

Efecto del clorhidrato de clenbuterol en la ganancia de peso y lesiones histológicas en ratones

Benjamín Valladares-Carranza¹ / Rómulo Bañuelos-Valenzuela² / Silvia D. Peña-Betancourt³ / Valente Velázquez-Ordóñez⁴ / Francisco G. Echavarría-Cháirez⁵ / César Ortega-Santana⁴ / Juan E. Sánchez-Torres⁴ / Braulio Lozano-Carbajal²

- 1 Doctor en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de México-Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Toluca, México. Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Zacatecas, México. ✉ benvac2004@yahoo.com.mx
- 2 Doctor en Ciencias, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, México. ✉ apozolero@hotmail.com y drbraulioic@hotmail.com
- 3 Doctora, Universidad Autónoma Metropolitana-Laboratorio de Toxicología, Xochimilco, México, Distrito Federal. ✉ silvia_dpb@hotmail.com
- 4 Doctor en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma del Estado de México-Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Toluca, México. ✉ vvo@uaemex.mx, cos_mx@hotmail.com y edreie@yahoo.com.mx
- 5 PhD. Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Zacatecas, Zacatecas, México. ✉ echavarria.francisco@inifap.gob.mx

Cómo citar este artículo: Valladares-Carranza B, Bañuelos-Valenzuela R, Peña-Betancourt SD, Velázquez-Ordóñez V, Echavarría-Cháirez FG, Ortega-Santana C, Sánchez-Torres JE, Lozano-Carbajal B. Efecto del clorhidrato de clenbuterol en la ganancia de peso y lesiones histológicas en ratones. *Rev Med Vet*. 2017;(35):129-36. doi: <http://dx.doi.org/10.19052/mv.4395>

Resumen

El clorhidrato de clenbuterol (CCL) es un β -agonista promotor del crecimiento en animales para abasto, pero su uso ilícito ha generado repercusiones en salud pública. Se realizó un modelo biológico con ratones, con el objeto de evaluar el efecto del CCL sobre la ganancia de peso y las lesiones histológicas que ocasiona. Los ratones fueron alimentados con carne de conejo, que previamente fue suplementada con CCL. Treinta y cinco días posexposición se registró el peso corporal; se obtuvo la concentración muscular y sérica de CCL a través de la prueba de ELISA, y se colectaron tejidos (hígado y corazón) para análisis histopatológico. Los valores obtenidos de los animales experimentales (G1 y G2) se analizaron mediante un diseño experimental completamente al azar con dos tratamientos ($n = 10$), sometidos a un análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Se registró un incremento de peso corporal de 7 g en el G1, contra 4,0 g del G2. El peso del hígado fue de 2,58 g y 1,79, respectivamente ($p < 0,05$). En el G1 la concentración muscular de CCL fue 5324 pg g^{-1} y en suero sanguíneo de 4378 pg g^{-1} . Solo se observaron cambios histológicos en tejidos de los ratones del G1. El hígado mostró tumefacción celular, mitosis moderada, picnosis y degeneración hidrópica; en corazón, engrosamiento de fibras, pleomorfismo e hileración nuclear. El CCL favoreció el incremento de peso en los ratones expuestos, y provocó alteraciones estructurales en hígado y corazón.

Palabras clave: clorhidrato de clenbuterol, ELISA, toxicidad, ratones (Fuente: MeSH).

Effect of clenbuterol hydrochloride on weight gain and histological lesions in mice

