



**Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica**

**Agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, detección cuantitativa,  
aplicaciones en estudios farmacocinéticos y  
metabolismo.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor  
de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica.

**Viviana Graciela Spotorno**

Director de tesis: Dr. Jorge Guillermo Tezón

Consejero de estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de Trabajo: Instituto de Tecnología de Alimentos, C.I.A., INTA

Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET

Buenos Aires, 2008.

**Agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, detección cuantitativa, aplicaciones en estudios farmacocinéticos y metabolismo.**

**Resumen.**

Los anabólicos se suministran al ganado para mejorar el rendimiento en carnes y reducir grasa animal. Sin embargo, los residuos de estos tratamientos representan un riesgo para la salud de los consumidores. El clenbuterol es un agonista  $\beta$ -adrenérgico, que se utiliza con fines terapéuticos y posee efectos lipolíticos y anabólicos.

Se ha desarrollado un enzimoimmunoensayo, con un anticuerpo inmovilizado que captura una molécula de clenbuterol acoplada a biotina (trazador), en competencia con la muestra incógnita o soluciones patrón conocidas. El complejo en la fase sólida se visualiza por unión del trazador a Avidina Fosfatasa Alcalina. Su rango de uso es de 0,02 a 4 ng/100 $\mu$ l. Distingue cambios de concentración de hasta el 10%. Para lograr la misma señal con el agonista endógeno, es necesaria una concentración quinientas veces mayor de epinefrina.

Utilizando este enzimoimmunoensayo, se detectaron residuos de clenbuterol en pelo bovino, hasta 30 días posteriores a una única aplicación anabolizante.

El metabolismo del clenbuterol en células hepáticas bovinas en cultivo se ve afectado por la dexametasona. La N-hidroxilación parece ser el camino metabólico principal.

El trazador fue usado con éxito para la marcación específica de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en membranas en células fibroblásticas, sin reacción en células parenquimáticas, de hígado bovino.

**Palabras claves:** clenbuterol, agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, enzimoimmunoensayo, residuos.

**β-Adrenergic agonists, quantitative detection, application in pharmacokinetic studies and metabolism.**

**Abstract.**

Anabolics are administered to cattle to improve meat rate and reduce animal fat.

However, residues after these treatments represent health risk for consumers.

Clenbuterol is a β-adrenergic agonist, used for therapeutic purposes, and exhibits lipolytic and anabolic effects.

An enzyme immunoassay for clenbuterol has been developed, using an immobilized antibody that recognizes clenbuterol coupled to biotin (tracer). The competition of samples or known standard solutions is used for quantitative measurements. The complex attached to the solid phase is visualized by Avidin Alkaline Phosphatase reaction. The working range for the assay is 0.02 to 4 mg/100μl. Changes up to 10% in concentration are distinguished by the assay. To obtain the same signal with the endogenous agonist, it has to be present at five hundred fold concentrations of epinephrine.

Using this enzyme immunoassay, clenbuterol residues have been detected in bovine hair 30 days after the administration of a single anabolizing dose.

The clenbuterol metabolism in bovine hepatic cells in culture is affected by dexamethasone. N-hydroxylation seems to be the principal metabolic pathway.

β-adrenergic receptors were specifically labeled in cell membranes using the “tracer”.

The label was detected in fibroblastic but not parenchymal cells of bovine liver.

**Key words:** clenbuterol, β-adrenergic agonists, enzyme immunoassay, residues

La cultura es el fruto de la curiosidad,  
de esa inquietud misteriosa que invita a mirar el fondo  
de todos los abismos.

José Ingenieros.

## **Agradecimientos.**

Quisiera comenzar por agradecer a Jorge Tezón, por su dirección, disposición incondicional y amistad a lo largo de todas las etapas de esta tesis.

También es muy importante para mí agradecer a Teresa García y Jorge Casal por introducirme y orientarme en el tema, y por la consistencia en su apoyo y ayuda.

