

## EFFECTO DEL CLENBUTEROL EN LOS NIVELES DE FOSFATASA ACIDA “FRACCIÓN PROSTÁTICA”, EN BOVINOS MACHOS

### EFFECT OF CLENBUTEROL IN THE LEVELS OF ACID PHOSPHATASE “PROSTATIC FRACTION” IN CATTLE MALES

Fosfatasa ácida prostática en toros

Paz-Calderón Nieto, M.<sup>1</sup>; R.E. Caicedo Rivas<sup>1\*</sup> y B. Hernández Pérez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Endocrinología de la Reproducción y Malacología, Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Boulevard

Valsequillo y Ave, San Manuel s/n, Ciudad Universitaria, Edificio No.112-A. Puebla, Puebla C.P: 72570. \*

ricaido@yahoo.com

#### Abstract

The productive capacity of animals is subject to food and environmental conditions mainly, however, the reproductive capacity is restricted by the use of food additives, they are converted to anabolic when used at high concentrations, On the other hand, there are biochemical reproductive parameters that change with the abuse of these food additives and one of these is the prostatic acid phosphatase whose levels and their relationship to other metabolic parameters such as: cholesterol, glucose and triglycerides are unknown and how changes of these metabolites and enzymes affect the reproductive capacity of male animals cattle *Bos indicus* X *Bos taurus*. The aim of this study was to determine how it affects clenbuterol (Clb) levels of prostatic acid phosphatase and other metabolic parameters such as triglycerides, glucose and cholesterol and how these affect the morpho-physiology of the testis and epididymis. To test our hypothesis, we obtained blood samples, testes and epididymis of 150 animals, clenbuterol-fed vs. control animals (control). The results indicate that triglyceride levels in control animals of  $79,5 \pm 7,5$  mg / dL and increases to  $360,0 \pm 34,3$  mg / dL in animals treated with clenbuterol; cholesterol values ranged from  $127,3 \pm 6,5$  mg / dL in control animals to  $249,6 \pm 2,3$  mg / dL in animals treated with clenbuterol; glucose ranged from  $58,3 \pm 1,6$  mg / dL to  $25,7 \pm$  control animals  $1,7$  mg / dL in animals treated with clenbuterol, on the other hand, prostatic acid phosphatase value control animals was  $3,87 \pm 0,3$  U / L, compared with animals treated with clenbuterol, whose concentration reached  $11,3 \pm 1,2$  U / L, the increase in all metabolic parameters were significant (\*  $p < 0,05$  and \*\*  $p < 0,01$ ). We concluded that the use of clenbuterol in high concentrations produces morphological changes in testicular physiology in cattle; affect fertility and sperm production in animals of high genetic quality and animal husbandry in different areas creoles of the country because high levels of prostatic acid phosphatase determined that the animals develop prostatic cancer.

#### Palabras clave:

Infertilidad  
Parámetros  
metabólicos  
Epidídimo y  
testículo

#### Keywords:

Infertility  
Metabolic  
parameters  
Epididymis and  
testis

#### Resumen

La capacidad productiva de los animales está supeditada a la alimentación y a las condiciones ambientales principalmente, sin embargo, esta capacidad reproductiva está restringida por la utilización de aditivos alimenticios, estos se convierten en anabólicos cuando son utilizados en altas concentraciones; por otro lado, existen parámetros reproductivos bioquímicos que cambian con el abuso de estos aditivos alimenticios y uno de estos es la fosfatasa ácida prostática cuyos niveles y su relación con otros parámetros metabólicos como: el colesterol, la glucosa y los triglicéridos se desconocen y como los cambios de estos metabolitos y enzimas afectan la capacidad reproductiva de los animales machos bovinos *Bos taurus* X *Bos indicus*. El objetivo de este estudio fue determinar como afecta el clenbuterol (Clb) en los niveles de fosfatasa ácida prostática y otros parámetros metabólicos como: triglicéridos, glucosa, colesterol y como inciden estos en la morfo-fisiología de los testículos y epidídimo. Para comprobar nuestra hipótesis, se obtuvieron muestras de sangre, testículos y

