

01621
71



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTUDIO DE CAMPO CON UN ENSAYO ELISA COMERCIAL
PARA LA DETECCION DE CLENBUTEROL EN MUESTRAS DE
HIGADO DE AVE, RES Y CERDO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
JESUS REYES MONTES

ASESOR: MVZ MC RUBEN MERINO GUZMAN



MEXICO, D. F.

2003

I



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi madre por encaminarme en este largo trayecto y por su amor.

A mis amigos:

Alma por tantos buenos momentos, por tanta ayuda, por su infinita paciencia, por sus consejos, sus regaños y su cariño; a Alejandro por enseñarme que alrededor mío existe gente honesta, por su amistad tan transparente y por toda la ayuda que desinteresadamente me brinda; a Alonso por ser cómplice, amigo, por la confianza; a Teresa por ser el vínculo sin el cual esto no hubiese sido posible(al menos en este departamento)y por tener la confianza de hablar conmigo; a Daniela por tantos detalles, por sus apapachos; a Víctor Hugo por toda su ayuda, por dejarse conocer poco a poco a lo largo de tantos años; a Carlos por su cordura, por saber escuchar y callar, por su lealtad, te debo una!; a José Luis por su compañía, por aguantarme tantas cosas, por estar ahí cuando lo necesité. A todos ellos por compartir tantas clases, exámenes, prácticas, tantas risas, charlas, tristezas, algunas fiestas y por todas las cosas buenas y malas que nos unen.

A todas aquellas personas que con sus buenas y malas intenciones me motivan a seguir en el camino.....

AGRADECIMIENTOS

A Rubén, por su infinita paciencia, por ser maestro y guía en este proyecto, por darme confianza.

A Marco Antonio Juárez por todos los comentarios y consejos en la realización de esta tesis, por escucharme.

A mi madre por el esfuerzo realizado en las primeras etapas de mi educación escolar, por enseñarme a valerme por mí mismo.

A mis hermanas Marisa y María José que tanto quiero, a mi hermano Hugo por ayudarme y sacarme de muchos aprietos.

A mis tías en especial a Lupe y Luz; mis tíos Marcos y Luis por el apoyo que me brindaron en tantos aspectos, lo saben y se los agradezco de corazón. A Hilda por tantas risas y confianza.

A mis primos, en especial a Eric por toda su ayuda, por sus ocurrencias y su compañía.

A mi abuela Luz por todo el apoyo que me brindó.

A mis amigos del entonces Departamento de Patología Clínica, Araceli, Lupita, por sus consejos por todo lo que de ustedes aprendí, por tener confianza en mi trabajo; a Angélica por esas palabras que me llenaban de tranquilidad, por sus enseñanzas y su carácter tan equilibrado; a Luisita por tantas risas; a Pilar por tanto cariño, confianza y detalles.

A Paola, Nicole y Emilio, por darme tantos momentos de felicidad sin decir una sola palabra.

A Vianca y Claudia por sus detalles y por considerarme su amigo.

A todas las personas que forman parte del Departamento de Producción Animal Aves por abrirme las puertas, brindarme la confianza y por todas las atenciones.

A los miembros de mi jurado: MVZ Rubén Merino Guzmán, MVZ Marco Antonio Juárez, MVZ Javier Flores Covarrubias, MVZ Francisco Monroy López y MVZ Francisco Basurto Alcántara por el tiempo que dedicaron a la revisión de la presente tesis.

A todos los profesores de la Facultad que intervinieron en mi formación académica

A todos los buenos compañeros que durante la carrera formaron parte importante de mi desarrollo académico y personal.

A la señora Alma Varela por tantas y tantas prácticas, por los consejos y por las risas.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Mecanismo de acción del clenbuterol.....	3
Problemática del uso y abuso del clenbuterol en la alimentación de animales.....	3
Situación Nacional actual.....	6
Procesos de extracción.....	8
HIPÓTESIS.....	10
OBJETIVO.....	11
MATERIAL Y METODOS.....	12
RESULTADOS.....	14
DISCUSIÓN.....	16
CUADROS.....	21
LITERATURA CITADA.....	27

RESUMEN

REYES MONTES JESÚS. Estudio de campo con un ensayo ELISA comercial para la detección de clenbuterol en muestras de hígado de ave, res y cerdo (bajo la dirección de Rubén Merino Guzmán)

El presente estudio se realizó con la finalidad de buscar la presencia de clenbuterol en muestras de hígado de ave, res y cerdo, 90 de cada especie, destinados al consumo humano, procedentes de 15 mercados públicos de diferentes zonas del Distrito Federal. Fueron colectadas 6 muestras de hígado de un peso aproximado de 20 g cada una, de cada especie y por cada mercado, se identificaron por número y procedencia y fueron procesadas y analizadas en el Departamento de Producción Animal: aves de la FMVZ de la UNAM. Las muestras se procesaron mediante la maceración de 5 g con la finalidad de extraer clenbuterol con acetato de sodio 2M, la centrifugación de las muestras y su análisis con el estuche comercial clenbuterol ELISA kit® fabricado para la detección cualitativa de clenbuterol en muestras de orina y suero de caballo. Se usaron controles positivos y negativos, así como estándares de clenbuterol en concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1 y 2 ng/ml para cuantificar la concentración de la molécula en muestras que dieron resultado presuntamente positivo. No se detectó la presencia de clenbuterol en muestras de ave y cerdo, 43.3% de las muestras de bovino resultaron positivas a la presencia de clenbuterol, el rango de la concentración en las muestras fue de 0.8 - 6.4 ng/ml con un promedio de 3.08 ng/ml. Se recomienda la utilización de este ensayo ELISA para el análisis de otro tipo de muestras como pelo, músculo, retina o pluma y la confirmación de resultados por métodos de cromatografía de gases o de líquidos de alta resolución.