Abstract

Clenbuterol hydrochloride (CLB) is a growth-promoting β -agonist in animals for supply, but its illicit use has generated repercussions on public health. A biological model with mice was developed to evaluate the effect of CLB on weight gain and histological lesions. Mice were fed rabbit meat, which was previously supplemented with CLB. Body weight was recorded 35 days post-exposure; muscular and serum concentration of CLB was obtained through the ELISA test, and tissues were collected from liver and heart for histopathological analysis. Values obtained from the experimental animals (G1 and G2) were analyzed by a completely randomized experimental design with two treatments ($n = 10$), subjected to an analysis of variance and comparison of means with the Tukey test ($p < 0.05$). There was an increase of 7 g in body weight in G1, compared to 4.0 g in G2. Liver weight was 2.58 g and 1.79, respectively ($p < 0.05$). In G1, CLB concentration in muscle was 5324 pg g^{-1} , and 4378 pg g^{-1} in blood serum. Only histological changes were

observed in the tissues of G1 mice. Liver showed cellular swelling, moderate mitosis, pyknosis and hydropic degeneration; in addition, fiber thickening, pleomorphism and nuclear atypia were observed in the heart. CLB contributed to weight gain in exposed mice and caused structural alterations in liver and heart.

Keywords: clenbuterol hydrochloride, toxicity, mice, ELISA (Source: MeSH).

Efeito do cloridrato de clenbuterol no aumento de peso e lesões histológicas em ratos

Resumo

O cloridrato de clenbuterol (CCL) é um β -agonista promotor do crescimento em animais para abate, porém o seu uso ilícito tem gerado repercussões em saúde pública. Fez-se um modelo biológico com ratos, com o objeto de avaliar o efeito do CCL sobre o ganho de peso e as lesões histológicas que ocasiona. Os ratos foram alimentados com carne de coelho, que previamente foi suplementada com CCL. Trinta e cinco dias pós-exposição se registrou o peso corporal; obteve-se a concentração muscular e sérica de CCL através da prova de ELISA, e foram coletados tecidos (fígado e coração) para análise histopatológica. Os valores obtidos dos animais experimentais (G1 e G2) foram analisados mediante um desenho experimental completamente ao acaso com dois tratamentos ($n = 10$), submetidos a uma análise de variações e comparação de médias com a prova de Tukey ($p < 0,05$). Registrou-se um aumento de peso corporal de 7 g no G1, contra 4,0 g do G2. O peso do fígado foi de 2,58 g e 1,79, respectivamente ($p < 0,05$). No G1 a concentração muscular de CCL foi 5324 pg g^{-1} e em soro sanguíneo de 4378 pg g^{-1} . Somente foram observadas mudanças histológicas em tecidos dos ratos do G1. O fígado apresentou inchaço celular, mitose moderada, picnose e degeneração hidrópica; no coração, engrossamento de fibras, pleomorfismo e filamento nuclear. O CCL favoreceu o aumento de peso nos ratos expostos, e provocou alterações estruturais em fígado e coração.

Palavras chave: cloridrato de clenbuterol, toxicidade, ratos, ELISA.

INTRODUCCIÓN

El clorhidrato de clenbuterol (CCL) [4-Amino-alpha-[(tert-butylamino) methyl]-3.5-diclorobenzil alcohol hidrocloreto] es un β -agonista adrenérgico sintético, sustancia blanca o ligeramente amarilla con peso molecular de 313,65 (1-3). Es usado como broncodilatador en medicina humana y veterinaria. Su uso como anabólico principalmente en bovinos en la actualidad es ilegal. Se ha demostrado que incrementa hasta en 15 % la síntesis proteica, y disminuye 18 % la deposición de grasa corporal (4,5).

El CCL provoca hipertrofia y neoformación del músculo a través de mecanismos de glucogenólisis —acumulación de nitrógeno para conformación de aminoácidos— y glucólisis —degradación de grasa—, lo que genera el incremento en el tamaño de las células musculares, principalmente del músculo esquelético (6-8). Su efecto promotor del crecimiento está mediado por la estimulación directa de los receptores β_2 adrenérgicos localizados en el tejido muscular, y la variación de las concentraciones plasmáticas de hormonas catabólicas o anabólicas, como los glucocorticoides, la hormona del crecimiento o la insulina (9,10).