epidídimo de 150 animales, alimentados con clenbuterol vs animales testigo (control). Los resultados indican, que los valores de triglicéridos en animales control son de  $79,5 \pm 7,5$  mg/dL y se incrementan a  $360,0 \pm 34,3$  mg/dL en animales tratados con clenbuterol; el colesterol los valores fluctuaron de  $127,3 \pm 6,5$  mg/dL en animales controles a  $249,6 \pm 2,3$  mg/dL en animales tratados con clenbuterol; la glucosa varió de  $58,3 \pm 1,6$  mg/dL animales control a  $25,7 \pm 1,7$  mg/dL en animales tratados con clenbuterol, por otro lado, la fosfatasa ácida prostática de los animales control su valor fue de  $3,87 \pm 0,3$  U/L, en comparación con los animales tratados con clenbuterol, cuya concentración alcanzada fue de  $11,3 \pm 1,2$  U/L, el incremento en todos los parámetros metabólicos fue significativo ( $*p < 0,05$  y  $**p < 0,01$ ). Se concluye, que el uso de clenbuterol en altas concentraciones produce cambios en la morfo-fisiología testicular en bovinos, afecta la fertilidad y la producción de espermatozoides en animales de alta calidad genética y en animales criollos en diferentes zonas ganaderas del país, ya que los niveles altos de fosfatasa ácida prostática determinan que los animales desarrollan carcinoma prostático.

## Introducción

En los últimos años la capacidad reproductiva en varias zonas zoogeográficas donde existen poblaciones de ganado criollos y de ganaderías especializadas en México ha disminuido por diferentes afecciones naturales como: la brucelosis, neosporosis, fascioliasis entre otras, sin embargo, la introducción de aditivos alimenticios como xenobióticos, antibióticos y  $\beta_2$ -agonistas-anabólicos contribuyen también a incrementar la incapacidad reproductiva en estas regiones. La utilización de aditivos alimenticios es muy frecuente en la engorda de animales y esto repercute en el bienestar animal y humano. La ingesta de aditivos alimenticios como el zilpaterol y clenbuterol es lo que se administra con más frecuencia en la ganadería destinada a la ceba. Por otro lado, el clenbuterol es un  $\beta_2$ -agonista adrenérgico, utilizado en afecciones respiratorias, pero cuando este se utiliza en dosis más elevadas que la dosis terapéutica se convierte en un anabólico (entre cinco a diez veces mayores a su concentración terapéutica), además, es un agente tocolítico, es decir, que retarda el parto en bovinos, cuando se presenta riesgo de aborto o parto prematuro, favorece la síntesis de proteína, retiene al nitrógeno y disminuye la producción de grasa (agente lipolítico), debido a esto se denominan “agentes repartidores de energía” (Blass, *et al.*, 1988). Su efecto positivo en incrementar el peso en diferentes animales para consumo humano fue descrito por primera vez en 1984 (Baker, 1984, Jones *et al.*, 1985, Ricks *et al.* 1985 y Reeds *et al.*, 1991). En México y en Sudáfrica, ha sido aprobado el uso de  $\beta_2$ -agonistas como aditivos alimenticios y son el clorhidrato de zilpaterol y clorhidrato de ractopamina, sin embargo, en México el consumo de las vísceras de animales alimentados con clenbuterol, han causado muchas intoxicaciones en humanos, por el abuso en el suministro de este aditivo (Avedaño- Reyes *et al.*, 2006). El sistema nervioso simpático está compuesto por dos moléculas químicas de señalización, son la adrenalina (noradrenalina) y epinefrina (norepinefrina), estas promueven una respuesta dependiendo del tipo de receptor agonista al que se unan; el efecto del clenbuterol a nivel de ganadería tienen efectos similares a estos neurotransmisores (Caicedo *et al.*, 2010); el clenbuterol afecta también los niveles de glucosa ya que altera la segregación de insulina por las células beta del páncreas, esto produce a los animales diabetes (Strosberg, 1997). Los efectos de este  $\beta_2$ -agonista (clenbuterol) a nivel de los órganos reproductivos tanto de hembras y machos en animales domésticos aun no está bien dilucidado; se ha podido determinar que los  $\beta_2$ -agonistas tienden a incrementar las hormonas esteroideas en hembras sometidas por un largo periodo de tratamiento con clenbuterol (Caicedo *et al.*, 2010), tanto la progesterona ( $P_4$ ) como el estradiol ( $17\beta-E_2$ ) se incrementaron de forma significativa, sin embargo, el efecto del clenbuterol (Clb) sobre el incremento de la testosterona producida en las células del Leydig de los testículos es desconocido, además, los espermatozoides a nivel de los acrosomas tiende a producir altos niveles de fosfatasa ácida prostática (Stallcup, 1965; Graham *et al.*, 1967; Aguirre *et al.*, 1988;) y que la misma está relacionada con la motilidad de los espermatozoides, pero este concepto en bovinos aun no está bien dilucidado, hay muy pocos estudios sobre la concentración de esta enzima con respecto a las características morfológicas del testículo y epidídimo, al igual su efecto en la calidad del espermatozoide y su relación con alteraciones metabólicas a nivel de estos, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto del clenbuterol en la variación de la fosfatasa ácida prostática en las tres regiones del epidídimo (cabeza cuerpo y cola), la relación del mismo metabolito en suero sanguíneo de los mismos animales así como otros cambios en diferentes parámetros metabólicos y su relación en la morfometría testicular.