INTRODUCCIÓN

Los agonistas beta adrenérgicos son moléculas orgánicas que se unen a los receptores beta adrenérgicos, dan lugar al complejo agonista receptor, el cual activa a diversas proteínas, que a su vez activan al AMPc. Esta molécula favorece la fosforilación de una gran cantidad de proteínas intracelulares. Estas proteínas tienen una variada gama de funciones que van desde permitir la entrada de calcio a la célula, hasta mediar la síntesis de otras proteínas clave para el funcionamiento celular. Las respuestas fisiológicas se producen cuando estos agonistas beta adrenérgicos se unen a los receptores. La administración oral de algunos agonistas beta adrenérgicos sintéticos modifican el crecimiento de la masa muscular y disminuyen la acumulación de grasa ⁽¹⁾

Los beta agonistas se han utilizado ampliamente para el tratamiento de afecciones respiratorias por su acción broncodilatadora y como tocolíticos en medicina veterinaria. Posteriormente se descubrió que presentan una acción anabólica en los animales domésticos si se emplean en dosis mayores a las terapéuticas, favorecen la síntesis de proteína y disminuyen la de grasa, lo que dio lugar a la denominación de este grupo como "agentes repartidores de energía". Este efecto se comprobó en diferentes especies animales utilizadas para consumo humano. ⁽²⁾

Mecanismo de acción del clenbuterol

El clenbuterol ejerce su efecto al activar a los receptores beta adrenérgicos. Cuando se pone en contacto con el receptor específico, se activa la adenilato ciclasa que convierte el ATP en AMPc, el cual promueve la activación de lipasas en el adiposito, para posteriormente liberar ácidos grasos a la sangre.⁽¹⁾

Los receptores β -AR están presentes en la mayoría de las células de los mamíferos, aunque la distribución de los subtipos ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$) y la proporción de cada uno, varía entre tejidos en una especie dada. Por lo general, los $\beta 1$ predominan en el corazón para estimular su inotropismo y en el músculo liso intestinal inducen relajación, mientras que los $\beta 2$ que se localizan en bronquios y músculo uterino inducen relajación en ambos casos.⁽²⁾ Se postula que el efecto lipolítico esta asociado con los receptores $\beta 3$, localizados en el adiposito, lo cual facilita la lipólisis. El efecto en el músculo esquelético es la hipertrofia ⁽³⁾, tiene un potente efecto anabólico sobre este al promover la retención de nitrógeno alimenticio y la síntesis de proteína muscular. Puede incrementar el flujo sanguíneo a ciertas regiones del cuerpo, lo que permite transportar mayores cantidades de sustratos y fuentes de energía para la síntesis proteica. ^(3,4)

Problemática de uso y abuso del clenbuterol en la alimentación de animales domésticos.

La prohibición del empleo de hormonas sexuales y análogos en la Unión Europea propició el interés del sector ganadero por las sustancias beta agonistas, porque además de ejercer efectos similares en los animales tienen la ventaja de administrarse por vía oral, lo que permite su mezcla con los alimentos. ⁽²⁾

El problema para la salud humana, radica en que la acción de los promotores sobre el desarrollo muscular sólo se obtiene con dosis farmacológicas al menos diez veces superiores a las terapéuticas.

Durante las últimas décadas, las especies productivas (particularmente el pollo de engorda) han sido seleccionadas para mejorar su tasa de crecimiento y reducir considerablemente el tiempo para obtener un buen peso al mercado. Esta mejora de la tasa de crecimiento se acompaña de una excesiva deposición de grasa que es improductiva y debe ser removida de la canal. La deposición de grasa puede ser reducida a través de muchos medios, como la selección genética, factores de manejo nutricional o bien por el uso de compuestos que mejoran la composición corporal, incluidos los beta agonistas. ⁽⁶⁾

De acuerdo con diferentes autores, los efectos de los beta agonistas no son tan efectivos en aves como en los ovinos; en los cerdos el efecto es calificado como intermedio y en el ganado bovino la respuesta es buena y similar a la de los ovinos. La probable explicación de estas diferencias es que algunas especies se han seleccionado de manera tan intensiva en su velocidad de crecimiento que tendrán menos potencial para incrementarlo ya que están muy próximas a la velocidad de crecimiento biológico máximo. Otros mecanismos posibles incluyen la afinidad del agonista por los receptores β y la posibilidad de que determinada especie animal tenga un número limitado de receptores β en tejidos blanco. ⁽¹⁾ Adicionalmente hay evidencia de que la intensidad de la respuesta depende de la predisposición endógena hacia cierta condición corporal, con diferencias entre genotipos o sexos. ⁽⁷⁾ En el pollo de engorda recientemente se ha mostrado la asociación de la acción promotora del crecimiento de los agentes repartidores con ciertos estados nutricionales y hormonales. ⁽⁸⁾

En los inicios de la década de los ochenta, se publicaron algunos datos sobre la modulación del crecimiento en animales donde se utilizó clenbuterol. Asimismo se mostró que la administración oral de este agonista al ganado, aves, cerdos y ovejas aumentaba la masa muscular y disminuía la cantidad de grasa corporal. En México se obtuvieron resultados similares con el clenbuterol, suministrado en el alimento de aves y cerdos, sin embargo en aves se requirió hasta 5 veces más la dosis utilizada como promotora de rendimiento en otras especies para obtener resultados tangibles.

⁽⁴⁾ En aves y cerdos se ha mostrado experimentalmente que la acción de los beta agonistas

