tratados, que coincide con una disminución paralela en los animales control, lo que se aprecia muy claramente a medida que se produce la retirada del fármaco, llegando a igualarse, prácticamente a los 20 días de la retirada. Por lo que respecta al grupo tratado con la asociación de clenbuterol y dexametasona, es curioso observar, durante el periodo de supresión, no sólo como los niveles no descienden, sino que se sitúan en un rango superior al de los controles, llegando a alcanzar las máximas diferencias ($p < 0,001$) a los cinco días de la retirada del tratamiento, aunque posteriormente, descienden, para elevarse ligeramente a los 20 días con respecto a los controles.

A nuestro juicio, que coincide con el de Sillence *et al.* (1995), el descenso de los niveles de progesterona, en los animales tratados, se produce por el mecanismo de acción del clenbuterol sobre los receptores de progesterona, a nivel ovárico, ya que provoca una disminución de dichos receptores y, por lo tanto, se ve considerablemente afectada la liberación de la hormona. Dacasto *et al.* (1994), mediante investigaciones en cerdos, especie animal de crecimiento rápido (al igual que los roedores), también encontraron una disminución de las concentraciones plasmáticas de progesterona, pero, a diferencia de Sillence *et al.* (1995), estos autores comprobaron que se producía un incremento de las concentraciones de receptores de progesterona en útero y no en ovario. En ambos casos, los tratamientos con clenbuterol producen alteraciones sobre el número de receptores de progesterona, a nivel del aparato genital, influyendo posteriormente sobre el eje hipotálamo-hipofisario y dando lugar

a un fenómeno de retrofuncionalidad negativa, que bloquearía la respuesta del órgano efector, y por ello, en vez de aumentar, disminuirían las concentraciones de progesterona, independientemente del aumento de receptores de progesterona a nivel ovárico o uterino.

De acuerdo con Biolatti *et al.* (1990), podríamos pensar que el descenso de los niveles plasmáticos de progesterona, podría deberse a los hallazgos anatomopatológicos observados a nivel del tracto genital, que coinciden macroscópicamente con los nuestros, tanto a nivel ovárico, donde pudimos comprobar la existencia de una mayor proliferación de folículos en distintos grados de desarrollo, como a nivel uterino, con un mayor engrosamiento del mismo, en los animales tratados con clenbuterol y que comportarían un descenso de la actividad cíclica ovárica. Con respecto al grupo tratado con la asociación de clenbuterol y dexametasona, y de acuerdo con Biolatti *et al.* (1994) pudimos observar, en los ovarios de las hembras tratadas, un menor número de folículos, debido probablemente a la acción de la dexametasona.

En cuanto a la variación de los valores de progesterona y coincidiendo con Butcher *et al.* (1974), durante el periodo de retirada en los animales controles, podríamos atribuirlos a la fase del ciclo en la que se encontrasen dichas hembras (cuyo cálculo se realizaría, en función de las concentraciones de progesterona obtenidas, y la interrelación con los niveles de LH de acuerdo a este autor). Butcher *et al.* sostienen que, en la rata, los niveles de progesterona se incrementan coincidiendo con la descarga preovulatoria de LH, variando su margen desde 1-5 ng/ml a 40-50 ng/ml en suero o plasma. Después, la concentración de progesterona desciende a los niveles basales del estro, coincidiendo con un incremento de los niveles de LH procedente de las gónadas y posteriormente se produce una nueva elevación de los niveles de progesterona, que se hace más patente en el primer día del diestro, alcanzando unos valores de 20-30 ng/ml.

Nosotros pensamos que si estas variaciones, en cuanto a concentraciones de progesterona se refieren, están relacionadas con los niveles de LH no se producirían por un efecto sobre los receptores de LH a nivel genital, sino directamente sobre el eje hipotálamo-hipofisario ya que como es de todos conocido, la LH, es una hormona, cuya descarga está

relacionada muy estrechamente con factores exógenos.

En nuestro caso, y dado que se produce una supresión del tratamiento, es lógico pensar que, a partir de ésta, los animales tratados experimenten unas variaciones que conducen a la recuperación de los valores hormonales normales, alterándose al mismo tiempo, la ciclicidad de los mismos y los controles, de tal manera que los niveles máximos y mínimos, de progesterona y LH, variarían, en función de la nueva situación creada a partir de la retirada del medicamento que constituiría un factor exógeno importantísimo y, por tanto, a nivel del Sistema Nervioso Central se producirían esas oscilaciones detectadas, en nuestros animales utilizados como control, hasta adaptarse completamente y volver a tener una ciclicidad más homogénea. Por supuesto, estos resultados, correspondientes al periodo de retirada, respecto a los controles, carecen de significación estadística ($p > 0,05$).

Otro factor que puede influir sobre las concentraciones de progesterona, y que debemos tener en cuenta, es la dosis empleada, de tal manera que la utilización de dosis elevadas de clenbuterol, en tratamientos crónicos, produce un efecto bloqueante sobre los receptores de progesterona y las concentraciones de la misma, a la luz de los resultados obtenidos por nosotros, disminuyen, mientras que, por el contrario, para Nebbia *et al.* (1991) no se ven afectadas, claro que la dosis a la que observa este efecto (50 μ g/kg) es sensiblemente menor a la empleada por nosotros (1mg/kg) y, por tanto, el bloqueo de los receptores de progesterona, en nuestro caso, sería mayor y, consecuentemente, la liberación de la hormona, menor.

Sin embargo, Re *et al.* (1993) observa que las concentraciones plasmáticas de progesterona no se ven afectadas, a pesar de la aparición de las lesiones macroscópicas observadas en el tracto genital, afirmando que el tratamiento con clenbuterol no afecta significativamente al número de receptores de progesterona uterinos, aunque en estudios más recientes se ha visto que la estimulación de los receptores β -adrenérgicos (Re, *et al.* 1997), en el SNC, está directamente implicada en la supresión de la liberación de las gonadotropinas debido a la supresión de la liberación de la LH, mediante el estímulo de los receptores α_2 -

adrenérgicos (Cagampang et al., 1992) y se observan alteraciones significativas en las concentraciones de los receptores de progesterona, en tratamientos crónicos, lo cual apoya nuestra teoría.

Concluyendo, el tratamiento con clenbuterol, y en función de la dosis y en situaciones de cronicidad, da lugar a una caída de los niveles de progesterona, al disminuir, localmente, el número de los receptores de progesterona a nivel genital, originando lesiones macroscópicas, o bien al actuar a nivel central, sobre el eje hipotálamo-hipofisario.

17β-ESTRADIOL

Esta hormona pertenece al grupo de los estrógenos que junto con la progesterona, son los responsables de los procesos reproductores en la hembra. En las adrenales, también se secreta estradiol, aunque en pequeñas cantidades (Woodman, 1997).

Los resultados obtenidos, en nuestra experimentación, nos permiten observar, cómo el tratamiento con clenbuterol eleva las concentraciones plasmáticas de 17β-estradiol, a partir de la tercera semana de tratamiento, alcanzando los mayores niveles el día de la retirada, con un altísimo índice de significación estadística ($p < 0,001$), simultáneo a la disminución de las concentraciones de progesterona. A partir de este momento, tiene lugar una caída drástica de dichos niveles, hasta que se igualan prácticamente al de los controles.

En el tratamiento en que se añade dexametasona también se produce una elevación de dichos niveles, pero a diferencia con el tratamiento anterior, persiste y se incrementa, con un alto índice de significación estadística ($p < 0,001$) durante el periodo de supresión, con respecto al grupo control y al tratado con clenbuterol, subsistiendo este efecto a los 20 días de la retirada, lo que pudimos corroborar macroscópicamente por la aparición de quistes foliculares en los ovarios de estas hembras.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Re *et al.* (1990) en ratones y Dacasto

et al. (1994) en cerdos, observando, del mismo modo, un incremento, estadísticamente significativo, de los niveles de 17 β -estradiol. Creemos que la explicación de este incremento se debe al aumento de la concentración del número de receptores de estrógenos, paralela a la disminución del número de receptores de progesterona, tanto en útero como en vagina y, al aplicar tratamientos prolongados, se produce una intensa estimulación beta-adrenérgica, que conduce a la mayor producción de estrógenos (Re *et al.*, 1993) y, por tanto, falta de ciclicidad ovárica a nivel de los órganos efectores, siendo, por otra parte, la responsable del aumento de estrógenos, que conducen a la aparición de lesiones en el aparato genital femenino y que nosotros pudimos observar, como hemos señalado anteriormente.