## Material y métodos

El muestreo se realizó en las instalaciones del Rastro municipal de Atlixco, Puebla. Se obtuvieron 150 muestras de sangre de bovinos machos (*Bos taurus* X *Bos indicus*) diferentes, las muestras fueron colectadas en tubos con EDTA (para realizar recuento diferencial), en otro tubo se colectó sangre sin EDTA para la obtención del suero y con esta muestra determinar los diferentes metabolitos sanguíneos, se colectaron muestras de testículos de los mismos animales con el objetivo de someterlos a la morfometría (para determinar: largo, ancho y grosor) y a cortes histológicos para observar la conformación celular del tejido y determinar cambios morfológicos. Los metabolitos que se midieron fueron: glucosa, colesterol, triglicéridos y fosfatasa ácida (total, no prostática y prostática), para estas determinaciones se utilizaron kits comerciales de la marca Stanbio LICON y Bio-System (USA), las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro "Spectronic 20". Para los cortes histológicos, una vez obtenidas las muestras de testículos y epidídimo se depositaron en un recipiente con solución de PBS, en el laboratorio se cortaron en cuadros de 1 centímetro cuadrado los testículos de cada animal, se procedió a fijarlos en formaldehído al 10 %, y luego se deshidrataron para su posterior procesamiento de tinción de rutina mediante hematoxilina y eosina (H & E).

*Análisis estadístico:* a los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANOVA), con el programa estadístico Stat-2 (Olivares, 1984), y para determinar la significancia entre promedio se utilizó Duncan New Multiple Range Test, Se graficaron con el programa Cricket graph (Macintosh).