El efecto del CCL en el sistema endocrino ocurre por la liberación hormonal mediante las catecolaminas que liberan insulina, aumentan glucagón y estimulan la liberación de las hormonas adrenocorticotropa, somatotropa y gonadotropinas. Lo anterior disminuye la deposición de grasa al aumentar la actividad metabólica y el gasto energético con un incremento de la termogénesis; parte de la energía ingerida evita la formación de grasa, por el aumento de la concentración del monofosfato de adenosina (AMP) cíclico en el tejido adiposo. El trifosfato de adenosina (ATP) se transforma en AMP cíclico que activa a las proteínas quinasas, las cuales por fosforilación estimulan a una lipasa intracelular que transforma los triglicéridos en ácidos grasos y glicerol (9-11).

Aunque el uso del CCL se ha prohibido en varios países, incluido México (3,12), la administración en la alimentación del ganado de manera clandestina ha sido un problema de salud pública en el ámbito mundial (3,5,11,13,14), debido al consumo de carne y vísceras (hígado) contaminadas con esta sustancia. Esto ocasiona procesos patológicos en el ser humano que se manifiestan con temblor muscular, sudoración excesiva, adormecimiento de extremidades, cefalea y taquicardia (8,15).

En el informe y análisis de Jiménez y colaboradores (16), en México se notificaron 2130 casos de intoxicación por CCL, entre 2002 y 2008. Jalisco, Distrito Federal, Guanajuato, Zacatecas y Michoacán fueron las entidades que más casos registraron. Jalisco fue el estado con mayor número de casos (35,25%), seguido del Distrito Federal (23,94%), y los casos por año se incrementaban significativamente. Sin embargo, no se han observado las cantidades detectadas en los pacientes afectados ni se ha establecido la dosis a la que estuvieron expuestos para provocar anormalidad. Así mismo, no se han valorado las posibles lesiones histológicas en los tejidos en los que el CCL puede acumularse. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del CCL sobre la ganancia de peso y las alteraciones histopatológicas en hígado y corazón en ratones expuestos a carne de conejo con CCL como único alimento.

MATERIALES Y MÉTODOS

En fase previa a este estudio se realizó un modelo biológico con conejos, a los que se les suministró en el agua de bebida una dilución de CCL (presentación en "sal mineral") a una dosis de 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de CCL (1,1815 mg/L/día), por un periodo de 35 días, al cabo de los cuales se sacrificaron; se obtuvo todo el tejido muscular y se determinó que su concentración de CCL fue de 7619 pg g^{-1} .

Animales experimentales

Para este trabajo se utilizaron 20 ratones machos de la línea BAL/C4 de 6 semanas de edad, que se colocaron en jaulas individuales en condiciones de confort y bienestar animal. Se cumplió con los lineamientos de ética, técnicos, científicos y administrativos referidos por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Sagarpa) (17) para la investigación en animales.

Manejo del experimento

Los ratones se distribuyeron al azar en dos grupos (G1 y G2) y recibieron como única alimentación carne (deshidratada a 80 °C) de conejo, a razón de 3,5 g al día, y agua destilada a libre demanda, según los siguientes grupos:

G1: con carne de conejo conteniendo 7619 pg g^{-1} de CCL (n = 10).

G2: grupo control, carne de conejo con 0 residuos de CCL (n = 10).

Obtención de muestras y procesos realizados

Treinta y cinco días después del inicio de la experimentación se obtuvo el peso de los ratones. Se sacrificaron de acuerdo con lo establecido por la Sagarpa (18), y se colectó sangre completa en tubos sin anticoagulante. Se realizó el estudio anatomopatológico, para valorar los

cambios macroscópicos, y se colectaron muestras de hígado y corazón que fueron fijadas en formol bufferado al 10% (10:1); para la valoración histológica se usó tinción: hematoxilina-eosina.

Prueba de ELISA

Las concentraciones de CCL se obtuvieron a través de la prueba de ELISA (Ridascreen Clenbuterol Fast®, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany), utilizando 20 μ l del estrato de la muestra de tejido muscular, o de suero sanguíneo. Las absorbancias se leyeron con un filtro de 450 nm en lector de placas BIOTEK, y los valores obtenidos se expresaron en pg g^{-1} (11,19).