Por el contrario, Re *et al.* (1995) encuentran una disminución de los niveles plasmáticos de esta hormona, a pesar de aumentar significativamente el número de receptores estrogénicos en útero, pero no así a nivel hepático e hipofisario. Quizá sea ésta la causa que impide una elevación de los niveles de estradiol. En nuestra experimentación, la dosis de clenbuterol empleada fue considerablemente superior (1 mg/kg) y dada la baja capacidad de unión a los receptores estrogénicos uterinos que presenta el clenbuterol, es lógico pensar, que, a las dosis relativamente bajas empleadas por estos autores (2,5 μ g/kg, 25 μ g/kg y 50 μ g/kg), la reactividad de los centros efectores sea menor y, por tanto, las concentraciones de estradiol disminuyan. Resultados obtenidos por Nebbia *et al.* (1991) indican, contrariamente a nosotros, una disminución de los niveles plasmáticos de estradiol y sólo cuando aumenta la dosis del β -agonista, las diferencias con respecto a los controles, no son tan acentuadas como las nuestras.

En trabajos más recientes, Re *et al.* (1997) han observado, en ratas adultas, una disminución en los niveles plasmáticos de hormonas sexuales circulantes, atribuyendo este hecho a la estimulación de los receptores adrenérgicos a nivel del SNC, lo que produce cierto grado de supresión de la liberación de las gonadotropinas. Nuestros resultados reflejan el fenómeno contrario, es decir un aumento de las concentraciones plasmáticas de 17 β -estradiol, quizá debido a que la dosis empleada es diferente en nuestro caso y el periodo de exposición al tratamiento es considerablemente mayor en el caso de estos autores (121 días), por lo que la disminución observada, podría deberse lógicamente a un fenómeno de retrofuncionalidad

negativa sobre el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal.

Como conclusión, podríamos afirmar que las concentraciones plasmáticas de 17β-estradiol se elevan tras los tratamientos con clenbuterol, posiblemente debido a la activación de los receptores estrogénicos, tanto a nivel genital como central, produciendo alteraciones con respecto a la ciclicidad ovárica, detectables macroscópicamente mediante la aparición de quistes foliculares.

ANDROSTENODIONA

Decidimos determinar las concentraciones de androstenodiona (precursor hormonal de la testosterona), ya que, debido al carácter anabolizante que presentan los andrógenos *per sé*, contribuyen a aumentar la síntesis proteica y favorecen el desarrollo de la masa ósea y muscular (Wilson, 1996), al mismo tiempo que podríamos estudiar la repercusión que los tratamientos con clenbuterol o la asociación del beta-agonista a la dexametasona, ejercerían sobre dichas acciones.

Nuestros resultados nos muestran que es éste el esteroide menos afectado por la presencia de clenbuterol o éste asociado a la dexametasona. Podríamos atribuir este fenómeno a que al ser la precursora de otras hormonas esteroides, su concentración no parecería verse afectada, pero sí las de otras hormonas debido a los cambios en sus respectivos sistemas enzimáticos.

Así, con respecto al grupo tratado únicamente con clenbuterol (gráfica 16), no se aprecian diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles, excepto al finalizar el tratamiento, en que el grupo tratado, se distancia del control ($p < 0,05$), aunque luego, en la retirada vuelven a producirse las mismas oscilaciones en ambos grupos.

En el grupo tratado con la asociación de clenbuterol y dexametasona (gráfica 16-a), las concentraciones de androstenodiona se sitúan a unos niveles ligeramente inferiores a los

de los controles, descendiendo desde el comienzo del periodo de retirada, pero sin llegar a alcanzar una diferencia significativa, hasta diez días después de transcurrido el mismo ($p < 0,01$), para elevarse posteriormente e igualarse tanto a los animales tratados con clenbuterol sólo, como a los controles.

Los resultados obtenidos en nuestra experimentación coinciden con la opinión de Le Goasogne *et al.* (1995), ya que hemos de tener en cuenta que este precursor de la testosterona se comporta como andrógeno, cuando se transforma en testosterona o en dehidroepiandrostenodiona (DHEA); en la rata a nivel de las adrenales, se producen cantidades ínfimas de DHEA, por lo cual la exposición continuada frente al clenbuterol no sensibilizaría los receptores de testosterona a este nivel, pudiendo estar originada su secreción a partir del Sistema Nervioso Central y, por ello, sí se detecta un ligero aumento de los niveles plasmáticos de esta hormona, que carece de significación estadística.

Por el contrario, el grupo tratado con la asociación de clenbuterol y dexametasona experimenta una disminución, estadísticamente significativa ($p < 0,001$), con respecto al grupo control y al tratado exclusivamente con clenbuterol. Podríamos atribuirlo a la estimulación directa de la glándula adrenal, por parte de la dexametasona, dando lugar a un fenómeno de retrofuncionalidad negativa sobre el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, que conduce a una mayor disminución de los niveles de esta hormona. Este hecho lo podemos comprobar a medida que transcurre el periodo de retirada y, por tanto, ya se ha eliminado por completo la estimulación por parte de los glucocorticoides exógenos (dexametasona), aumentando los niveles de androstenodiona, aunque insistimos, sin que tengan significación estadística alguna.

Atendiendo al estímulo, por parte de los receptores estrogénicos locales, y de acuerdo con Yuan *et al.* (1995), en la rata hembra, los niveles elevados de andrógenos van asociados a un incremento de la secreción de otras hormonas ováricas, como por ejemplo el estradiol. El clenbuterol aumenta el número de receptores estrogénicos a nivel ovárico y uterino y, por tanto, las concentraciones plasmáticas de estradiol se ven también incrementadas, como ya vimos en los resultados correspondientes a esta hormona, por lo cual también es de suponer

que se produce un incremento de andrógenos que a nivel central, y gracias a la acción de la enzima aromataza, se convierten en estrógenos. Según la fase del ciclo en que se encuentre la hembra, la actividad de esta enzima varía, y es menor en el proestro, aumentando la actividad de los receptores estrogénicos cerebrales en un 50%. Ésta pudiera ser la razón de haber obtenido unos valores plasmáticos de estradiol mucho más elevados y con significación estadística ($p < 0,001$) en los animales tratados, en detrimento de una subida muy ligera de las concentraciones plasmáticas de androstenodiona.

Por otra parte, y como ya señalaron Taylor *et al.* (1996), la androstenodiona puede formarse a partir de la progesterona, pero de una manera transitoria, debido a la actividad de la 17β- hidroxisteroide reductasa (17β-HOR), que es la enzima responsable de la verdadera transformación de la androstenodiona en testosterona. Nuestros resultados muestran una clara disminución de los niveles de progesterona en los animales tratados con clenbuterol, por lo cual, al descender los niveles de progesterona esa formación transitoria de androstenodiona sería menor y, por ello, no se observan grandes diferencias, entre los animales tratados frente a los controles. Como ya vimos en su momento, los niveles de progesterona comenzaban a aumentar a partir de la finalización del tratamiento de los animales con clenbuterol. Es en este punto donde nuestros resultados reflejan, al mismo tiempo, un aumento significativo ($p < 0,05$) de las concentraciones de androstenodiona, por lo que, de acuerdo con Silence *et al.* (1995), ello podría deberse a que, al terminar el periodo de exposición al clenbuterol, el número de receptores de progesterona experimentaría una clara recuperación, que conduciría a mayor liberación de la hormona y, por tanto, la síntesis de androstenodiona también se vería incrementada.

Como resumen final, destacamos que el clenbuterol no ejerce una influencia tan directa sobre las concentraciones de androstenodiona por ser un precursor hormonal, pero sí indirectamente a través de otras hormonas como la progesterona o el 17β-estradiol.

CONCLUSIONES

Una vez analizados los resultados obtenidos en nuestro estudio podemos deducir de ellos las siguientes conclusiones:

1ª CONCLUSIÓN: Los tratamientos con clenbuterol, a dosis superiores a las anabolizantes, en ratas, producen incrementos espectaculares de peso, directamente relacionado con la edad de los animales, vía de administración y duración del tratamiento. La asociación con dexametasona, estimula también la ganancia de peso corporal persistiendo aún en el periodo de supresión.

2ª CONCLUSIÓN: Los tratamientos con clenbuterol dan lugar a una reducción del peso del hígado, cuya magnitud puede estar relacionada con la edad de los animales. Asociado a la dexametasona, la disminución del peso hepático dura menos tiempo, lo que es indicativo de una recuperación más temprana de los animales.

3ª CONCLUSIÓN: Los tratamientos con clenbuterol aislado o conjuntamente con la dexametasona no van acompañados de lesiones en hígado macroscópicas, microscópicas ni ultraestructurales en hígado, independientemente de la edad de los animales.

4ª CONCLUSIÓN: La edad de los animales juega un papel importante en el metabolismo del clenbuterol. Unido al hecho de que al ser administrado junto a otras sustancias, como glucocorticoides sintéticos, se pueden enmascarar los niveles de clenbuterol plasmáticos y hepáticos detectables, dando lugar a falsos negativos en las distintas técnicas empleadas, que conduciría a la creencia de que el animal no haya sido tratado con clenbuterol.