Mi agradecimiento es extensivo a todas las personas que colaboraron con su trabajo y conocimientos: a Celia Liliana Melamed y Laura Lascano del laboratorio del Instituto de Biología y Medicina Experimental del CONICET, a Osvaldo Zabal y su equipo en el laboratorio de cultivo de células del Instituto de Virología del INTA, a Alejandra Hidalgo, Mariana Barbich y Alicia Lorenti del Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano.

... y todas aquellas personas que de alguna forma participaron de esta tesis, aún sin saberlo.

Estos trabajos están incluidos en el desarrollo del Proyecto PID 802-OC-AR:339 del Banco Interamericano de Desarrollo y la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Nación, y el Proyecto E-3062 de la International Foundation for Science.

## **Dedicatoria.**

A Elena y Jorge, y a Malena,  
en quienes la palabra científico suena  
mejor.

A José Luis por su amor, su  
paciencia y por teñir de delicioso  
humor mi vida.

## Índice general.

<b>1. Objetivos.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción. ....</b>	<b>2</b>
2.1. <i>Agonistas <math>\beta</math>-adrenérgicos.</i> .....	2
2.1.1 Efectos de los agonistas $\beta$ -adrenérgicos en producción animal. ....	3
2.1.2 Modo de acción. ....	6
2.1.3 Acción de los agonistas en la célula. ....	11
2.1.4 Estructura y propiedades químicas de los $\beta$ agonistas. ....	14
2.1.5 Residuos. ....	19
2.2. <i>Receptores <math>\beta</math>-adrenérgicos.</i> .....	20
2.2.1 Estructura. ....	21
2.2.2 Subtipos.....	23
2.3. <i>Clembuterol.</i> .....	30
2.3.1 Efecto en animales. ....	31
2.3.2 Efectos en producción animal y en las carnes. ....	32
2.3.3 Metabolismo de clembuterol. ....	33
2.3.4 Efectos adversos. ....	34
2.3.5 Análisis de residuos. ....	39
<b>3. Desarrollo de enzimoimmunoensayos para clembuterol. ....</b>	<b>41</b>
3.1. <i>Objetivos del capítulo.</i> .....	42
3.2. <i>Desarrollo experimental de las investigaciones.</i> .....	43
3.3. <i>Materiales y métodos.</i> .....	44
3.4. <i>Acoplamiento de clembuterol a albúmina sérica bovina y humana.</i> .....	52
3.4.1 Diseños de enzimoimmunoensayos por titulación de anticuerpos. Clembuterol-BSA inmovilizado en fase sólida. ....	53
3.4.2 Producción de anticuerpos específicos. ....	60
3.5. <i>Síntesis de trazadores para enzimoimmunoensayos.</i> .....	61
3.5.1 Acoplamiento de clembuterol a enzimas. ....	62

3.5.2	Diseños de enzimoimmunoensayos por titulación de anticuerpos. Segundo Anticuerpo inmovilizado en la fase sólida. ....	64
3.5.3	Acoplamiento de clenbuterol a biotina. ....	67
3.5.4	Diseños de enzimoimmunoensayos competitivo. Anticlembuterol inmovilizado en la fase sólida. ....	76
3.5.5	Síntesis de nuevos trazadores con distintas concentraciones de biotina. ....	79
3.6.	<i>Estudio de la especificidad del enzimoimmunoensayo.</i> .....	82
3.7.	<i>Interpretación de los resultados.</i> .....	85
3.8.	<i>Discusión del capítulo 3.</i> ....	87
<b>4.</b>	<b>Farmacocinética de <math>\beta</math>-agonistas en bovinos por enzimoimmunoensayo. ....</b>	<b>92</b>
4.1.	<i>Objetivos del capítulo.</i> .....	93
4.2.	<i>Desarrollo experimental de las investigaciones.</i> ....	94
4.3.	<i>Materiales y métodos.</i> .....	95
4.4.	<i>Extracción de clenbuterol de matrices biológicas.</i> ....	98
4.4.1	Extracción y purificación de las muestras.....	98
4.4.2	Matrices de afinidad. Polímeros de impresión molecular (MIP). ....	99
4.5.	<i>Estudios de determinación de clenbuterol en bovinos.</i> ....	103
4.6.	<i>Discusión del capítulo 4.</i> ....	108
<b>5.</b>	<b>Metabolismo de clenbuterol. Caracterización de receptores <math>\beta</math>-adrenérgicos.</b>	
	<b>111</b>	
5.1.	<i>Objetivos del capítulo.</i> .....	112
5.2.	<i>Desarrollo experimental de las investigaciones.</i> ....	114
5.3.	<i>Materiales y métodos.</i> .....	115
5.4.	<i>Biotransformaciones en cultivo de hepatocitos bovinos.</i> ....	123
5.4.1	Cultivo de hepatocitos bovinos .....	123
5.4.2	Perfiles metabólicos en cultivo de células. Interacción con corticosteroides. ....	129
5.5.	<i>Receptores <math>\beta</math>adrenérgicos en hepatocitos bovinos.</i> ....	142