Análisis de datos

Para el análisis de resultados se aplicó un análisis de varianza con un diseño completamente al azar de un camino de clasificación, en el que el tratamiento se consideró como la fuente principal de la varianza, con 2 tratamientos de 10 unidades experimentales cada uno. En aquellas variables en que resultaron diferencias significativas se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0,05$) (20).

Los cambios en el estudio anatomopatológico e histológico de los tejidos y órganos de los tratamientos se evaluaron de manera cualitativa y de apreciación con base en el grado de alteración de cada tejido, como lo describen Ke y colaboradores (21).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el modelo biológico aplicado, con la inclusión de carne como única fuente de alimento con una concentración de 7619 pg g^{-1} de CCL para el G1, y de 0 residuos para el G2, los animales del G1 mostraron un mayor incremento del peso corporal a lo observado en el G2 ($p < 0,05$) (tabla 1).

Strydom y colaboradores (22), al valorar el comportamiento productivo y las características de la canal

en bovinos al suministrar diferentes β -agonistas (zilpaterol, ractopamina y CCL), encontraron una mejor conversión alimenticia y ganancia de peso con menor deposición de grasa en la canal de los animales tratados con CCL, al compararlos con el grupo control ($p < 0,05$), seguidos de los animales tratados con zilpaterol. Sin embargo, se ha demostrado que el consumo de carne contaminada con CCL produce efectos adversos a la salud humana, debido a la estimulación del sistema cardiovascular. Sin registrar la concentración exacta, se ha informado que el consumo de carne contaminada con CCL con una dosis “moderada” produce adormecimiento de las manos, temblores musculares, nerviosismo y cefalea, y en dosis “más elevadas”, se acentúa la taquicardia, lo que puede ocasionar necrosis del miocardio (14,23,24).

Al ensayo inmunoenzimático, las concentraciones séricas promedio de CCL fueron de $0,00 \text{ pg g}^{-1}$ y de $4378 \pm 437,57 \text{ pg g}^{-1}$ para el G2 y el G1, respectivamente ($p < 0,05$). El suero sanguíneo y la orina son matrices en las cuales la detección de CCL se debe realizar en animales para abasto antes de su sacrificio, lo que permitiría un periodo de cuarentena necesario para su posible eliminación (7,11). Con el uso por tiempo prolongado de CCL en diferentes especies para abasto (bovinos, cerdos y aves), la permanencia de esta sustancia puede detectarse en la retina, el pelo y las plumas, debido a su afinidad por la melanina encontrada en estas estructuras, lo cual tiene un valor indicativo de su uso ilegal (8,25).

Con el precedente de detección de CCL en el tejido muscular de los conejos para alimentar a los ratones y su confirmación en músculo del G1 (5324 pg g^{-1}) se prueba su capacidad de retención biológica y deposición en tejidos blancos. Se ha establecido que el tiempo de permanencia y cinética del CCL en suero sanguíneo se puede determinar en un periodo de cuatro a seis días, el cual va a continuar con concentraciones detectables en dependencia de la dosis y el tiempo en que es administrado. Esto representa un factor de riesgo de intoxicación para los consumidores, tal como se observó en la cadena alimenticia de este experimento al suminis-

Tabla 1. Peso de ratones (línea BAL/C4) con administración de carne con CCL

Grupo	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Incremento de peso (g) corporal
G1 (7619 pg g ⁻¹ de CCL)	18,0 ^a ± 0,52	25,0 ^a ± 0,52	7,0 ^a
G2 (Control: 0 residuos)	18,1 ^a ± 0,51	22,1 ^b ± 0,50	4,0 ^b

Literales diferentes por columna indican valores que difieren estadísticamente (Tukey, $p < 0,05$).

trar carne contaminada con CCL; en este punto es importante considerar la particularidad de su estructura química (contenido de cloro), por el tiempo de permanencia en tejidos consumibles que es de 56 a 60 días en hígado, y seis días en el tejido muscular (25).