- 5ª CONCLUSIÓN:** Los tratamientos con clenbuterol, en animales prepúberes, producen un aumento de las concentraciones plasmáticas de insulina, debido al aumento de la sensibilización de los receptores, en tejido adiposo y muscular, aunque también es variable según la vía de administración.
- 6ª CONCLUSIÓN:** El tratamiento con clenbuterol, o clenbuterol y dexametasona, da lugar a un incremento de las concentraciones plasmáticas de cortisol y corticosterona, al provocar un aumento del número de receptores β_2 tisulares o mediante el estímulo directo del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal. Este incremento también depende de la edad de los animales.
- 7ª CONCLUSIÓN:** Los tratamientos con clenbuterol, o asociado a la dexametasona, dan lugar a una caída de los niveles de progesterona al disminuir los receptores de progesterona a nivel genital, al actuar a nivel central, sobre el eje hipotálamo-hipofisario, así como por ser el agente responsable de las lesiones macroscópicas detectadas en el aparato genital.
- 8ª CONCLUSIÓN:** Las concentraciones plasmáticas de 17β -estradiol se elevan tras los tratamientos con clenbuterol, o con la asociación de éste a la dexametasona, mediante la activación de los receptores estrogénicos tanto a nivel genital como central, y por la aparición de quistes foliculares, quedando las hembras sin ciclicidad.
- 9ª CONCLUSIÓN:** El clenbuterol no influye directamente sobre las concentraciones de androstenodiona por ser ésta un precursor hormonal, pero sí a través de la acción de otras hormonas esteroideas.

CONCLUSIÓN FINAL: Como conclusión final destacaremos que los tratamientos con clenbuterol, aislada o conjuntamente con la dexametasona, producen serias alteraciones en lo que al fisiologismo animal se refiere, aunque posteriormente, durante los periodos de retirada, los animales se recuperan paulatinamente, volviendo a recobrar casi por completo su funcionalidad normal.

RESUMEN

El trabajo realizado en esta Tesis, ha consistido en la observación de los efectos que ejerce el clenbuterol en los animales de laboratorio tanto sobre su fisiologismo en general, como los efectos directos llevados a cabo sobre el hígado de dichos animales.

Para la elaboración de estos supuestos, utilizamos ratas hembra de la estirpe Long-Evans. Distribuimos a los animales en dos grupos, según la edad, de tal forma que comprobamos, al mismo tiempo, los efectos sobre los animales prepúberes y los adultos.

En cuanto a la aplicación del tratamiento, también se procedió a administrar dos tipos del mismo. En uno de ellos, mediante vía oral un grupo de animales, tanto adultos como prepúberes ingerían 1mg/kg de peso vivo de clenbuterol. El otro tratamiento, llevado a cabo únicamente en animales adultos, consistió, en la administración de clenbuterol (1 mg/kg) asociado a dexametasona, ésta última inyectada por vía subcutánea (0,1 μ g/kg), diez días antes de la finalización del tratamiento. La duración de los dos tipos de tratamiento fue la misma (45 días), y en ambos se contemplaron los mismos periodos de supresión, cuya duración fue de 20 días, llevando a cabo los muestreos con una alternancia desde el último día de la administración y posteriormente cada cinco días.

Los dos tipos de tratamiento empleados nos permitieron contemplar si se producían diferencias entre ellos, y los periodos de recuperación de los animales una vez finalizados los mismos.

Para comprobar los efectos anabolizantes del clenbuterol, se midió la ganancia de peso experimentada por los animales, y pudimos observar que se producía un espectacular incremento del mismo, que posteriormente se estabilizaría e igualaría a los de los animales utilizados como controles, durante los periodos de retirada del medicamento. Al combinar este β -agonista con la dexametasona, la ganancia de peso era también espectacular y persistía incluso durante el periodo de supresión.

En este mismo sentido, determinamos las concentraciones hormonales de insulina, pero

únicamente en los animales prepúberes, puesto que así podríamos comparar entre los controles y los tratados, si el clenbuterol, afectaba al engorde de los animales en plena fase de crecimiento. La técnica empleada para tal fin, fue un ELISA sandwich, mediante la utilización de un kit comercial. Los resultados obtenidos, nos permitieron establecer que los niveles plasmáticos de insulina también se elevan notoriamente, pero a partir de la entrada en la pubertad de los animales. Una vez que se interrumpe el tratamiento, dichos niveles descienden hasta igualarse a los de los controles.

El estudio del hígado en cuanto a alteración del peso y morfología se refiere, también fue contemplado, dada la importancia que el consumo de esta víscera ha adquirido en los últimos tiempos, en lo referente a las intoxicaciones diagnosticadas en la población humana.

El peso del hígado en los animales tratados, experimenta descensos estadísticamente significativos en la tercera semana de tratamiento, que coincide con la máxima absorción del clenbuterol, y a partir de ahí, se produce en los animales, una fase de acostumbramiento, que da lugar a una estabilización de estos pesos. La intensidad de este descenso está muy relacionada con la edad de los animales, siendo mayor en los adultos. La asociación a la dexametasona, también produce un descenso del peso hepático que dura menos tiempo, lo que indica que la recuperación de los animales se produce antes en este caso.

Para comprobar si se producían lesiones a nivel hepático, y dada la dosis administrada, procedimos a realizar el estudio anatomopatológico del hígado de los animales. Al no detectarse lesiones macroscópicas, ni microscópicas, llevamos a cabo un estudio ultraestructural, mediante Microscopía electrónica. Esta técnica, constituyó un método realmente confirmatorio de la inexistencia de lesiones observada mediante en el estudio macroscópico e histológico.

Este estudio se completó mediante la determinación de las concentraciones hepáticas y plasmáticas de clenbuterol, mediante la técnica EIA de competición. Los resultados obtenidos, nos permitieron comprobar que la absorción del clenbuterol está directamente

relacionada con la edad del animal. También pudimos comprobar el efecto "borrador" ejercido por la dexametasona al ser administrada conjuntamente con el beta-agonista, puesto que a los cinco días del periodo de supresión, no se detectaban niveles de clenbuterol en sangre o en hígado, lo que nos llevó a concluir, que en este caso, podrían producirse falsos negativos, que contribuyeran a incrementar la práctica fraudulenta de la utilización del clenbuterol como agente promotor del crecimiento.

El clenbuterol actúa directamente sobre el Sistema Adrenérgico, y por ello, determinamos las concentraciones plasmáticas de cortisol y corticosterona, de los animales tratados, tanto en prepúberes como en adultos, bien con clenbuterol, o con la asociación de éste a la dexametasona. Dichas concentraciones se elevaron en todos los casos, para ir disminuyendo a partir del quinto día de la retirada del medicamento. Cuando se añade la dexametasona, este descenso es mucho más pronunciado, llegando incluso a situarse a unos niveles inferiores a los de los controles.

Por último, decidimos estudiar los efectos del clenbuterol sobre las hormonas esteroides gonadales, determinando las concentraciones plasmáticas de progesterona, 17 β -estradiol y androstenodiona, en animales adultos y sometidos a los dos tipos de tratamiento, mediante la técnica ELISA de competición.

Los niveles de progesterona descendieron considerablemente, dando lugar a lesiones macroscópicas en el tracto genital. Al mismo tiempo, las concentraciones de 17 β -estradiol, experimentaron un brusco aumento, que también daba lugar a la aparición de lesiones a nivel ovárico, mientras que las concentraciones de androstenodiona no sufrieron grandes cambios.

En definitiva, los parámetros fisiológicos estudiados, tanto a nivel de pesos como hormonales, se vieron afectados tras los tratamientos con clenbuterol, o asociado a la dexametasona, pero una vez que se produjo la interrupción del tratamiento, revertían a la normalidad. El hígado, no presentó alteraciones morfológicas durante el tiempo que duró tanto en la administración de los tratamientos, como en la retirada de los mismos.