5.5.1	Señal específica en membranas de hepatocitos. ....	143
5.5.2	Interacción de los corticosteroides sobre los receptores celulares. ....	146
5.6.	<i>Discusión del capítulo 5.</i> ....	151
<b>6.</b>	<b>Conclusiones y perspectivas.</b> .....	<b>156</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografía</b> .....	<b>165</b>

## Abreviaturas.

7-EC	7-etoxicumarina
7-OH	7-hidroxycumarina
ADBA	Ácido 4-amino-3,5-diclorobenzoico
ADI	Ingesta Diaria Admisible
AIBN	2,2-azobis-(2-methylpropionitrilo)
Anti-	Anticuerpo dirigido a
AntiIgG	Anticuerpo dirigido a IgG (segundo anticuerpo)
ATB	Suplemento de antibióticos
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CBB	Clembuterol-BSA-Biotina
Clemb	Clembuterol
CREB	proteína de respuesta de unión al AMPc
CTB	Clembuterol-Tiramina-Biotina
DAB	Di amino bencidina
DEA	Di etanol amina
DEX	Dexametasona
D-MEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
EFA	ExtrAvidina Fosfatasa Alcalina
EGTA	Ácido etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetil éter) N,N,N',N' tetra acético
EIA	Enzimoimmunoensayo
F12	Suplemento Han
FA	Fosfatasa Alcalina
FBS	Suero Fetal Bovino
FITC	Isotiocianato de Fluoresceina
HBSS	Solución salina de Hank
HSA	Albúmina Sérica Humana
IgG	Inmunoglobulina G
LMR	Límite Máximo de Residuos
MIP	Polímero de Impresión Molecular
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida-adenin-dinucleótido (difosfopiridín nucleótido)
NADH	Nicotinamida-adenin-dinucleótido, forma reducida
NADPH	Fosfato de nicotinamida-adenin-dinucleótido (trifosfopiridín nucleótido)
NHS-Biotina	N-hidroxisuccinimida- biotina
NOEL	Nivel sin efecto observable
PBS	Buffer fosfato salino
PBS <sup>++</sup>	PBS con agregado de iones bivalentes (Ca <sup>++</sup> y Mg <sup>++</sup> )
pNPP	para-nitro-fenilfosfato
RIA	Radioimmunoensayo
TIS .	Suplemento de Transferrina, Insulina y Selenito de sodio
Tris	Tris-hidroximetil amino metano

## **1. Objetivos.**

Las drogas veterinarias son importantes herramientas en producción animal, para combatir enfermedades y mejorar o garantizar la productividad. Sin embargo, residuos de dichos tratamientos pueden quedar en los tejidos y representar un riesgo para la salud de los consumidores. El objetivo general de este trabajo es contribuir con mejores métodos para la detección de anabólicos en carnes de consumo y así mejorar la capacidad de control de la inocuidad de los alimentos.