## Resultados y discusión

El estudio se desarrolló con muestreos de animales procedentes del Rastro Municipal de Atlixco, los mismos correspondieron a 150 animales, de diferentes edades, zonas geográficas y diferentes cruces de *Bos taurus* X *Bos indicus*. Todos los animales fueron diagnosticados positivos a clenbuterol al presentar concentraciones de  $123,1 \pm 0,25$  ng/mL a  $989,4 \pm 12,8$  ng/mL y a través de la condición corporal que todos los animales presentaban que fue de 4 y 5, todos los animales estaban dentro de los parámetros de obesidad (Edmonton *et al.*, 1989). Cuando se obtuvieron los testículos de cada animal muestreado se detectó un crecimiento en 32,5% y atrofia de los mismos de 67,5%, así como edema del epidídimo, el peso de los testículos fluctuó entre  $90,5 \pm 4,7$  g a  $425,9 \pm 8,9$  g (valores normales van de 200-300 g, según Smidt y Ellendorff, 1972), los mismos al realizarles un corte para realzar frotis testicular resultó en ausencia de espermatozoides a nivel del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola) en un 92% de los animales, solo detectándose líquido seminal; en animales en el que se obtuvo semen, los espermatozoides presentaron anomalías espermáticas como: 60% de los espermatozoides sin cola, pocos espermatozoides viables (42%), sin embargo, es el clenbuterol quien inhibe la maduración testicular porque produce aumento de la temperatura a consecuencia del incremento del metabolismo y posiblemente por la baja producción de la hormona testosterona a nivel de las células intersticiales de Leydig (Caicedo *et al.*, 2010). En el análisis de los parámetros metabólicos, si lo comparamos con los valores de la literatura (Ricks *et al.*, 1984), los datos demuestran, que los triglicéridos se incrementan de  $79,5 \pm 7,5$  mg/dL en animales controles a  $360,0 \pm 34,3$  mg/dL en animales tratados con clenbuterol, esto comprueba el efecto lipolítico del clenbuterol, al degradar la grasa, los adipocitos o células de grasa almacenan grandes cantidades de triglicéridos que ocupan en su totalidad las células, pero estas contienen lipasas, enzimas que catalizan a los triglicéridos almacenados, liberando ácidos grasos, que son exportados a otros lugares donde se requiere energía, esta energía se manifiesta con el incremento de la temperatura corporal, por otro lado, el clenbuterol se une a los adipocitos, a través del ión cloro, permitiendo la ruptura de los adipocitos, liberando grandes cantidades de triglicéridos al torrente sanguíneo (Mersmann, 1998), es por ello que se encontraron altos niveles de triglicéridos en la sangre; mientras que en el colesterol, los valores fluctuaron de  $127,3 \pm 6,5$  mg/dl en animales controles a valores de  $249,6 \pm 2,3$  mg/dL en animales tratados con clenbuterol, la producción de colesterol está regulada por concentraciones intracelular y por las hormonas glucagón e insulina. El paso limitante de la velocidad de la ruta del colesterol es la conversión del  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA (HMG-CoA) en mevalonato; la enzima que cataliza esta reacción, la HMG-CoA reductasa, esta enzima existe de forma fosforilada (inactiva) o desfosforilada (activa), el glucagón facilita la fosforilación (inactivación), mientras que la insulina promueve la desfosforilación activando la enzima y se favorece la síntesis de colesterol, con base a esto, se puede decir que concentraciones elevadas de colesterol activan la enzima ACAT, que aumenta la esterificación de colesterol para su almacenamiento, y este colesterol elevado disminuye la transcripción del gen que codifica al receptor de la LDL (low density lipoprotein), reduciendo la cantidad de receptores y por lo tanto, la captación de colesterol de la sangre y es aquí donde actúa el clenbuterol, que provoca los niveles elevados en el suero de los animales que consumen alimentos con alto contenido de este  $\beta_2$ -