BIBLIOGRAFÍA

- AGBENYEGA, ET y WAREHAM, AC, Effect of clenbuterol on skeletal muscle atrophy in mice induced in mice by the glucocorticoid dexamethasone. *Comparative Biochemistry Physiology*, **102** (1): 141-145, 1992.
- AHREN, B y LUNDQUIST, I, Effects of selective and non-selective β -adrenergic agents on insulin secretion in vivo. *European Journal of Pharmacology*, **71**: 93-104, 1981.
- AIT-CHAOU, A., RAKOTONDRAZAFY, J, y BRUDIEUX, R, Age-related changes in plasma corticosterone and aldosterone responses to exogenous ACTH in the rat. *Hormone Research*, **43**: 181-187, 1995.
- ALMEIDA, QF, CONEINE, V, ALI, S, HDSBOER, F, y PATCHEV, VK, Activational effects of gonadal steroids on hypothalamo-pituitary-adrenal regulation in the rat disclosed by response to dexamethasone suppression. *Journal of Neuroendocrinology*, **9** (2): 129-34, 1997.
- BABIJ, P, y BOOTH, FW, Clenbuterol prevents or inhibits loss of specific mRNAs in atrophying rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, **254**: C657-C660, 1988.
- BALLARÍN, M, y SALA, J, Los glucocorticoides (I): fisiología, farmacocinética, efectos farmacológicos e interacciones. *Medicina Integral*, **25** (6): 256-265, 1995.
- BARBER, A, y PONZ, F, (1988), Introducción a la Fisiología Animal. En *Fisiología Animal, funciones vegetativas*, Ed. Síntesis S.A., Cap 1, pg: 20.
- BATES, PC, y PELL, JM, Action and interaction of growth hormone and the β -agonist clenbuterol, on growth, body composition and protein turnover in dwarf mice. *British Journal of Nutrition*, **65**: 115-129, 1991.

- BAULIEU, EE, Neurosteroids: an overview. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, **47**: 1-16, 1992.
- BEERMANN, DH, BUTLER, WR, HOGUE, DE, FISHELL, VK, DALRYMPLE, RH, RICKS, CA, y SCANES, CG, Cimaterol-induced muscle hipertrophy and altered endocrine status in lambs. *Journal of Animal Science*, **65**: 1514-1524, 1987.
- BEHREND, EW, y KEMPPAINEN, RJ, (1997), Glucocorticoid therapy: Pharmacology, indications and complications. En *The veterinary clinics of North America. Small animal practice*. Ed. PP Kintzer. WB Saunders Company Philadelphia, pp: 187-213.
- BELHANSEN, R, y DESHAIES, Y, Modulation of lipoprotein lipase activity in the rat by the β_2 -adrenergic agonist clenbuterol. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **70**: 1555-1562, 1992.
- BERNE, RS, NOVAKOFSKI, J, y BECHTEL, PJ, Effects of the β -agonist clenbuterol on body tissue weights in four strains of rats. *Journal of Animal Science*, **61**, Suppl. 1: 256, Abstrat nº 119, 1985.
- BETTE, P, y KIETZMANN, M, Effect of dexamethasone on tyrosine aminotransferase activity in rat liver. A sensitive test to define its hormonal no effect level. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **Suppl. 87**: 200-202, 1991.
- BIOLATTI, B, CAMELLI, M, RE, G, BADINO, P, y BENATTI, G, Clenbuterol long-term administration in female pigs. Note 1: genital lesions and evaluation of uterine nuclear estrogen receptors (ER). *Schweitzer Archivfur Tierheilkunde*, **132**: 415-416, 1990.
- BIOLATTI, B, BOLLO, E, APPINO, S, y DONN, A, Patología por anabolizantes en terneras de carne blanca. *Medicina Veterinaria*, **11** (4): 241-248, 1994.

- BIOLATTI, B, CASTAGNARO, M, BOLLO, E, APPINO, S, y RE, G, Genital Lesions following Long-Term Administration of Clenbuterol in Female Pigs. *Research in Veterinary Science*, **57**: 365-371, 1994.
- BLASS, AM, DAVE, M, FALLON, RJ, ILLERA, JC, ILLERA, M, y SAUER, MJ, (1996). Establishing use or abuse of clenbuterol by plasma analysis. En *Proceedings of the Euroresidue III Conference*, Veldhoven, The Netherlands, Mayo 6-8. Ed. N. Haagsma y Ruiter, 258-262.
- BLASS, AM, (1997). En: *Parámetros fisiológicos en terneras tratadas con β -agonistas (Clenbuterol) y su determinación por Enzimoimmunoanálisis*. Tesis doctoral U.C.M.
- BONEN, A, CLUNE, PA, y TAN, MH, Chronic exercise increases insulin binding in muscles but not liver. *American Journal of Physiology*, **251**: E196-E203, 1986.
- BRAMBILLA, G, BOCCA, A, DELISE, M, y GUANDALINI, E, Residues of clenbuterol in tissues of the rainbow trout (*Onchorhynchus Mykiss*). *Veterinary Research Communications*, **18**: 37-42, 1994.
- BRIEN, TG, y BANNIGAN J, (1986), The structure and function of the endocrine system in Laboratory Animals. En *World Animal Science C2, Laboratory Animals, Laboratory Animal models for domestic animal production*, Ruitenberg E.J. y Peters P.W. Ed. A.Neimann-Sorensen D.E. Tribe, cap. 5, pg: 180.
- BROCKWAY, JM, MACRAE, JC, y WILLIAMS, PEV, Side effects of clenbuterol as a repartitioning agent. *The Veterinary Record*, **18**:381-383, 1987.
- BRUCKMAIER, RM, y BLUM, JW, Responses of calves to treadmill exercise during beta-adrenergic agonist administration. *Journal of Animal Science*, **70** (9): 2809-2821, 1992.

- BUTCHER, RL, COLLINS, WE, y FUGO, NW, Plasma concentration of LH, FSH, Prolactin, Progesterone and Estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology*, **94** (6): 1704-1708, 1974.
- BUYSE, J, DECUYPERE, E, HUYGHEBAERT, G, y HERREMANS, M, The effect of clenbuterol supplementation on growth performance and on plasma hormone and metabolite levels of broilers. *Poultry Science*, **70** (4): 993-1002, 1991.
- CAGAMPANG, FR, OHKURA, S, TSUKAMURA, H, COEN, CW, OTA, K, y MAEDA, K, α^2 -adrenergic receptors are involved in the suppression of luteinizing hormone release during acute fasting in the ovariectomized estradiol-primed rats. *Neuroendocrinology*, **56**:724-728, 1992.
- CAMPBELL, RB, WIGGINS, ME, CANNISTRA, LM, FADALE, PD, y AKELMAN, E, Influence of steroid injection on ligament healing in the rat. *Clin. Orthop.*, **332**: 242-253, 1996.
- CARDOSO, LA, y STOCK, MJ, Effect of clenbuterol on growth and body composition during food restriction in rats. *Journal of Animal Science*, **74**: 2245-2252, 1996.
- CARDOSO, LA, y STOCK, MJ, Effect of clenbuterol on endocrine status and nitrogen and energy balance in food-restricted rats. *Journal of Animal Science*, **76**: 1012-1018, 1998.
- CARTAÑA, J, SEGUÉS, T, YEBRAS, M, ROTHWELL, NJ, y STOCK, MJ, Anabolic effects of Clenbuterol after long-term treatment and withdrawal in the rat. *Metabolism*, vol **43** (9): 1086-1092, 1994.
- CARTAÑA, J, y STOCK, MJ, Effects of Clenbuterol and Salbutamol on Tissue Rubidium Uptake in vivo. *Metabolism*, **44** (1): 119-125, 1995.

- CARTER, WJ, y LYNCH, ME, Comparison of the effects of Salbutamol and Clenbuterol on skeletal muscle mass and carcass composition in senescent rats. *Metabolism*, **43** (9): 1119-1125, 1994.
- CARTER, WJ, y LYNCH, ME, Effect of Clenbuterol on recovery of muscle mass and carcass protein content following dietary protein depletion in young and old rats. *Journal of Gerontology*, **49** (4): B162-B168, 1994.
- CERRUTI SOLA, S, BERGERO, D, BADINO, P, CORNAGLIA, E, NOVELLI, A, y RE, G, Effects of dietary clenbuterol in female broiler chickens: pathological lesions and endocrine modifications. *European Journal of Veterinary Pathology*, **2** (2): 87-92, 1996.
- CHALLIS, RAJ, LEIGHTON, B, WILSON, S, THURLBY, PL, y ARCH, JRS, An investigation of the β -adrenoceptor that mediates metabolic responses to the novel agonist BRL28410 in rat soleus muscle. *Biochemical Pharmacology*, **37**(5): 947-950, 1988.
- CHANCE, WT, VON ALLMEN, D, BENSON, D, ZHANG, FS, y FISCHER, JE, Clenbuterol decreases catabolism and increases hypermetabolism in burned rats. *The Journal of Trauma*, **31** (3): 365-370, 1991.
- CHANCE, WT, CAO, L, ZHANG, FS, y FISCHER, JE, Clenbuterol plus Acivin decrease tumor growth and increase muscle mass in rats maintained on total parenteral nutrition. *The American Journal of Surgery*, **161**: 51-56, 1991.
- CHOO, JJ, HORAN, MA, LITTLE, RA, y ROTHWELL, NJ, Effects of the β_2 -adrenoceptor agonist, Clenbuterol, on muscle atrophy due to food deprivation in the rat. *Metabolism*, **39** (6): 647-650, 1990.