incrementa los requerimientos de proteína y energía. Las respuestas máximas de crecimiento y mantenimiento de la deposición de proteína dependen de la cantidad de proteína en la dieta. La adición de clenbuterol en las dietas para estas especies eleva la utilización de la proteína de la dieta. ⁽⁹⁾ Los pollos de engorda responden a la suplementación prolongada con clenbuterol como lo hacen los mamíferos, los efectos son mas notorios en machos, mientras que las respuestas en la composición de la canal son mas aparentes en hembras. ⁽⁷⁾ En el caso de los patos, la utilización experimental del clenbuterol aumentó notablemente la masa muscular de la pechuga y disminuyó la deposición de grasa. ⁽¹⁰⁾ Estudios experimentales en cerdos, muestran que los beneficios en el crecimiento promovidos por el uso de beta agonistas en la alimentación están relacionados con los niveles de proteína y energía contenidos en la dieta. Existe evidencia de que el uso de beta agonistas, como la ractopamina, mejoran el crecimiento y la composición de la canal pero estos factores pueden verse limitados por la disponibilidad de proteína y energía en la dieta. En estudios *in vitro* con tejido adiposo de cerdo se muestra que el efecto de lipólisis es estimulado por cimaterol, isoproterenol, ractopamina, pero no por clenbuterol. Y que la lipogénesis es estimulada por todos los beta agonistas mencionados. ^(11, 12, 13, 14) En estudios de farmacocinética del clenbuterol se confirma que las dosis utilizadas para promover el crecimiento (10-20 µg/kg de peso vivo /por día/ vía oral) pueden resultar en niveles residuales farmacológicamente activos en riñón e hígado de animales tratados, no así en músculo. ⁽¹⁵⁾ La utilización de este compuesto en dosis elevadas favorece la aparición de depósitos del mismo en diferentes órganos. Estos acúmulos han originado intoxicaciones en personas que consumieron hígado y carne contaminada con clenbuterol, en varios países de Europa, China y México, cuando el período de retiro del fármaco no fue suficiente como para hacerlo desaparecer de los productos destinados al consumo humano. ⁽¹⁶⁾

En salud pública el consumo de clenbuterol se considera peligroso por su actividad cardiovascular. Esta situación provoca serias consecuencias sanitarias y socioeconómicas, al propiciar efectos negativos en el comercio de los productos y subproductos de origen animal. ⁽¹⁷⁾ Este problema no se

hace extensivo a los otros beta agonistas debido a que su potencia broncodilatadora, vaso o cardioactiva, es mucho menor que la del clenbuterol. ⁽⁴⁾

En los casos reportados de toxicidad por clenbuterol en humanos, los síntomas (malestar general, taquicardia, temblores, debilidad, ansiedad, cefalea, mareo y náuseas) aparecen de 15 minutos a 6 horas después de la ingestión de tejidos contaminados y desaparecen de 90 minutos a 6 días después. La larga vida media del clenbuterol resulta en un efecto prolongado en los pacientes intoxicados. ⁽⁵⁾ Sin embargo, los efectos de la intoxicación no son fatales. ⁽¹⁸⁾

Situación Nacional actual

Con el fin de asegurar la salud pública, en nuestro país entraron en vigor una serie de acciones tendientes a controlar el uso de los beta agonistas en la alimentación animal, por considerar que el uso incorrecto de este grupo de fármacos puede representar un riesgo sanitario. ^(19,20)

De acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-EM-015-ZOO-2002 (Especificaciones técnicas para el control del uso de beta agonistas en los animales) ⁽²¹⁾ se entiende por beta agonista al compuesto químico del grupo de los beta adrenérgicos, que confiere a cualquier producto, dilución o mezcla el carácter farmacéutico específico de los mismos, con efectos de promoción de la masa muscular, reductor de la cantidad de grasa corporal y con efectos sobre el aparato respiratorio.

Los beta agonistas más utilizados como promotores del crecimiento son: clenbuterol, ractopamina, y zilpaterol. ⁽³⁾ El clenbuterol es un miembro de las denominadas fenetanolaminas, induce una notoria broncodilatación en el ser humano y es utilizado como un fármaco auxiliar en el tratamiento de enfermedades respiratorias. Se considera como un potente broncodilatador, anabólico y lipolítico en muchas especies. ⁽⁴⁾ El clenbuterol es un fármaco beta agonista que se usa ilegalmente como promotor de crecimiento en la producción animal. ⁽²²⁾

La Norma oficial mexicana NOM-EM-015-ZOO-2002 establece que con excepción de aquellos productos beta agonistas que cuenten con el registro y autorización de la Secretaría de Agricultura para su uso y consumo por animales, queda prohibida la producción, tráfico, comercialización,

importación, suministro o utilización de los siguientes principios activos como ingredientes aditivos alimenticios en la formulación de dietas destinadas para consumo y uso en animales bromobuterol, carbuterol, cimaterol, cimbuterol, clenbuterol, fenoterol, isoproterenol, mabuterol, mapenterol, orciprenalina, pirbuterol, ractopamina, salbutamol, terbutalina y zilpaterol. La lista no se limita a los principios activos mencionados, sino que incluye a cualquier beta agonista conocido o de nueva creación. ⁽³⁾

La publicación detalla las medidas zoonositarias de aplicación, entre las que figuran la implementación de programas de inspección en los rastros nacionales, a fin de verificar y tomar muestras de sangre, orina, pelo, lana y pluma de las aves y el ganado introducido al país, así como el envío de tales muestras al laboratorio de diagnóstico aprobado, para realizar un examen *ante mortem* y tomar muestras de músculo, hígado, riñón y globo ocular en los animales sacrificados a fin de determinar la presencia de clenbuterol. ⁽¹⁷⁾

Los métodos analíticos oficiales establecidos en la norma oficial mexicana son ensayo inmunoenzimático, cromatografía de gases y cromatografía de líquidos de alta resolución. ⁽²¹⁾

Debido al riesgo potencial para la salud humana inherente al uso de la droga, los límites en el contenido de residuos de clenbuterol en los tejidos y productos cárnicos deben ser establecidos por leyes y normas desarrolladas en cada país. Como la prevención legal intenta preservar la salud humana, es necesario contar con análisis confiables y reproducibles para la detección de residuos con la finalidad de lograr la efectividad en dicha prevención. ⁽²³⁾