Además, con los resultados obtenidos se respalda que el CCL es una partícula estable a temperatura de deshidratación (80 °C), con una vida media de acción prolongada. De acuerdo con el *Codex Alimentarius* (26), que establece una concentración de 2000 pg g⁻¹ como “límite máximo” de residuos para el CCL en suero sanguíneo, en el G1 los valores detectados de CCL se consideran altos, lo que confirma la capacidad de acumulación de esta sustancia en la cadena alimenticia, y su efecto residual al considerar que los animales utilizados se encontraban en el segundo eslabón de la cadena alimenticia.

En la necropsia no se observaron lesiones macroscópicas evidentes en los animales de los dos tratamientos, salvo el aumento de volumen de las masas musculares con una menor deposición de grasa en el G1. El peso promedio del hígado de los ratones fue de 1,79 g y 2,58 g para el G2 y G1, respectivamente ($p < 0,05$).

En el estudio histopatológico del músculo cardíaco del G1 se observó engrosamiento y rizamiento de fibras musculares (10 de 10), pleomorfismo e hileración nuclear (figura 1). Así mismo, en el hígado de los animales tratados con CCL las lesiones observadas fueron: tumefacción y degeneración hidrópica de moderada a difusa, mitosis, picnosis y megacitosis con megacariosis de hepatocitos (figura 2).

Figura 1. Corte histológico de músculo cardíaco del grupo G1, evidencia de hipertrofia muscular denotada por pleomorfismo e hileración nuclear y engrosamiento de fibras (flechas). Tinción: hematoxilina y eosina. 10X

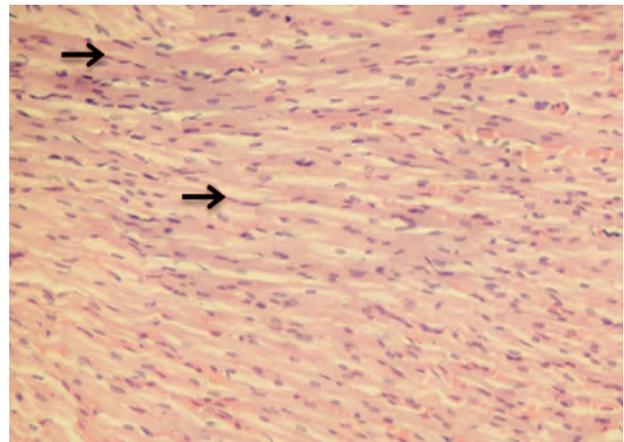
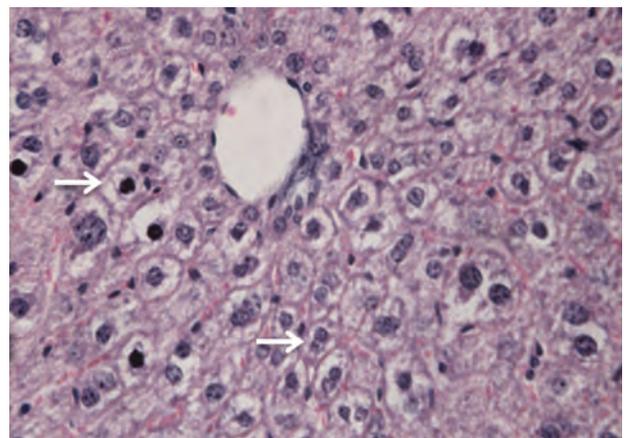


Figura 2. Corte histológico de hígado de G1, evidencia de tumefacción y degeneración hidrópica moderada, mitosis y picnosis de hepatocitos (flechas). Tinción: hematoxilina y eosina. 20X