agonista-adrenérgico; la glucosa varió de  $58,3 \pm 1,6$  mg/dL en animales controles a valores de  $25,7 \pm 1,7$  mg/dL en animales tratados con clenbuterol, en este parámetro hay una disminución de los niveles de glucosa, los animales muestreados en su mayoría desarrollan una diabetes y deficiencia del páncreas e hipotiroidismo (Strosberg, 1997), según Blum y Flueckiger, 1988; Zimmerli y Blum, 1990, el clenbuterol tiende a inhibir la producción de insulina, en mamíferos, los datos obtenidos en este estudio colaboran con esta hipótesis, ya que los animales exhiben una drástica disminución o alza súbita repentina de glucosa. Por otro lado, la fosfatasa ácida prostática de los animales controles su valor fue de  $3,87 \pm 2,3$  U/L en comparación con los animales tratados con clenbuterol cuya concentración obtenida fue de  $11,3 \pm 6,2$  U/L, todos estos valores, su incremento fue significativo (\* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$ ). Estos valores indican que estos animales presentan una anomalía fisiológica a nivel de la glándula prostática y epidídimo producen una disminución del tamaño de los testículos, y revela que a corto plazo, estos animales puedan desarrollar cáncer prostático con metástasis y que esta anomalía está ligada al tiempo de alimentación con clenbuterol, se recalca que los animales que son alimentados con este  $\beta_2$ -agonista por más de 110 días continuos desarrollan este parámetro enzimático que está por encima de los valores de animales controles, se agrega a este análisis que grandes elevaciones de fosfatasa ácida prostática se encuentran relacionados con casos de cáncer prostático con un posible desarrollo de metástasis, esto justifica no solo las altas concentraciones de este y otros metabolitos o las bajas de los mismos, sino por los niveles elevados de clenbuterol que presenta a nivel de sangre. Los valores detectados en este estudio son más elevados que los que encontró Medway (1990), sin embargo, los animales que utilizó Medway no fueron animales alimentados con aditivos alimenticios (clenbuterol), los animales en el estudio de Medway (1990) estaban bajo un sistema extensivo, mientras que los animales de este estudio fueron animales sometidos a un sistema intensivo y estabulado, alimentados con  $\beta_2$ -agonista (clenbuterol), cuya concentración en suero son mayores a los establecidos por la FAO/WHO (Edmonton *et al.*, 1989 y FAO/WHO. 1992, que es de 125 ng/mL). Las dosis dadas a los animales fue 10 veces mayor a la estipulada por el *Codex Alimentario* de la FAO, (0.8 ug/kg, dos veces al día). Los datos que en este trabajo se presentan son preliminares, ya que se pretende incrementar el número de animales, como también realizar en examen andrológico e histológico de cada testículo y epidídimo obtenido de cada animal

### Conclusiones

En base a los estudios previos y los datos que se han obtenido en este estudio, se concluye lo siguiente: La administración de Clb, a dosis anabolizante, causa una alteración de la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal-gonadal-hepático en bovinos, que en algunos casos es reversible, después de un periodo de retirada o cuarentena y en otros no. Al detectar un aumento en los niveles de fosfatasa ácida prostática está se relaciona con carcinoma de próstata, infarto prostático, traumatismo prostático, hipertrofia benigna de próstata, prostatitis, hepatitis, ictericia obstructiva, cirrosis hepática, hiperparatiroidismo, alteración renal aguda, entre otros. Este estudio preliminar demuestra que el clenbuterol (Clb) tiene un marcado efecto en la producción y maduración de los espermatozoides a nivel de los túbulos seminíferos. Se quiere mencionar además que este es el primer estudio que se realiza del clenbuterol en cuanto a su efecto en las estructuras reproductivas en bovinos machos, de esta manera se contribuye a que este  $\beta_2$ -agonista es un precursor de muchos metabolitos tóxicos al organismo, y que contribuye al deterioro de la capacidad reproductiva de animales con alta carga genética y merma también la conservación de especies criollas de muchas zonas zoogeográficas de México.

### Agradecimientos

Agradecemos a las autoridades del Rastro Municipal de Atlixco, Puebla, Dr., Eduardo Cabrera Bautista., MVZ (Administrador), por habernos permitido internarnos a sus instalaciones para realizar el muestreo y trazabilidad de los animales que se utilizaron para este estudio y a la Escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México, por su apoyo.

### Bibliografía

- Aguirre, S.E.; E.G. Capaul; L. De Luca y M. Cinque. 1988. Actividades de la fosfatasa ácida (total y no prostática) y fosfatasa alcalina en plasma seminal de toro y carnero. Vet. Argentina, Vol. No.45.
- Avendaño-Reyes, L.; V. Torres-Rodríguez, F. J. Meras-Murillo, C. Pérez-Linares, F. Figueroa-Saavedra and P. H. Robinson. 2006. Effects of two  $\beta$ -adrenergic agonists on finishing performance, carcass characteristics, and meat quality of feedlot steers. J. Anim. Sci. 84:3259-3265.