De los métodos utilizados para la detección y cuantificación de clenbuterol, los ensayos inmunoenzimáticos son métodos rápidos y sensibles que permiten el análisis de muchas muestras en poco tiempo, entre sus ventajas está el bajo costo de los reactivos y su fácil implementación en laboratorios que no cuentan con equipamiento para la realización de pruebas de cromatografía. Son considerados como pruebas tamiz y una característica importante de estas pruebas es el aceptable bajo número de resultados falsos negativos que arrojan, aunque la validación de estos resultados debe llevarse a cabo por métodos confirmativos como la cromatografía. ⁽²²⁾ Existen estuches (kits)

disponibles comercialmente para la detección de clenbuterol. Uno de ellos, de uso veterinario, se ha usado para la detección de clenbuterol en muestras de suero de un paciente humano⁽⁵⁾ y también se ha usado en ensayos *in vitro* para detectar y cuantificar clenbuterol en muestras de aves negativas e inoculadas con concentraciones conocidas.⁽²⁴⁾

Los métodos de detección de clenbuterol por cromatografía dan resultados cualitativos y cuantitativos definitivos, sin embargo las muestras requieren un proceso de extracción muy elaborado, previo a su análisis,⁽²⁵⁾ además se tiene el inconveniente de requerir aparatos sofisticados, por lo que resulta difícil su implementación en la mayoría de los laboratorios del país. Es por ello que se hace necesario contar con pruebas sensibles que permitan detectar la presencia de clenbuterol en la carne y vísceras destinadas al consumo humano, que se adapten a las condiciones de la mayoría de los laboratorios del país.

En este trabajo se evalúa el método de ensayo inmunoenzimático y se describe el proceso para la detección de Clenbuterol en tejidos de animales utilizados para consumo humano.

Procesos de extracción

Para la detección de clenbuterol en los diferentes tipos de muestras que pueden ser empleadas existen también varios procesos de extracción que tiene la finalidad de liberar la molécula de la muestra y mejorar la sensibilidad del análisis. La variación de estos procesos depende en menor grado del método analítico que será empleado, ya que los métodos por cromatografía requieren procesos de purificación previos. Para la extracción de clenbuterol en muestras de tejido, es necesario reducir el tamaño de partícula de la muestra, ya sea por maceración, picado, por medio de digestión enzimática o con el uso de proteasas.^(15, 26) Posterior a la reducción de la muestra se utilizan sustancias como etilacetato, NaOH 2M, ácido perclórico, cloroformo, butil- metil- éter, o combinaciones de éstos, cuya finalidad es extraer el clenbuterol presente en el tejido por medio de la modificación del pH y la disolución de lípidos de los tejidos y membranas celulares.^(25, 27) En el

caso de muestras de suero, se puede llevar a cabo el análisis sin realizar extracción o con la utilización de cloruro de sodio, acetonitrilo, éter, fosfato de sodio o acidificación con 5N HCl. ^(5,26)

Una característica molecular del clenbuterol, es que sus grupos OH son sustituidos por halógenos (en este caso cloro). La presencia de cloro en el clenbuterol lo hace más liposoluble que sus análogos por lo cual, tiende a difundir más profundamente en los tejidos y la grasa animal. Las propiedades lipofílicas de las bases libres de los beta agonistas son usadas durante su análisis en tejidos. Las sales de la molécula de interés presente en una matriz acuosa, son convertidas en bases libres a través de un ajuste de la matriz a un pH 10 o mayor, y el beta agonista es extraído del medio acuoso con solventes como el etil acetato, éter o cloruro de metilo. ⁽²⁷⁾ La hidrofobicidad del clenbuterol es responsable de su distribución en los lípidos celulares e influye en la precisión de su determinación. El paso de una molécula ionizable en lípidos, como el clenbuterol, de un medio celular hacia un solvente orgánico, depende de la fracción de la molécula que permanezca neutral al pH que se este usando. Estas moléculas se distribuyen en el medio acuoso, el solvente y el tejido adiposo. Si el solvente orgánico es capaz de disolver esos lípidos, entonces su contenido de la molécula de interés se suma a la fracción directamente extraída del medio acuoso. ⁽²³⁾

HIPÓTESIS

Si un ensayo ELISA para la detección de clenbuterol en muestras de suero y orina de caballo ha mostrado ser útil en ensayos *in vitro* con muestras de ave, entonces puede emplearse en el campo para la detección de clenbuterol en muestras de tejido (hígado) de ave, cerdo y res, como prueba rápida y efectiva.

OBJETIVO

- Efectuar un estudio de campo con un ensayo ELISA comercial para detectar clenbuterol en muestras de hígado de ave, res y cerdo para consumo humano procedentes de mercados públicos del Distrito Federal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Se utilizaron, 90 muestras de hígado de cada una de las tres especies animales (ave, cerdo, bovino), recolectadas en mercados públicos de 15 zonas del Distrito Federal. Se hizo la recolección de 6 muestras de hígado (aproximadamente 20 g / muestra) de cada especie animal, por mercado. Las muestras fueron identificadas por número y procedencia, y llevadas al Departamento de Producción Animal: aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, donde se conservaron en congelación a -20°C hasta su análisis.

Procesamiento de las muestras

De cada muestra de hígado de res, pollo y cerdo, se tomaron 5 g. Las muestras fueron ordenadas, identificadas y procesadas con la finalidad de extraer el clenbuterol en caso de estar presente en el tejido. El proceso de extracción que se utilizó fue el recomendado por Neogen Corporation (Lexington KY, 40505 USA) en su Technical Bulletin 5 ⁽²⁹⁾, para muestras de hígado. Este proceso consiste en macerar 5 g de cada muestra en un mortero, una vez macerada la muestra, se adicionan 20 ml de agua destilada y 2 ml de acetato de sodio 2M, se colocan en un tubo de centrifuga y se centrifuga a 3000 rpm (1000 x g) durante 5 minutos a 4°C . Posteriormente se obtiene el sobrenadante y se colocan 250 μl en una microplaca de 96 pozos de fondo plano, las muestras pueden conservarse en refrigeración o congelación hasta su análisis.