Los cambios observados en el músculo cardíaco concuerdan con lo referido por Van Vleet y Valentine (27), que consideran a la hileración y engrosamiento de fibras como un proceso de hipertrofia muscular, que de forma consistente mostraron solo los animales tratados con CCL. Las modificaciones observadas en el corazón sugieren que el CCL tiene acción sobre los receptores específicos del tipo β_2 que se localizan en este tejido, que inducen a cambios estructurales, y su efecto es mayor en la musculatura esquelética (23,28). Con base en la estructura química, la acción del CCL se ha relacionado a la de las catecolaminas, con capacidad de interactuar con los receptores adrenérgicos del tipo β_2 , lo cual activa el sistema proteína Gs asociado a la adenilatociclasa, que tiene un papel importante en la entrada de calcio a la célula y que interviene en la síntesis de proteína celular (3,6,29).

En el hígado de los ratones (10 de 10) expuestos a CCL se observaron alteraciones importantes, que ponen de manifiesto su efecto tóxico (10,28). El CCL en el organismo tiene una acción prolongada, se almacena principalmente en hígado y riñón, y se metaboliza por medio de reacciones de N-oxidación en hidroxiclentbuterol y conjugados glucorónicos (13,28). Zalco, Bories y Tulliez (29) refieren que los metabolitos del CCL, N-hidroxilarilamina y N-nitroso clenbuterol, poseen propiedades tóxicas de riesgo tanto para la salud animal como para la del humano.

Badino, Odore y Re (9), al administrar 30 y 50 μg de CCL/kg/día a conejos, observaron efectos fetotóxicos (retraso en la osificación y paladar hendido). En otro trabajo se refiere que el posible efecto tóxico se debe más que nada a un efecto de estimulación adrenérgica y no a efecto de tipo genotóxico (30).

En los animales bajo tratamiento no se observó signoología aparente (salvo incremento de actividad o cierto nerviosismo). Sin embargo, los síntomas de intoxicación por el consumo de hígado y carne de res contaminada con CCL en el estudio registrado por Carrola y colaboradores (31), en dos pacientes, estos presentaron tremor muscular, náuseas e incoordinación; a la auscul-

tación mostraron un incremento de la frecuencia cardíaca (90/min), incremento de la presión arterial (140/80 mmHg), y al examen hematológico, leucocitosis $12,1-12,2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, acompañada de neutrofilia $9,3-10,1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, hipercalemia (2,7-2,8 mmol L^{-1}) e hiperglucemia (9,5-12,1 mmol L^{-1}).

En bovinos, y tal vez en otras especies para abasto, el uso clandestino e irracional del CCL se sigue dando de manera alarmante (3,11,29,31), por lo que debe actualizarse y aplicarse la normatividad en beneficio tanto de la salud pública como animal, instrumentarse programas permanentes para la vigilancia, el control y la erradicación del uso de esta sustancia y proponer alternativas (32) en las buenas prácticas de producción animal.

CONCLUSIONES

Al utilizar una concentración de CCL tres veces mayor que el máximo registrado como tóxico, el efecto observado fue una mayor ganancia de peso en los ratones expuestos a carne con CCL. El CCL favorece la ganancia de peso en ratones; sin embargo, las alteraciones histopatológicas observadas en hígado muestran un efecto hepatotóxico.

REFERENCIAS

1. Lau BPY. Confirmation analysis of clenbuterol in beef liver and minced beef by a combination of immunoaffinity chromatography and liquid chromatography/Electrospray mass spectrometry or liquid chromatography/Electrospray tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2000;32(6):655-61. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199706\)32:6<655::AID-JMS520>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199706)32:6<655::AID-JMS520>3.0.CO;2-A)
2. Abraham G, Kottke C, Dhein S, Ungemach FR. Pharmacological and biochemical characterization of the β -adrenergic signal transduction pathway in different segments of the respiratory tract. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(6):1067-81. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00460-X](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00460-X)