- Baker, P. K., R. h. Dalrymple, D. L., Ingle and C. A. Ricks. 1984. Use of beta- adrenergic antagonists to alter muscle and fat deposition in lambs. *J. Anim. Sci.* 59:1256.
- Blass, A.; J. C. Illera, G. Silvan , M. Illera, M. Sauer, 1998. Cinética anabolizante Clenbuterol en plasma medida mediante ELISA. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.* Vol. 13 (1, 2 y 3). España
- Blum, J.W. y N. Flueckiger. 1988. Early metabolic and endocrine effects of perorally administered b-adrenoceptor agonist in calves. *Eur. J. Pharmacol.* 151:177-187.
- Caicedo R. R.E., Torres Beltrán A., Martínez Badillo, S.V., Paz Calderón Nieto M., Ramírez Peñaloza M.P., Hernández, Zepeda J.S., Reséndiz Martínez R., Cabrera Bautista E., y Silvia Gómez S.E. 2010. Efectos de los  $\beta_2$ -agonistas (clenbuterol), en las actividades fisiohepáticas y reproductivas en rumiantes, En: XI Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos. Joao Pessoa-Paraíba-Brasil, pp. 460-465.
- Edmonton, A.J; I.J. Lean; L.D. Weaver; T. Farver and G. Webster. 1989. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows, *Journal of Dairy Cattle Science*; Vol. 72 (1), 68-78.
- FAO/WHO. 1992. Expert committee on food additives. Residues of some veterinary drugs in animals and food: Monographs prepared by the Four Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food. Geneva Switzerland. Geneva, Switzerland Foods Agriculture Organization. FAO: 614-621.
- FAO/WHO. 1993. Expert committee on food additives. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Fortieth report of the Joint World Health Organization. WHO.-Technical-Reports-Series. New York: WHO: 832-862.
- Jones, R. W.; R. A. Easter, F. K. McKeith, R. H. Dalrymple, H. M. Maddock and P. J. Bechtel. 1985. Effect of the b-Adrenergic Agonist Cimaterol (CL 263,780) on the Growth and Carcass Characteristics of Finishing Swine. *J. Anim Sci.* 61:905-913.
- Koohmaraie, M.; S. d. Shackelford; N. E. Muggli-Cockett and R. T. Stone. 1991. Effect of beta- adrenergic agonist L644, 969 on muscle growth, endogenous proteinase activities, and postmortem proteolysis in whether lambs. *J. Anim. Sci.* 69: 4823- 4835.
- Medway, W.; Prier, J. E. and Wilkinson, j. S. 1990. *Patología Clínica Veterinaria*, editorial UTEHA, México.
- Mersmann, H.J.1998. Overview of the effects of  $\beta$ -adrenergic receptor agonists on animals growth including mechanism of action. *J. Anim. Sci.* 76:160-172.
- Olivares Sáenz, E. 1994. Paquete de diseños experimentales. FAUANI. Versión 2.5. Facultad de Agronomía. UANL. Martin. NL.
- Reeds, P. J.; and H. J. Mersmann. 1991. Discussion: Protein and energy requirements of animals treated with beta- adrenergic agonist. *J. Anim Sci.* 69: 1532- 1550.
- Ricks, C. A., P. K. Baker, R. H. Dalrymple, M. E. Doscher, D. L. Ingle and J. Pankavish. 1984. Use of clenbuterol to alter muscle and fat accretion in Swiss. *Fed. Proc.* 43: 851.
- Smidt, D. y F. Ellendorf. 1972. *Endocrinologías y fisiología de la Reproducción de los animales zootécnicos*. Editorial Acribia. Zaragoza, España pag.395
- Strosberg, A.D.1997. Structure and function of the B3 adrenergic receptor. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* Vol. 37, 421-450.
- Zimmerli, U.V. and J.W. Blum.1990.Acute and longterm metabolic, endocrine respiratory, cardiac and skeletal muscle activity changes in response to perorally administered  $\beta$ -adrenoceptor agonist in calves. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*63:157-172.