Se repitió el análisis de varias muestras que dieron resultado presuntamente positivo (elegidas aleatoriamente), junto con 2 muestras cuyo resultado fue negativo y 10 muestras que dieron resultado negativo y fueron inoculadas con clenbuterol para utilizarse como controles positivos. Se usó el medicamento Mucovibrol (Lab. Liomont, DF 05000, México) el cual contiene 0.005 mg / ml (5 μg / ml) de clenbuterol y clorhidrato de ambroxol 7.5 mg / ml. El clenbuterol se inoculó en una

concentración de 5 ng/g de muestra. El proceso de inoculación de las muestras negativas consistió en colocar 5 µl del medicamento en 1 ml de buffer EIA (incluido en el estuche ELISA), se agregó ésta dilución a 5 g de muestra macerada y se siguió el proceso de extracción descrito anteriormente.

Análisis de las muestras por la técnica ELISA para detección de Clenbuterol

Para el análisis de las muestras se utilizó el estuche comercial Clenbuterol ELISA kit[®] (Cat. 101210, 101215 y 101219, Neogen Corporation), fabricado para la detección cualitativa de clenbuterol en muestras de orina y suero de caballo, en formato de placas de 96 micro pozos.

Además de los controles positivo (5 ng / ml) y negativo (0 ng/ml) de este kit, se utilizaron los estándares de clenbuterol en concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1 y 2 ng/mL del clenbuterol quantitative ELISA kit[®] (cat. 109710, Neogen Corporation). Estos estándares se usaron para cuantificar la concentración de clenbuterol en muestras que dieron resultado presuntamente positivo. La prueba se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante de los estuches.

Al finalizar la prueba, la microplaca fue leída en un lector ELISA Dynatech MR650, con filtro de 650 nm.

Los resultados de densidad óptica (DO) de cada muestra se compararon con la DO del control negativo. Se obtuvo la proporción de la muestra hacia el Negativo (MN), o porcentaje de "negatividad" de cada muestra con la fórmula:

$$MN = (DO \text{ de la muestra} / DO \text{ del control negativo}) \times 100$$

De acuerdo con las indicaciones del fabricante, el límite de detección de clenbuterol en las muestras con este producto, es de alrededor de 0.4 ng / ml y la MN correspondiente a esta concentración de clenbuterol es de 50%. Con este principio se procedió a interpretar el resultado de la prueba de la siguiente manera:

Muestras con valor de $MN \geq 50\%$, se consideraron negativas a la presencia de clenbuterol

Muestras con valor de $MN < 50\%$, se consideraron positivas a la presencia de clenbuterol.

Curva de calibración. Las muestras presuntamente positivas fueron comparadas con una curva de calibración construida con la concentración en ng / ml y la DO obtenida para cada estándar incluido en la prueba (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1 y 2 ng/mL).

La concentración de clenbuterol en cada muestra positiva fue calculada con la fórmula de ajuste a la curva log-logit descrita en el instructivo de uso del clenbuterol Quantitative ELISA kit.^{® (30)}

Se calculó el porcentaje máximo de unión de cada estándar mediante la división entre la DO de cada uno de ellos entre la DO del estándar 0 y multiplicándolo por 100. Se transformó el rango a la función logit, donde $\text{logit} = \ln (MN / 100 - MN)$. Con estos valores se construyó la curva estándar.

Se determinó el valor de MN y el valor logit de cada muestra. La concentración de clenbuterol en cada muestra presuntamente positiva se determina al comparar el valor logit de cada muestra con la concentración correspondiente de los estándares de clenbuterol. El análisis se realizó en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel[®] (Microsoft Corporation. Excel 2000, programa de cómputo).

RESULTADOS

De acuerdo con el principio de interpretación utilizado ($MN > 50\% =$ negativo), las muestras de ave y cerdo analizadas dieron resultados negativos a la presencia de clenbuterol en hígado. Las muestras de ave mostraron resultados de MN de 82 a 115%, con un promedio de 96%, mientras que el valor MN de las muestras de cerdo varió entre 60 y 97%, con un promedio de 87%. Estos resultados se muestran en los cuadros 1 y 2 para las muestras de ave y cerdo, respectivamente.

Los resultados de las muestras de hígado de bovino se muestran en el cuadro 3. Se encontraron 56.6% de muestra negativas (51 de 90), cuyos valores de MN mostraron un rango de entre 63 y 98%, con un promedio de 80.5%. Se encontraron 39 muestras positivas (43.3%), con valores MN de 8 a 44% con un promedio de 17.7%. Cuando se comparó la DO de las muestras positivas con la DO de las referencias del clenbuterol Quantitative ELISA kit[®] se obtuvieron concentraciones de 0.8 a 6.4 ng / ml de clenbuterol, con un promedio de 3.08 ng / ml, cuadro 4.

Los resultados de MN de la repetición del análisis de 37 muestras que dieron resultado presuntamente positivo junto con 2 muestras negativas y 10 muestras negativas que fueron inoculadas con 1 ng de clenbuterol /g de muestra se observan en el cuadro 5. En todas las muestras presuntamente positivas se confirmó el resultado. Las dos muestras negativas dieron valor MN de 59 y 51% (negativo). Las 10 muestras inoculadas con clenbuterol dieron resultado positivo (MN entre 14 y 43%) con un promedio de 20% y el promedio de la concentración de clenbuterol para estas muestras fue de 1.08 ng/ml.

DISCUSIÓN

Kuiper *et al.* ⁽²²⁾ y Blass *et al.* ⁽²⁾ coinciden en que debido al riesgo potencial que representa para la salud humana el consumo de carne y vísceras de animales suplementados con clenbuterol como promotor de crecimiento, es necesario un continuo mejoramiento de los métodos de detección que deben ser rápidos, específicos, confiables y que permitan el análisis de un buen número de muestras a costo relativamente bajo, así como de los métodos de confirmación.

En el presente estudio se utilizaron muestras de hígado con el fin de detectar la presencia de clenbuterol debido a la facilidad para obtener este tipo de muestras en mercados públicos y también porque, de acuerdo con Brambilla, y Sauer ^(15, 26), el largo periodo de acción de los beta agonistas como el clenbuterol favorece su acumulación en el hígado de animales suplementados para promover el crecimiento; y la ingestión de éste puede resultar en intoxicación para los consumidores. El hígado es el órgano más peligroso y se considera como una muestra adecuada para monitorear y confirmar el uso de clenbuterol en lugares donde las regulaciones especifican el análisis de tejidos antes de ser comercializados para el consumo humano.