3. Valladares-Carranza B, Bañuelos-Valenzuela R, Peña-Betancourt SD, Velázquez-Ordóñez V, Echavarría-Cháirez FG, Muro-Reyes A, Ortega-Santana C. Riesgos a la salud por el uso de clorhidrato de clenbuterol: una revisión. *Rev Med Vet.* 2015;(30):139-49. <https://doi.org/10.19052/mv.3618>
4. Barbosa J, Cruz C, Martins J, Silva JM, Neves C, Alves C, et al. Food poisoning by clenbuterol in Portugal. *Food Addit Contam.* 2005;22(6):563-6. <https://doi.org/10.1080/02652030500135102>
5. Ramos F, Baeta ML, Reis J, Silveira MIN. Evaluation of the illegal use of clenbuterol in portuguese cattle farms from drinking water, urine, hair and feed samples. *Food Addit Contam.* 2009;26(6):814-20. <https://doi.org/10.1080/02652030902729908>
6. Sillence MN, Mathews ML, Badran TW, Pegg GG. Effects of clenbuterol on growth in underfed cattle. *Aust J Agric Res.* 2000;51(3):401-6. <https://doi.org/10.1071/AR99109>
7. Prezelj A, Obresa A, Pecar S. Abuse of clenbuterol and its detection. *Curr Med Chem.* 2003;10(4):281-90. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867033368330>
8. Valladares CB, Velázquez OV, Zamora E JL, Avilés MJA, Zaragoza BA, Posadas SMA. Implications of the use of clenbuterol hydrochloride in beef cattle. En: Salem AFZM, editor. *Nutritional strategies of animal feed additives.* Nueva York: Nova Science Publishers; 2013. p. 185-96.
9. Badino P, Odore R, Re G. Are so many adrenergic receptor subtypes really present in domestic animal tissues? A pharmacological perspective. *Vet J.* 2005;170(2):163-74. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.05.015>
10. Valladares CB, Bañuelos VR, Peña BSD, Velázquez OV, Zamora E JL. Biocinética y lesiones histológicas del clorhidrato de clenbuterol en modelo conejo. En: Ramos M, Aguilera V, editores. *Ciencias agropecuarias* [internet]. Handbook-©ECORFAN-Valle de Santiago, Guanajuato [citado 2015 oct. 22]; 2014. pp. 61-69. Disponible en: http://www.ecorfan.org/handbooks_agro2.php
11. Valladares CB, Bañuelos VR, Peña BSD, Velázquez OV, Velázquez AY, Nava OA. Illegal use of clenbuterol in cattle production in México. *Health.* 2014;6(8):673-6. <http://dx.doi.org/10.4236/health.2014.68087>
12. Ley Federal de Sanidad Animal. Nueva Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de julio de 2007 [internet]. México [citado 2015 oct 15]. Disponible en: <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LFSA.pdf>
13. Mazzanti G, Daniele C, Boatto G, Manca G, Brambilla G, Loizzo A. New β -adrenergic agonists used illicitly as growth promoters in animal breeding: chemical and pharmacodynamic studies. *Toxicol.* 2003;187(2-3):91-9. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00059-3)
14. Ke Y, Fu LL, Hong XF, Dong R, Xu TM, Gou JF, Liu Y, Cao JM. Acute clenbuterol induces hypotension, atrioventricular block and cardiac asystole in the rabbit. *Cardiovasc Toxicol.* 2013;13(1):85-90. <https://doi.org/10.1007/s12012-012-9185-8>
15. Hoffman RJ, Hoffman RS, Freyberg CL, Poppenga RH, Nelson LS. Clenbuterol ingestion causing prolonged tachycardia, hypokalemia and hypophosphatemia with confirmation by quantitative levels. *Clin Toxicol.* 2001;39(4):339-44.
16. Jiménez SLA, Garza RJ, Sumano LH, Frago SH. Sanitary surveillance in illegal use of clenbuterol and its intersectoral coordination in two states of México. *Vet Méx.* 2011;42(1):11-25.
17. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio [internet]. México: Diario Oficial de la Federación [citado 2015 sep. 28]; 2001. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
18. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres [internet]. México: Diario Oficial de la Federación; 1997 [citado 2015 sep. 29]. Disponible en: http://procesadora.colima.gob.mx/documentos/NOM-033-ZOO-1995_20DIC96.pdf
19. Meyer HHD. Residues screening for the β -agonist clenbuterol, salbutamol and cimaterol in urine using enzyme immunoassay and high performance liquid