- CHOO, JJ, HORAN, A, LITTLE, RA, y ROTHWELL, NJ, Anabolic effects of clenbuterol are mediated by β_2 -adrenoceptor activation. *American Journal of Physiology*, **263**: E50-E56, 1992.
- CONLEY, AJ, y BIRD, IM, The role of cytochrome P₄₅₀, 17 α hidroxylase and 3 β -hidroxysteroid dehidrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the D5 and D4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biology of Reproduction*, **56**: 789-799, 1997.
- CULTER, MG, The sensitivity of function tests in detecting liver damage in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **28**: 349-357, 1974.
- DACASTO, M, RE, G, BADINO, P, BENATTI, G, SOLDANI, G, DI CARLO, F, y GIRARDI, C, Efectos del clenbuterol en el ganado porcino de engorde. *Medicina Veterinaria*, **11** (10): 561-566, 1994.
- DARYMPLE, RH, BAKER, PB, GINGHER, PE, INGLE, DL, PENSACK, JM, y RICKS, CA, A repartitioning agent to improve performance and carcass composition of broilers. *Poultry Science*, **63**: 2376-2383, 1984.
- DEL BARRIO, AS, GARCÍA-CALONGE, MA, FERNÁNDEZ-QUINTELA, A, SIMÓN, E, PORTILLO, MP, ASTIASARÁN, I, Y MARTÍNEZ, JA, Effects of the Beta-Adrenergic Agonist Salbutamol and its Withdrawal on Protein Metabolism of Lambs. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **39**: 317-324, 1995.
- DEPAOLO, LV, y MASORO, E, (1989), Endocrine hormones in Laboratory Animals. En *The Clinical Chemistry of Laboratory Animals*, Loeb W.F. y Quimby F.W. Ed. Loeb-Quimby, cap. 12, pg: 295.

- DESHAIES, Y, WILLEMOT, J, y LEBLANC, J, Protein synthesis, amino acid uptake, and pools during isoproterenol-induced hypertrophy of the rat heart and tibialis muscle. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **59**: 113-121, 1981.
- DEVESA, J, ESQUIFINO, A, y TRESGUERRES, JAF, (1992), Hormonas adenohipofisarias. En *Fisiología Humana*, Tresguerres, JAF. Ed. Interamericana McGraw-Hill, cap 73, pg: 913-927.
- DOOLEY, DJ, HAUSER, KL, y BITTIGER, H, Differential decrease of the central beta-adrenergic receptor in the rat after subchronic infusion of desipramine and clenbuterol. *Neurochememistry Int.ernational*, **5**: 333-338, 1983.
- DRENNAN, WG, y YONG, MS, Clenbuterol not aproved for use in cattle in Canada. *Canadian Veterinary Journal*, **35**: 474, 1994.
- EGGUM, BO, y BEAMES, RM, (1986). Use of Laboratory Animals as models for studies on nutrition of domestic animals. En *World animal science C2 Laboratory animals*. Editado por E.J. Ruitenberg y P.W.J. Peters, cap, 6: 265-287.
- ELLIOT, CT, CROOKS, SRH, MCEVOY, JGD, MCCAUGHEY, WJ, HEWITT, SA, PATTERSON, D, y KILPATRICK, D, Observations on the effects of long-term withdrawal on carcass composition and residue concentrations in clenbuterol-medicated cattle. *Veterinary Research Communications*, **17**: 459-469, 1993.
- EMERY, PW, ROTHWELL, NJ, STOCK, MJ, y WINTER, PD, Chronic effects of β_2 -adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Bioscience Reports*, **4**: 83-91, 1984.
- FAIN, JN, y GARCÍA SAÍNZ, A, Adrenergic Regulation of adipocyte metabolism. *Journal of Lipid Research*, **24**: 945-966, 1983.

- FALKNER, KC, RUSHMORE, TH, LINDER, MW, y PROUGH, RA, Negative regulation of the rat glutathione S-transferase A2 gene by glucocorticoids involves a canonical glucocorticoid consensus sequence. *Molecular Pharmacology*, **53**(6): 1016-1026, 1998.
- FELDMAN, DB, y SEELEY, JC, (1988), Euthanasia. En *Necropsy guide: rodents and the rabbit*. Ed. CRC Press Inc., cap 2, pg: 2.
- FELTS, JM, y MAYES, PA, Release of Lipoprotein Lipase from the perfused liver of the rat. *Nature*, **214** (6): 620-621, 1967.
- FERNÁNDEZ, C, y SAÍNZ, RD, Pathways of protein degradation in myotubes. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, **214** (3): 242-247, 1997.
- FIEMS, LO, Effect of beta-adrenergic agonists in animal production and their mode of action. *Annales de Zootechnie*, **36** (3): 273-290, 1987.
- FIEMS, LO, BOUCQUÉ, CV, BRABANDER, DL, y COTTYN, BG, The effect of the β -adrenergic agonist cimaterol on performance and carcass and meat quality in culled dairy cows. *Journal of Animal Science*, **61**: 19-23, 1995.
- FLECKNELL, PA, (1987). Anaesthesia. En *Laboratory Animal Anaesthesia*, Flecknell P.A. Ed. Academic Press, Inc, cap 3, pg: 35.
- FOUCAULD, L, NIOT, I, KANDA, T, y BESNARD, P, Indirect dexamethasone down-regulation of the fatty acid-binding expression in rat liver. *Biochimica Biophysica Acta*, **139** (2): 204-212, 1998.
- GOBERNA, R, (1992), El páncreas endocrino. En *Fisiología Humana*, Tresguerres J.A.F. Ed. McGraw-Hill-Interamericana de España, cap.78, pg: 994-996.

- GOLDSPISNK, G, Muscle growth and muscle function: a molecular biological perspective. *Research in Veterinary Science*, **60**: 193-204, 1996.
- GÓMEZ, F, DE KLOET, ER, y ARMARIO, A, Glucocorticoid negative feedback on the HPA axis in five inbred rat strains. *American Journal of Physiology*, **274** (2Pt2): R420-7, 1998.
- GOODMAN y GILMAN (1997). En *Las bases farmacológicas de la Terapéutica*, Ed. Interamericana McGraw-Hill.
- GUYTON (1997). En *Tratado de Fisiología Médica*, Ed. Interamericana McGraw-Hill.
- HALLIWELL, REW, y GORMAN, NT, (1989), Anti-inflammatory drugs, immunosuppressive agents and immunomodulators. En *Veterinary clinical immunology*. Ed. REW Halliwell y NT Gorman. WB Saunders Company Philadelphia, pg: 493-507.
- HAYNES, RC, (1994), Hormona adrenocorticotrófica, esteroides corticosuprarrenales y sus análogos sintéticos, inhibidores de la síntesis y acciones de las hormonas suprarrenales. En *Las bases farmacológicas de la Terapéutica*, Goodman y Gilman A. Ed. Interamericana McGraw-Hill, cap 60, pg: 1385-1400.
- HOEY, AJ, MATTHEWS, ML, BADRAN, TW, PEGG, GG, y SILENCE, MN, Cardiovascular effects of clenbuterol are β_2 -Adrenoceptor-Mediated in steers. *Journal of Animal Science*, **73**: 1754-1765, 1995.
- HOFFMAN, BB, y LEFKOWITZ, RJ, (1994). Catecolaminas y drogas simpatomiméticas. En *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, Goodman Gilman A., Rall T.W. y Nies A. S. Ed. Médica Panamericana.
- HOLLENGA, CH, HAAS, M, DEINUM, JT, y ZAAGSMA, J, Discrepances in lipolytic

activities induced by β -adrenoceptor agonist in human and rat adipocytes. *Hormone and Metabolic Research*, **22**: 17-21, 1990.

HUGHES, JM, SEALE, JP, y TEMPLE, DM, Effect of fenoterol on immunological release of leukotrienes and histamine from human lung *in vitro*: selective antagonism by beta-adrenoceptor antagonist. *European Journal of Pharmacology*, **95**: 239-245, 1983.

ILLERA, JC, SILVÁN, G, e ILLERA, M, Obtención de anticuerpos frente a esteroides para estudios inmunológicos. *Anales de la Real Academia de Farmacia*, **58**: 475-482, 1992.

ILLERA, M, Clenbuterol. *Información Veterinaria*, **131**: 25-26, 1993.

ILLERA, JC, SILVÁN, G, ILLERA, MJ, e ILLERA, M, Steroid hormone profiles in several domestic species and the methodology for determination thereof. En: *Trends in Comparative Biochemistry & Physiology*. Editado por Council of Scientific Research Integration, Research Trends, Trivandrum, India, pg: 869-879, 1993.

ILLERA, JC, SILVÁN, G, PORTELA, A, ILLERA, MJ, GARCÍA ALONSO, L, CORNELISSEN, G, y HALBERG, F, Circadian cortisol rhythm kept on different lighting regimens. *Chronobiología*, **20**: 219-232, 1993.