Mazzanti *et al.* ⁽¹⁶⁾ indica que se han presentado casos de intoxicación en humanos después de la ingestión de hígado y carne contaminada en varios países de Europa, China, Hong Kong y México. Por su parte García ⁽³⁾ menciona que en nuestro país se han notificado casos de intoxicación por clenbuterol y destaca que en su totalidad los casos fueron asociados al consumo de hígado de bovino. Por su parte, Cristino *et al.* ⁽³¹⁾ señala la importancia que tiene el tipo de muestra a analizar para la detección de clenbuterol (pelo, ojo, músculo, hígado o riñón) y hace hincapié en las ventajas y desventajas que representan de acuerdo con la situación que prevalece en cada lugar, para definir mejor las estrategias para el control del uso ilegal del clenbuterol.

Esta información refuerza la elección del hígado como una muestra adecuada para el análisis tamiz de la presencia de clenbuterol en tejidos de animales empleados para consumo humano.

En algunos casos de intoxicación en humanos se ha utilizado el método ELISA para detectar clenbuterol en los pacientes, Hoffman *et al.* ⁽⁵⁾ reporta la dificultad de encontrar laboratorios capaces de analizar muestras de suero con este fin, y para ello algunos laboratorios veterinarios han sido capaces de proveer el servicio a partir de una prueba originalmente diseñada para evaluar muestras de caballo. El uso del producto analizado en este trabajo confirmó el diagnóstico de intoxicación por clenbuterol en un paciente humano al ser analizada una muestra de suero, se detectó la presencia de clenbuterol y se confirmó por cromatografía líquida/espectrometría de masas. En otro estudio realizado por Brambilla *et al.* ⁽¹⁵⁾ se mostró la utilidad del mismo ensayo ELISA, para la detección de clenbuterol en muestras de orina de pacientes intoxicados, basado en los niveles encontrados en la carne de bovino analizada con esta prueba.

La curva de calibración construida en este trabajo arroja resultados en nanogramos por mililitro, para ello se usaron los valores de las concentraciones de los estándares de clenbuterol lo que permitió efectuar la calibración con respecto a las densidades ópticas de los controles y las muestras.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, la problemática generada por el uso de clenbuterol como promotor de crecimiento en las muestras procedentes del Distrito Federal se centra en el consumo de tejidos, vísceras de bovino específicamente. Los resultados para las muestras de ave y cerdo, excluyen a dichas especies del problema de salud pública que representa el uso de clenbuterol en la alimentación animal y el consumo de carne con residuos del mismo. En el caso de las aves, los resultados negativos obtenidos concuerdan con los obtenidos por Merino *et al.* ⁽²⁴⁾ en los que se indica la ausencia de clenbuterol en muestras de suero, retina, hígado, músculo, y pluma de aves destinadas al consumo humano. Los resultados también coinciden con las declaraciones de Sánchez ⁽¹²⁾ quien señala que ni el clorhidrato de clenbuterol ni otras hormonas se

utilizan en la engorda de pollo en México porque el periodo de vida de éstas es muy corto y no habría ningún beneficio, sino que al contrario representan mayores costos de producción.

Otros ensayos ELISA han demostrado ser eficaces para la detección de clenbuterol en diferentes muestras, al comparar los resultados con los obtenidos por cromatografía, Podesta *et al* ⁽²³⁾ resalta la importancia de llevar a cabo un proceso de extracción adecuado que permita minimizar las diferencias entre resultados y los posibles falsos negativos inherentes a dicho proceso. Por su parte, Posyniac *et al* ⁽²⁵⁾ hace hincapié en la optimización de los procesos de extracción para tener resultados mas confiables cuando se comparan los resultados con métodos de cromatografía. De acuerdo con los resultados obtenidos en las muestras inoculadas utilizadas como referencias positivas, el método de extracción usado en el estudio, a pesar de no ser un proceso optimizado, cumple el propósito de detección cualitativa oportuna de muestras contaminadas con clenbuterol.

De acuerdo con los resultados, el método de extracción usado en el estudio, permite un análisis confiable para la detección cualitativa inicial de clenbuterol en el hígado de las especies estudiadas, al obtenerse resultados en las muestras de ave y cerdo similares a los reportados con el mismo método de extracción usado por Merino *et al*. ⁽²⁴⁾

Actualmente existen muchas discrepancias para el establecimiento claro de la dosis tóxica de clenbuterol en humanos. Las autoridades de algunos países establecen los límites residuales de clenbuterol en tejidos animales para consumo humano de acuerdo con lo que consideran aceptable.

En este sentido, vale la pena señalar que la concentración de residuos máxima (MRL por sus siglas en inglés) en tejidos o leche de origen animal de un medicamento y sus metabolitos se calcula a partir de la ingesta diaria admisible en humanos (ADI por sus siglas en inglés). Kuiper *et al*. ⁽²²⁾ mencionan que para el clenbuterol la MRL en algunos países de la Comunidad Europea es de 0.5 µg/kg de tejido comestible, por su parte Smith ⁽²⁷⁾ señala que la ADI es de 250 ng/peso total/día. Para llegar al valor de la ADI se determinó previamente el nivel de no efecto del clenbuterol (NOEL por sus siglas en inglés) en humanos, cuyo valor es de 2.5 µg/día. Brambilla *et al*. ⁽¹⁵⁾ señala una dosis promotora de crecimiento en animales que va de 10 a 20 µg/kg/día por vía oral; de

acuerdo con Sauer *et al.* ⁽²⁶⁾ esta dosis induce niveles residuales cercanos a los 200 ng/g de hígado. La concentración promedio obtenida en los resultados de este estudio es de 3.08 ng/ml. De acuerdo con lo descrito anteriormente, esta concentración podría no poner en riesgo la salud del consumidor, ya que apenas representa un 0.015% de la dosis terapéutica más baja (20µg/adulto). Es importante tener en cuenta que el clenbuterol es un fármaco prohibido por las autoridades para usarse como promotor del crecimiento, independientemente de la concentración encontrada en las muestras de hígado y de los riesgos que esta implica, no debería estar presente en los tejidos animales destinados al consumo humano y bajo este concepto deberían tomarse las medidas pertinentes por parte de las autoridades competentes.