- chromatography. *J Chromatogr.* 1991;564(2):551-64. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(91\)80523-F](https://doi.org/10.1016/0378-4347(91)80523-F)
20. Steel RGD, Torrie JH, Dickey DA. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 3a. ed. USA: McGraw-Hill; 1997.
 21. Ke L, Tong ZH, Ni HB, Ding WW, Sun JK. The effect of intra-abdominal hypertension incorporating severe acute pancreatitis in a porcine model. *PloS ONE.* 2012;7(3):e33125. doi:10.1371/journal.pone.0033125
 22. Strydom PE, Frilynck L, Montgomery JL, Smith MF. The comparison of three β -agonists for growth performance, carcass characteristics and meat quality of feedlot cattle. *Meat Sci.* 2009;81(3):557-64. doi: 10.1016/j.meatsci.2008.10.011.
 23. Barry AR, Graham MM. Case report and review of clenbuterol cardiac toxicity. *J Cardiol Cases.* 2013;8(4):131-3. <https://doi.org/10.1016/j.jccase.2013.07.004>
 24. Daubert GP, Mabasa VH, Leung VW, Aaron C. Acute clenbuterol overdose resulting in supraventricular tachycardia and atrial fibrillation. *J Med Toxicol.* 2007;3(2):56-60. <https://doi.org/10.1007/BF03160909>
 25. Elliot CT, Evoy JD, Shortt HD, Crooks SRH. Effective laboratory monitoring the abuse of the beta agonist clenbuterol in cattle. *Analyst.* 1993;118(4):447-8. <https://doi.org/10.1039/an9931800447>
 26. Codex Alimentarius. Límites máximos de residuos para clenbuterol. XXXIV Reunión de la Comisión del *Codex Alimentarius* FAO/OMS. Roma, Italia; 2011.
 27. Van Vleet FJ, Valentine AB. Muscle and tendon. En: Jubb, Kennedy, Palmer's, editores. *Pathology of domestic animals.* 5a. ed. USA: M Grant Maxie-Saunders Elsevier; 2007. p. 187-204.
 28. Valladares-Carranza B, Bañuelos-Valenzuela R, Peña-Betancourt SD, Velázquez-Ordóñez V, Echavarría-Chairez FG, Muro-Reyes A. Efecto del clorhidrato de clenbuterol sobre el funcionamiento hepático en modelo conejo. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales* [internet]. 2015 [citado 2015 nov 28];1(1): 16-23. Disponible en: http://www.ecorfan.org/spain/researchjournals/Ciencias_Ambientales_y_Recursos_Naturales/vol1num1/Revista-Ciencias-Ambientales-23-30.pdf
 29. Zalco D, Bories G, Tulliez J. Metabolic fate of clenbuterol in calves. *J Agric Food Chem.* 1998;46(5):1935-43. <https://doi.org/10.1021/jf970858g>
 30. Sumano LH, Ocampo CL, Gutiérrez OL. Clenbuterol y otros β -agonistas. ¿Una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública? *Vet Méx.* 2002;33(2):137-58.
 31. Carrola P, Devesa N, Silva JM, Ramos F. Intoxicación por agonista beta adrenérgico. *Acta Med Port.* 2003;16:275-8.
 32. Valladares-Carranza B, Montes de Oca-Jiménez R, Zamora-Espinosa JL, Velázquez-Ordóñez V, Posadas-Manzano E, Peña-Betancourt SD, et al. Influence of the use of additives and growth promoters on the herd health. En: Salem AFZM, editor. *Feed nutrients and animal health. Roles of some nutrients in animal health.* Deutschland-Germany: LAP Lambert Academic Publishing; 2013. p. 37-71.