ILLERA, M, (1994). En *Diccionario de acrónimos con símbolos y abreviaturas para las Ciencias de la Salud*. Ed. Fundación Wellcome España.

ILLERA, JC, (1995), Expected experimental results: the influence of physiological variations *on vivo* studies. En *Proceedings of the 13th IFFA CREDO workshop, L'animal de Laboratoire en Reherche Biomedicale*. Lyon, Francia, pg: 64-68.

- ILLERA, JC, SILVÁN, G, e ILLERA, M, (1996), The effect of trenbolone acetate implants on cortisol levels in cattle. En: *Residues of veterinary drugs in food. Euroresidue III*. Ed. N. Haagsma y A. Ruiter, pg: 554-558.
- ILLERA, JC, LORENZO, PL, SILVÁN, G, MUNRO, C, ILLERA, MJ, e ILLERA, M, Enzimoimmunoassay for testosterone and androstenodione in culture maturation medium from rabbit oocytes matured *in vitro*, *Theriogenology* **47**: 1375-1388, 1997.
- JEFFERSON, LS, RANNELS, DE, MUNGER, BL, y MORGAN, HE, Insulin in the regulation of protein turnover in heart and skeletal muscle. *Federation Proceedings*, **33** (4): 1098-1104, 1974.
- JIANG, TX, CAIRNS, A, ROAD, JD, y WILCOX, PG, Effect of the beta-agonist clenbuterol on dexamethasone-induced diaphragm dysfunction in rabbits. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, **154** (6 Pt 1): 1778-83, 1996.
- JOAKIMSEM, O, y BLOM, AK, Growth hormone concentration in jugular blood plasma in relation to growth rate and age in young bulls. *Acta Agriculturae Scandinavica*, **26**: 239-242, 1976.
- JOHANSSON, ID, HART, IC, SIMMONDS, AD, y MORANT, SV, Pre-pubertal mammogenesis in the sheep. 2. The effects of level of nutrition on the plasma concentrations of growth hormone, insulin and prolactine at various ages in female lambs and their relationship with mammary development. *Animal Production*, **41**: 333-340, 1985.
- KATSUMATA, M, YANO, H, y MIYAKAZI, AS, Effect of beta agonist clenbuterol on the body composition of rats with hypothyroidism induced by oral administration of propylthiouracil. *Journal of Nutrition Science and Vitaminology*, **37** (4): 411-417, 1991.

- KIM, YH, y KIM, YS, Effects of active immunization against clenbuterol on the growth-promoting effect of clenbuterol in rats. *Journal of Animal Science*, **75**: 446-453, 1997.
- KOHN, DF, y BARTHOLD, SW, (1984), Biology and diseases of rats. En *Laboratory Animal Medicine*, Fox J., Cohen B.J. y Loew F.M. Ed. Academic Press Inc (London), cap 4, pg: 95.
- KORSRUD, GO, GRICE, HG, GOODMAN, TK, KNIPFEL, JE, y MCLAUGHLAN, JM, Sensivity of several serum enzymes for the detection of thioacetamide-, dimethylnitrosamine- and diethanolamine-induced liver damage in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **26**: 299-313, 1973.
- KUIPER, HA, NOORDAM, MY, VAN DOOREN-FLIPSEN, MMH, SCHILT, R, y ROSS, AH, Illegal use of β -adrenergic agonists: European Community. *Journal of Animal Science*, **76**: 195-207, 1998.
- LAFONTAN, M, BERLAN, M, y PRUD'HON, M, Les agonistes beta-adrénériques. Mecanismes d'action: lipomobilisation et anabolisme. *Reproduction, Nutrition and Development*, **28** (1): 61-84, 1988.
- LAI, E, ROSEN, OM, y RUBIN, CS, Differentiation-dependent expression of catecholamine-stimulated adenylate cyclase. Roles of the β -receptor and G/F protein in differentiating 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **256**: 12866-12874, 1981.
- LANDS, AM, ARNOLD, A, MCAULIFF, JP, LUDUENA, FP, y BROWN, GT, Differentiation of Receptor Systems activated by Sympathomimetic Amines. *Nature*, **214**: 597-598, 1967.

- LE GOASCOGNE, C, SANANÈS, N, EYCHENE, B, GOUÉZOU, M, BAULEU, E, y ROBEL, P, Androgen biosynthesis in the stomach: expression of cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase messenger ribonucleic acid and protein, and metabolism of pregnenolone and progesterone by parietal cells of the rat gastric mucosa. *Endocrinology*, **136**: 1774-1752, 1995.
- LINDELL, SL, SOUTHARD, JH, URENGDENHIL, P, y BELZER, FO, Kupffer cells depress hepatocyte protein synthesis on cold storage of the rat liver. *Transplantation*, **58** (8): 869-874, 1994.
- LIU, Y, y MILLS, SE, Decreased insulin binding to porcine adipocytes in vitro by beta-adrenergic agonists. *Journal of Animal Science*, **68**: 1603-1608, 1989.
- LOMMEN, A, y GROOT, MJ, Combining two independent indirect methods as a new possibility for screening the illegal use of growth promotans. *Journal of Veterinary Medicine*, **40**: 271-282, 1993.
- LÓPEZ CALDERÓN, A, (1992), Glándulas suprarrenales. En *Fisiología Humana*, Tresguerres J.A.F. Ed. Interamericana-McGraw-Hill, cap 77, pg: 981-984.
- MACHLIN, LJ, Effect of porcine growth hormone on growth and carcass composition of the pig. *Journal of Animal Science*, **35**: 794-800, 1972.
- MACLENNAN, PA, y EDWARDS, RHT, Effects of clenbuterol and propranolol on muscle mass. *Biochemical Journal*, **264**: 573-579, 1989.
- MACSWEEN, RNM, y SCOTHORNE, RJ, (1997), Developmental anatomy and normal structure. En *Pathology of the liver*, Ed. Anthony P.P., Scheuer P., Burt AD, Portman B.C. y Okuda K., cap 1, pg: 1-40.

- MAGHUIN-ROGISTER, G, Actualités en matière de résidues de substances à effet hormonal ou anti-hormonal. *Annales de Médecine Veterinaire*, **139**: 319-323, 1995.
- MAIR, TS, Obstructive pulmonary disease in 18 horses in summer pasture. *Veterinary Record*, **138** (4): 89-91, 1996.
- MALENDOWICZ, LK, LESNIEWSKA, B, MISKOWIAK, B, NUSSDORFER, GG, y NOWAK, M, Effects of neurotensin on the pituitary-adrenocortical-axis of intact and dexamethasone-suppressed rats. *Experimental Pathology*, **43**: 205-211, 1991.
- MALTIN, CA, HAY, SM, MCMILLAN, DN, y DELDAY, MI, Tissue specific responses to clenbuterol: temporal changes in protein metabolism of striated muscle and visceral tissues from rats. *Growth Regulation*, **2**: 161-166, 1992.
- MANTLE, D, DELDAY, MI, y MALTIN, CA, Effect of clenbuterol on protease activities and protein levels in rat muscle. *Muscle and nerve*, **15**: 471-478, 1992.
- MARCATO, PS, DARSIE, G, SALAMON, EW, y BRIGANTI, A, Abnormal ulcers in calves. Some preliminary experimental observations. *Atti della Societa Italiana di Buiatria*, **17**: 327-338, 1985.
- MARCOS, MV, REUVERS, TH, y JIMÉNEZ, R, Control del empleo de anabolizantes en España. *Información Veterinaria*, **96**: 42-46, 1989.
- MARCUS, GJ, y DURNFORD, R, A simple enzyme-linked immunoabsorbent assay for testosterone. *Steroids*, **46**: 975-986, 1986.
- MARTINEAU, L, LITTLE, RA, ROTHWELL, NJ, y FISCHER, MI, Clenbuterol, a β_2 -adrenergic agonist, reverses muscle wasting due to scald injury in the rat. *Burns*, **19** (1): 26-34, 1992.