Llama la atención que las dosis de clenbuterol utilizadas de forma ilícita por atletas o físico culturistas (20 a 200 µg por vía oral de 1 a 3 veces por día) ⁽²⁷⁾ son muy superiores a los valores de MRL, ADI, NOEL y de dosis terapéutica en humanos (20 a 40 µg/adulto). Sumano *et al.* ⁽⁴⁾ ejemplifica que para lograr una dosis broncodilatadora (no tóxica) con clenbuterol, se recomiendan y usan 10-20 µg/adulto 2 veces al día, si se tiene un NOEL de 2.5 µg/día y un hígado con una concentración de 39 µg de clenbuterol/kg, entonces un individuo debería consumir aproximadamente 125-250 g de hígado para lograr apenas una dosis broncodilatadora, asumiendo una biodisponibilidad del 100% en el humano, lo cual no es posible. Existen algunas diferencias en cuanto a las dosis terapéuticas y con mayor razón entre las dosis que pueden considerarse peligrosas, sin embargo debe tenerse en cuenta la susceptibilidad de cada persona a ciertos fármacos.

Los límites de detección se establecieron con estándares de clenbuterol purificado que tienen como valor más bajo 0 ng/ml y como valor más alto 5 ng/ml. El ensayo ELISA utilizado en este trabajo tiene un límite de detección de 0.4 ng/ml y en concordancia con Podesta *et al.* ⁽²³⁾ este valor es considerado inferior a los límites teóricos de toxicidad para el consumidor humano, aunque él no indica cual es ese valor tóxico.

Este ensayo ELISA permitió la detección rápida y eficaz de muestras positivas a la presencia de clenbuterol y ofrece una ventaja considerable si se toma en cuenta la situación de la mayoría de los laboratorios en los diferentes estados de la República, los cuales no cuentan con equipo para pruebas de cromatografía. El análisis cuantitativo confirmatorio mediante otros métodos analíticos más sofisticados puede ser llevado a cabo si es necesario en dependencias mejor equipadas.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, el uso del ensayo ELISA demostró ser confiable en la repetición del experimento con las muestras de res que dieron resultados positivos y con muestras cuyo resultado anterior fue negativo y se inocularon con clenbuterol a una concentración conocida para ser usadas como referencias positivas, por lo tanto puede recomendarse su uso como un método analítico rápido y efectivo para la detección de clenbuterol en muestras de hígado y otros tejidos de especies animales destinadas al consumo humano. Se recomienda también la confirmación de los resultados por métodos analíticos más exactos, como la cromatografía líquida/espectrometría de masas.

Cuadro 1. Resultados de Muestra al negativo (MN) de muestras de hígado de ave para consumo humano analizadas mediante ELISA para la detección de Clenbuterol.

Procedencia	Positivas	Negativas	% MN					
			Muestra					
			A	B	C	D	E	F
1	0	6	84	82	82	84	86	91
2	0	6	92	93	96	91	84	86
3	0	6	91	89	97	89	98	90
4	0	6	99	99	105	113	101	105
5	0	6	107	110	107	110	115	105
6	0	6	98	96	94	92	86	91
7	0	6	101	93	90	96	93	96
8	0	6	91	92	85	103	87	89
9	0	6	104	96	94	90	98	92
10	0	6	96	100	96	97	96	95
11	0	6	99	101	99	103	103	86
12	0	6	94	93	105	109	102	102
13	0	6	93	96	93	96	100	95
14	0	6	93	91	94	98	96	96
15	0	6	107	100	98	100	100	106
Total	0 (0%)	90 (100%)			Promedio = 96			

$MN \geq 50\%$ se consideran negativas a la presencia de clenbuterol

$MN \leq 50\%$ se consideran positivas a la presencia de clenbuterol

Cuadro 2. Resultados de Muestra al negativo (MN) de muestras de hígado de cerdo para consumo humano analizadas mediante ELISA para la detección de clenbuterol.

Procedencia			% MN					
	positivas	negativas	A	B	C	D	E	F
1	0	6	94	89	88	89	86	86
2	0	6	89	86	94	86	88	89
3	0	6	88	95	88	96	89	97
4	0	6	89	86	97	87	97	97
5	0	6	73	89	89	80	87	94
6	0	6	88	82	96	88	77	88
7	0	6	88	97	88	95	85	88
8	0	6	89	97	88	89	88	89
9	0	6	89	84	88	81	89	88
10	0	6	86	87	89	89	78	87
11	0	6	87	88	80	78	87	88
12	0	6	73	87	81	86	86	87
13	0	6	81	86	87	61	60	85
14	0	6	88	89	86	94	88	96
15	0	6	93	86	87	89	86	86
Total	0(0%)	90 (100%)			Promedio = 87			

MN \geq 50% se consideran negativas a la presencia de clenbuterol

MN \leq 50% se consideran positivas a la presencia de clenbuterol

Cuadro 3. Resultados de Muestra al negativo (MN) de muestras de hígado de res para consumo humano analizadas mediante ELISA para la detección de clenbuterol

Procedencia			% MN					
	positivas	negativas	A	B	C	D	E	F
1	2	4	66	35	63	69	69	29
2	2	4	19	95	19	92	95	97
3	0	6	74	79	86	87	87	72
4	0	6	90	95	97	98	94	93
5	6	0	13	15	12	12	8	12
6	4	2	18	17	15	66	73	18
7	3	3	89	96	89	16	15	22
8	1	5	80	81	89	81	79	44
9	4	2	84	19	15	82	14	16
10	6	0	14	14	15	15	13	18
11	5	1	17	71	15	17	15	16
12	4	2	63	39	17	72	16	18
13	2	4	15	16	68	65	76	71
14	0	6	89	84	84	79	77	80
15	0	6	88	82	82	80	79	77
Total	39 (43.3%)	51 (56.6%)				Promedio positivas = 17.7 Promedio negativas = 80.5		

MN \geq 50% se consideran negativas a la presencia de clenbuterol

MN \leq 50% se consideran positivas a la presencia de clenbuterol

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Cuadro 4. Resultados muestras de hígado de res para consumo humano analizadas mediante ELISA, para la detección de clenbuterol. Concentración de clenbuterol en ng/ml

Procedencia	Concentración de clenbuterol en ng/ml							
	positivas	negativas	A	B	C	D	E	F
1	2	4	0	1.1	0	0	0	1.6
2	2	4	2.6	0	2.6	0	0	0
3	0	6	0	0	0	0	0	0
4	0	6	0	0	0	0	0	0
5	6	0	4.0	3.2	4.4	4.4	6.4	4.4
6	4	2	2.7	2.9	3.4	0	0	2.8
7	3	3	0	0	0	3.2	3.3	2.2
8	0	6	0	0	0	0	0	0
9	4	2	0	2.6	3.2	0	0	0
10	6	0	3.6	3.6	3.4	3.3	3.8	2.7
11	5	1	2.7	0	3.0	3.4	3.0	3.3
12	4	2	0	1.0	2.8	0	3.2	2.8
13	3	3	3.3	3.0	0	0	0	0
14	0	6	0	0	0	0	0	0
15	0	6	0	0	0	0	0	0
Total	39	51	Promedio positivas = 3.08 ng/ml					
	(43.3%)	(56.6%)	Promedio negativas = 0					

Cuadro 5. Resultados de Muestra al negativo (MN) de muestras de hígado de res para consumo humano anteriormente positivas y negativas inoculadas analizadas mediante ELISA para la detección de clenbuterol.

Procedencia			% MN					
	positivas	negativas	Muestra					
1	2		NE	17	NE	NE	NE	17
2	2		13	NE	12	NE	NE	NE
3*	5	0	19	17	20	19	16	NE
4			NE	NE	NE	NE	NE	NE
5	6	0	15	34	21	10	10	10
6	4		15	12	12	NE	NE	25
7	3	3	NE	NE	NE	14	15	13
8*	5		43	14	15	20	17	NE
9	4	2	NE	21	12	NE	12	11
10	6	0	15	15	15	16	15	11
11	5	1	13	59*	16	47	23	26
12	3	3	NE	13	51*	12	33	NE
13	2	4	15	20	NE	NE	NE	NE
Total	47 [§]	2						
	(95.9%)	(4.0%)						
								Promedio positivas = 17.5 [§]
								Promedio negativas = 55

* muestras inoculadas

§ incluye las muestras anteriormente negativas inoculadas.

* muestras negativas

MN ≥ 50% se consideran negativas a la presencia de clenbuterol

MN ≤ 50% se consideran positivas a la presencia de clenbuterol

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Cuadro 6. Resultados muestras de hígado de res para consumo humano anteriormente positivas y negativas inoculadas analizadas mediante ELISA , concentración de clenbuterol en ng/ml.

<i>Concentración de clenbuterol en ng/ml</i>									
<i>procedencia</i>	<i>positivas</i>	<i>negativas</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	
1	2	4		1.2	-				1.2
2	2	4	1.7		1.8				
3*	5	1	1.0	1.2	1.0	1.0	1.2		
5	6	0	1.4	0.4	0.9	2.4	2.4	2.2	
6	4	2	1.4	1.9	1.9			0.7	
7	3	3				1.5	1.4	1.7	
8*	6	0	0.3	1.5	1.4	1.0	1.2		
9	4	2		0.9	1.8		1.9	2.0	
10	6	0	1.5	1.4	1.4	1.3	1.3	2.1	
11	5	1	1.7	0*	1.3	0.3	0.8	0.7	
12	3	3		1.7	0*	1.8	0.5		
13	3	2	1.4	1.0					
Total	47[§]	2			Promedio positivas = 1.35[§] ng/ml				
	(95.9%)	(4.0%)			Promedio negativas = 0				

*Muestras inoculadas

§ Incluye muestras inoculadas

^ Muestras anteriormente negativas

LITERATURA CITADA

1. Mersmann HJ. Overview of the effects of β -adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *J. Anim. Sci.* 1998; 76: 160-172.
2. Blass A, Illera JC, Silvan G, Illera M, Sauer M. Cinética del anabolizante clenbuterol en plasma medida mediante ELISA. *Inv Agr: Prod San Anim* 1998; 13: 135-144.
3. García LA. Alerta epidemiológica por la intoxicación en humanos con clenbuterol y su empleo en la alimentación del ganado. *Rev San Mil Mex* 2002; 56: 131-134.
4. Sumano LH, Ocampo CL, Gutierrez OL. Clenbuterol y otros beta agonistas, ¿una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública?. *Vet Méx* 2002; 33: 137-157.
5. Hoffman RJ, Hoffman RS, Freyberg CL, Poppenga RH, Nelson LS. Clenbuterol ingestion causing prolonged tachycardia, hypokalemia and hypophosphatemia with confirmation by quantitative levels. *Clinical Toxicology* 2001; 39: 339-344.
6. Buyse J, Decuyper E, Huyghebaert G, Herremans M. The effect of clenbuterol supplementation on growth performance and on plasma hormone and metabolic levels of broilers. *Poultry Science* 1991; 70: 993-1002.
7. Rehfeldt C, Schadereit R, Weikard R, Reichel K. Effect of clenbuterol on growth, carcass and skeletal muscle characteristics in broiler chickens. *British Poultry Science* 1997; 38: 366-372.
8. Hamano Y, Okada S, Tanaka T. Effects of thiamine and clenbuterol on body composition, plasma metabolites and hepatic oxygen consumption in broiler chicks. *British Poultry Science* 1999; 40: 127-130.
9. Hamano Y, Kume K, Yamazaki S, Terashima Y. Combined effects of clenbuterol and various concentrations of protein on performance of broiler chickens. *British Poultry Science* 1998, 39: 117-122.