- MARTÍNEZ, JA, PORTILLO, MP, y LARRALDE, J, Anabolic actions of a mixed β -adrenergic agonist on Nitrogen retention and protein turnover. *Hormone and Metabolic Research*, **23**: 590-593, 1991.
- MARTÍNEZ-NAVARRO, JF, Food poisoning related to consumption of illicit β -agonist in liver. *The Lancet*, **336**: 1311, 1990.
- MARTÍNEZ-VERANO, JA, y MARTÍNEZ, JM, (1992), Fisiología hepática 1. En *Fisiología humana*, Treguerres J.A.F., Ed. McGraw-Hill Interamericana de España, cap 66, pg: 826-828.
- MASNATTA, LD, y RUBIO, M, Hemodynamic effects on hepatic blood flow of a selective β_2 -adrenoceptor agonist, clenbuterol in rat. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **17** (4): 247-250, 1992.
- MAUREL, MC, LABROUSSE, H, TERQUI, M, y AVRAMEAS, S, Microtitre plate enzyme immunoassay of oestradiol-17 β . *Journal of Steroid Biochemistry*, **25**: 135, 1986.
- MCELLIGOTT, MA, MULDER, JE, CHAUNG, LY, y BARRETO, JR, Clenbuterol-induced muscle growth: investigation of possible mediation by insulin. *American Journal of Physiology*, **253**: E370-E375, 1987.
- MCELROY, JF, y O'DONNELL, JM, Discriminative stimulus properties of clenbuterol: Evidence for Beta Adrenergic Involvement. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **245** (1): 155-163, 1988.
- MCELLIGOT, MA, BARRETO, JRA, y CHAUNG, L, Effect of continuous and intermittent clenbuterol feeding on rat growth rate and muscle. *Comparative Biochemical Physiology*, **92C** (1): 135-138, 1989.

- MCNEEL, RL, y MERSMANN, HJ, β -Adrenergic Receptor Subtype Transcripts in Porcine Adipose Tissue. *Journal of Animal Science*, **73**: 1962-1971, 1995.
- MERSMANN, HJ, Overview of the effects of β -adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *Journal of Animal Science*, **76**:160-172, 1998.
- MEYER, HH, y RINKE, LM, The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *Journal of Animal Science*, **69**: 4538-4544, 1991.
- MILLER, MF, CROSS, HR, WILSON, JJ, y SMITH, SB, Acute and long term lipogenic response to insulin and clenbuterol in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissues, *Journal of the Animal Science*, **67**: 928-933, 1989.
- MITCHELL, GA y DUNNAVAN, G, Illegal use of β -adrenergic agonists in the United States. *Journal of Animal Science*, **76**: 208-211, 1998.
- MOORE, NG, PEGG, GG, y SILENCE, MN, Anabolic effects of the beta 2-adrenoceptor agonist salmeterol are dependent on route of administration. *American Journal of Physiology* **267** (*Endocrinol. Metab.* **30**): E475-E484, 1994.
- MORGAN, DJ, Clinical Pharmacokinetics of β -agonists. *Clinical Pharmacokinetics*, **18** (4): 270-294, 1990.
- MUNRO, C, y STABENFELDT, G, Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *Journal of Endocrinology.*, **101**: 41-49, 1984.
- MURAMUTSU, T, KAKITA, M, AOYAGI, Y, y OKUMURA, J, β -Adrenergic agonist effects on liver and breast muscle protein synthesis in female chicks. *Poultry Science*, **70**: 1630-1632, 1991.

- NEBBIA, C, FERRERO, E, DACASTO, M, RE, G, y BADINO, P, Effects of the repeated administration of clenbuterol on hepatic drug metabolism. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **477** (1): 419-421, 1991.
- NEBBIA, C, DACASTO, M, y CEPPA, L, Changes in the activities of hepatic xenobiotic metabolising enzymes after the administration of clenbuterol to female broilers. *Research in Veterinary Science*, **60**: 33-36, 1996.
- O'DONNELL, JM, y FRAZER, A, Effect of clenbuterol and antidepressant drugs on beta-adrenergic receptor/N-protein coupling in the cerebral cortex of the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **234**: 30-36, 1985.
- ORTEGA, L, e ISPIZUA, JI, (1993), Histología. En *Cirugía Hepática Experimental*, Ed. Kronos, cap. 2, pp: 95-97.
- PASCUAL, M, MARTÍNEZ, JA, y LARRALDE, J, A single dose of a non selective β -adrenergic agonist increases bone protein synthesis. *Revista Española de Fisiología*, **50** (3): 191-192, 1994.
- PESSIN, JE, GITOMER, W, OKA, Y, OPPENHEIMER, L, y CZECH, MP, β -Adrenergic regulation of insulin and epidermal growth factor receptors in rat adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, **258** (12): 7386-7394, 1983.
- PETERLA, TA, y SCANES, G, Effect of β -adrenergic agonists on lipolysis and lipogenesis by porcine adipose tissue in vitro. *Journal of Animal Science*, **68** (4): 1024-1029, 1990.
- PETROU, M, WYNNE, DG, BOHELER, KR, y YACOUB, MH, Clenbuterol induces hypertrophy of the latissimus dorsi muscle and heart in the rat with molecular and phenotypic changes. *Circulation*, **92** (suppl II): II-483-II-489, 1995.

- POO, JL, BRAILLON, A, HADENGUE, A, GAUDIN, C, y LEBREC, D, Hemodynamic effects of Terbutaline, a β_2 -Adrenoceptor Agonist, in Conscious Rats with Secondary Biliary Cirrhosis. *Hepatology*, **15**: 459-463, 1992.
- PORTILLO, MP, MARTÍNEZ NAVARRO, JA, y LARRALDE, J, Differential metabolic pattern of muscle and liver after administration of a β -adrenergic agonist. *Revista Española de Fisiología*, **44**(2): 227-229, 1988.
- PRAKASH, BS, MADAN, ML, JAILKHANI, S, y SINGLA, SK, Development of a simple direct, microtitre plate enzymeimmunoassay (EIA) for progesterone determination in whole milk of buffaloes. *British Veterinary Journal*, **146**: 571-575, 1990.
- PRIOR, RL, y SMITH, SB, Hormonal effects on partitioning of nutrients for tissue growth: role of insulin. *Federation Proceedings*, **40**: 2545-2549, 1982.
- PULLAR, JD, y WEBSTER, AJF, The energy cost of fat and protein deposition in the rat. *British Journal of Nutrition*, **37**: 355-363, 1977.
- QUIRKE, JF, ALLEN, P, MALONEY, A, MAUREL, U, HANRAHAN, JP, SHEEMAN, W, y ROCHE, JF, Effets du cimaterol, bêta-agoniste, sur le taurillons frisons en finition. *Biotechnologie et Zootechnie. Réunion AFZ. Paris (13-11-1986)*, 1986.
- RE, G, BADINO, P, DACASTO, M, RACCA, S, VALENZA, F, y DI CARLO, F, Endocrine effects of a β_2 agonist (clenbuterol) on the genital tract of female rats. *Journal of Pharmacology*, **183**: 175-176, 1990.
- RE, G, BADINO, P, DACASTO, M, DICARLO, F, y GIRARDI, C, Regulation of uterine estrogen receptors (ER) by beta-adrenergic stimulation in immature rats. *Journal of Veterinary and Pharmacology Therapeutics*, **16**: 328-334, 1993.

- RE, G, BADINO, P, DACASTO, M, NEBBIA, C, BIOLATTI, B, DI CARLO, F, y GIRARDI, C, Effects of long-term administration of clenbuterol in mature female rats. *American Journal of Veterinary Research*, **54** (3): 438-442, 1993.
- RE, G, BADINO, P, NOVELLI, A, y GIRARDI, C, Down-regulation of β -adrenergic receptors and up-regulation of estrogen and progesterone receptors induced in the reproductive system of female veal calves by dietary clenbuterol. *American Journal of Veterinary Research*, **56** (11): 1493-1497, 1995.
- RE, G, BADINO, P, NOVELLI, A, y GIRARDI, C, Effects of clenbuterol as a repartitioning agent on β -adrenoceptor concentrations in heart, bronchi and brain of veal calves. *The Veterinary Journal*, **153**: 63-70, 1997.
- REEDS, PJ, HAY, SM, DORWOOD, PM, y PALMER, R, Stimulation of muscle growth by clenbuterol: lack of effect on muscle protein biosynthesis. *British Journal of Nutrition*, **56**: 249-258, 1986.
- REEDS, PJ, HAY, SM, DORWARD, PM, y PALMER, RM, The effect of β -agonists and antagonists on muscle growth and body composition of young rats (*rattus sp.*). *Comparative Biochemical Physiology*, **89C** (2): 337-341, 1988.
- REEDS, PJ, HAY, SM, DORWARD, PM, y PALMER, RM, The effect of β -agonists and antagonists on muscle growth and body composition of young rats (*Rattus SP.*). *Comparative Biochemistry Physiology C Comparative Pharmacology*, **89**: 337-341, 1993.
- RICKS, CA, BAKER, PK, DALRYMPLE, RH, DOSCHER, ME, INGLE, DL, y PANKAVICH, J, Use of clenbuterol to alter muscle and fat accretion in swine, *Federation Proceedings*, **43**: 857 (Abstr.), 1984.

- RICQUIER, D, BOILLAUD, F, TOUMELIN, P, BAZIN, R, ARCH, J, y PENICAUD, L, Expression of uncoupling protein m-RNA in thermogenic or weakly thermogenic brown adipose tissue. Evidence for a rapid β -adrenoceptor-mediated and transcriptionally regulated step during activation of thermogenesis. *Journal of Biological Chemistry.*, **261**: 13905-13910, 1986.
- ROTHWELL, NJ, STOCK, MJ, y SUDERA, DK, Changes in tissue blood flow and β -receptor density of skeletal muscle in rats treated with the β_2 -adrenoceptor agonist clenbuterol. *British Journal of Pharmacology*, **90**: 601-607, 1987.
- SANZ PÉREZ, B, Problemas de Salud Pública ocasionados por el empleo en la alimentación animal del clenbuterol y otros agentes promotores del crecimiento (1ª parte). *Eurocarne*, **37**: 23-34, 1995.
- SANZ PÉREZ, B, Problemas de Salud Pública ocasionados por el empleo en la alimentación animal del clenbuterol y otros agentes promotores del crecimiento. *Eurocarne*, **38**: 57-66, 1995.
- SAUER, MJ, FOULKES, JA, WORSFOLD, A, y MORRIS, BA, Use of progesterone 11-glucuronide-alkaline phosphatase conjugate in a sensitive microtitre plate enzymeimmunoassay of a progesterone in milk and its application to pregnancy testing in dairy cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, **76**: 375-391, 1986.
- SAUER, MJ, PICKETT, RJH, LIMER, S, y DIXON, ND, Distribution and elimination of clenbuterol in tissues and fluids of calves following prolonged oral administration at a growth-promoting dose. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **18**: 81-86, 1995.

- SILLENCE, MN, MATHEWS, ML, SPIERS, WG, PEGG, GG, y LINDSAY, DB, Effects of clenbuterol, ICI18551 and sotalol on the growth of cardiac and skeletal muscle and on β_2 -adrenoceptor density in female rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **344**: 449-453, 1991.
- SILLENCE, MN, HUNTER, RA, PEGG, GG, BROWN, L, MATTHEWS, ML, MAGNER, T, SLEEMAN, M, y LINDSAY, DB, Growth, nitrogen metabolism and cardiac responses to clenbuterol and ketoclenbuterol in rats and underfed cattle. *Journal of the Animal Science*, **71**: 2942-2951, 1993.
- SILLENCE, MN, REICH, MM, y THOMSON, BC, Sexual dimorphism in the growth response of entire and gonadectomized rats to clenbuterol. *American Journal of Physiology*, **268**: E1077-E1082, 1995.
- SILVÁN, G, En: *Correlaciones entre tamaño folicular y niveles de hormonas esteroides en ganado vacuno*. Tesis Doctoral. U.C.M., 1991.
- SMITH, PB, y CLARK, GF, β -adrenergic receptor adenylate cyclase alterations during postnatal development of skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta*, **633**: 274-288, 1980.
- SMITH, DJ, The pharmacokinetics, metabolism, tissue residues of β -adrenergic agonists in livestock. *Journal of Animal Science*, **76**: 173-194, 1998.
- SPENCER, GSG, y OLIVER, MH, Suppression of immune response in lambs during treatment with the beta-adrenergic agonist Clenbuterol. *Journal of Animal Science*, **74**: 151-153, 1996.
- STANTON, HC, BRENNER, G, y MAYFELD, ED, Studies on isopreterenol-induced cardiomegaly in rats. *American Heart Journal*, **77**: 72-80, 1969.

- STILES, GL, CARON, MG, y LEFKOWITZ, RJ, β -adrenergic receptors: biochemical mechanisms of physiological regulation. *Physiology Reviews.*, **64**: 661-743, 1984.
- TABURET, AM, y SCHMIT, B, Pharmacokinetic optimisation of asthma treatment. *Clinical Pharmacokinetics*, **26** (5): 396-418, 1994.
- TAKAHASHI, K, AKIBA, Y, y HORIGUCHI, M, Effects of a beta-adrenergic agonist (clenbuterol) on performance, carcass composition, hepatic microsomal mixed function oxidase and antibody production in female broilers treated with or without corticosterone. *British Poultry Science*, **34**: 167-175, 1993.
- TAYLOR, G, BARDGETT, M, FARR, S, HUMPHREY, W, WOMACK, S, y WEISS, J, Aging of the brain-testicular axis: reproductive systems of healthy old male rats with or without endocrine stimulation. *Proceedings of the Society of Experimental and Biological Medicine*, **211** (1): 69-75, 1996.
- THEIN, LA, THEIN, JM, y LANDRY, GL, Ergogenic aids. *Physiology and Therapeutic*, **75** (5): 426-39, 1995.
- THORTON, RF, TUME, RK, PAYNE, G, LARSEN, TW, JOHNSON, GW, y HOHENHAUS, MA, The influence of the β_2 -adrenergic agonist, clenbuterol, on lipid metabolism and carcass composition of sheep. *Proceedings of New Zealand Society of Animal Production*, **45**: 97-101, 1985.
- TORGAN, CE, BROZINICK, JT, BANKS, EA, CORTEZ, MY, WILCOX, RE, e IVY, JL, Exercise training and clenbuterol reduce insulin resistance of obese Zucker rats. *American Journal of Physiology*, **264**: E373-E379, 1993.

- TOUTAIN, PL, BRANDON, RA, POMYERS, H, ALVINERIE, y BAGGOT, JD, Dexamethasone and prednisolone in the horse: pharmacokinetics and action on the adrenal gland. *American Journal of Veterinary Research*, **45** (9): 1750-1756, 1984.
- U.S. Department of Health and Human Services (1985). Veterinary Care. En *Guide for the care and use of laboratory animals*, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes for Health, cap 3, pg 37.
- VAN WEEME, BK, y SCHUURS, AHVM, Immunoassay using hapten-enzyme conjugates. *FEBS Lett.*, **24**: 77-81, 1972.
- VAN DE WIELE, DFM, y KOOPS, W, Development and validation of a enzymeimmunoassay for progesterone in bovine milk or blood plas. *Animal Reproduction Science*, **10**: 201-213, 1986.
- WALDECK, B, y WIDMARK, B, Steric aspects of agonism and antagonism at β -adrenoceptors: experiments with the enantiomers of clenbuterol. *Acta pharmacologica et toxicologica*, **56**: 221-227, 1985.
- WILLIAMS, PEV, The use of β Agonist as a means of altering body composition in livestock species. *Nutrition Abstracts and Reviews (Series B)*, **57(8)**: 453-464, 1987.
- WILLIAMS, CL, y STANCEL, GM, Estrógenos y progestágenos. En *Las bases farmacológicas de la Terapéutica*. Ed. McGraw-Hill Interamericana, S.A., cap. 10, pg:1497-1517, 1996.
- WILSON, JD, (1996), Andrógenos. En *Las bases farmacológicas de la Terapéutica*, Goodman Gilman A. Ed. McGraw-Hill-Interamericana, cap.58, pg: 1532.

- WOODMAN, DD, (1997), The adrenal glands. En *Laboratory Animal Endocrinology, Hormonal Action, Control Mechanisms and Interactions with Drugs*, Ed. John Wiley & Sons Ltd., cap.6, pg: 262.
- WOODMAN, DD, (1997), Reproductive hormones. En *Laboratory Animal Endocrinology, Hormonal Action, Control Mechanisms and Interactions with Drugs*, Ed. John Wiley & Sons Ltd., cap. 10, pg: 453- 512.
- YANG, YT, y MCELLIGOT, MA, Multiple actions of β -adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. *Biochemical Journal*, **261**: 1-10, 1989.
- YOUNG, OA, WATKINS, S, OLDHAM, JM, y BASS, JJ, The role of insulin-like growth factor I in clenbuterol-stimulated growth in growing lambs. *Journal of Animal Science*, **73** (10): 3069-3077, 1995.
- YOUNG, P, WILSON, S, y ARCH, JRS, Prolonged β -adrenoceptor stimulation increases the amount of GDP-binding protein in brown adipose tissue mitochondria. *Life Sciences*, **34** (12): 1111-1117, 1984.
- YUAN, H, BOWLBY, DA, BROWN, TJ, HOCHBERG, RB, y MACLUSKY, NJ, Distribution of occupied and unoccupied estrogen receptors in the rat brain: effects of physiological gonadal steroid exposure. *Endocrinology*, **136**: 96-105, 1995.
- ZALKO, D, PERDU DURAND, E, DEBRAUWER, L, BEC FERTE, MP, y TULLIEZ, J, Comparative metabolism of clenbuterol by rat and bovine liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, **26** (1): 28-35, 1998.
- ZIMMERMAN, HJ, e ISHAK, KG, (1997), Hepatic injury due to drugs and toxins. En *Pathology of the liver, (Third Edition)*. Ed. Anthony P.P., Scheuer P., Burt AD, Portman B.C. y Okuda K., cap 15, pg: 563-619.