- El primer objetivo del trabajo es obtener un enzimoimmunoensayo (EIA) para determinación de clenbuterol, con características de sensibilidad, selectividad y robustez tales que permitan su aplicación en el análisis de residuos en tejidos animales.
- El segundo objetivo es caracterizar la farmacocinética del clenbuterol en bovinos, por el empleo del EIA desarrollado.
- En la parte final de este trabajo, se desarrolla el tercer objetivo: establecer la posible regulación de receptores  $\beta$  adrenérgicos y cambios metabólicos del clenbuterol por interacción con corticosteroides, en hepatocitos bovinos.

## **2. Introducción.**

Los compuestos denominados generalmente como anabólicos se suministran principalmente al ganado bovino para mejorar su relación de carne a grasa. El consumo de carnes con residuos de tales tratamientos, presenta un sinnúmero de consecuencias para el ser humano, dependiendo del tipo de anabólicos usados. Esto ha llevado a la prohibición total del uso de estas sustancias. Si estas reglas de producción no se respetan, la detección de anabólicos de uso prohibido puede ocasionar, por parte de las autoridades sanitarias responsables, el decomiso de partidas para el consumo local o su exportación.

Los agonistas  $\beta$  adrenérgicos ( $\beta$  agonistas) causan un cambio en la composición de la canal en el ganado bovino, ovino, porcino y aves. El rendimiento es generalmente mayor, el contenido de grasa se reduce a favor de un mayor porcentaje de músculo, acompañando de hipertrofia muscular. El análisis de la canal completa o de músculos individuales, indican menor cantidad de grasa y mayor de proteínas y humedad (Fiems, 1987).

### **2.1. Agonistas $\beta$ -adrenérgicos.**

Un agonista es un compuesto que ocupa un receptor e imita la actividad de un mediador natural biológico, usualmente de manera más potente. En el caso de los receptores adrenérgicos, la acción de los agonistas está en relación con la adrenalina y la noradrenalina.

El clenbuterol, el cimaterol y el salbutamol pertenecen al grupo de los  $\beta$ -agonistas. Estos pueden utilizarse con fines terapéuticos, antiasmáticos y tocolíticos, pero tienen además, efectos lipolíticos y anabólicos.

La administración oral de ciertos  $\beta$  agonistas al ganado bovino, porcino, ovino y aves, aumenta el tamaño del músculo y decrece la deposición de grasa. Los receptores  $\beta$  adrenérgico controlan un gran número de funciones fisiológicas, lo cual sugiere que el mecanismo de los cambios observados en la composición de la canal, puede ser extremadamente complejo. La descripción del mecanismo propuesto debe comenzar por el efecto directo de los agonistas sobre el músculo esquelético y el tejido adiposo, sin embargo muchos otros mecanismos, como la modificación del flujo sanguíneo, liberación de hormonas o control de la ingesta por el sistema nervioso central, pueden contribuir al conjunto de los efectos observados con un dado  $\beta$  agonista, en determinada especie animal. Más aún, las propiedades farmacocinéticas de un agonista en particular son complejas y pueden variar entre especies, o inclusive dentro de una especie según la edad o la dieta del animal (Mersman, 1998).

### **2.1.1 Efectos de los agonistas $\beta$ -adrenérgicos en producción animal.**

*Empleo de agonistas de receptores  $\beta$ -Adrenérgicos como promotores de crecimiento animal.* En 1965 Cunningham presentó indicios de cambios en el crecimiento de mamíferos por administración de ciertos agentes (cafeína, teofilina, nicotina y epinefrina), que directa o indirectamente podrían funcionar cambiando la concentración intracelular de AMPc. A principios de los años 1980, se publicó información sobre la modulación del crecimiento en animales alimentados con clenbuterol, un agonista  $\beta$

adrenérgico (Ricks et al, 1984). La administración oral de clenbuterol aumentaba la masa muscular y reducía la masa grasa en distintas especies. En algunos casos, también producía un incremento de la ganancia en peso y por lo tanto una mejora en el rendimiento de la ingesta de alimentos. En años siguientes, se alimentaron varias especies con muchos otros  $\beta$  agonistas (cimaterol, ractopamine, L 664,969, salbutamol), con efectos similares a los producidos por el clenbuterol. Al día de hoy ninguno de estos compuestos está permitido en la mayoría de los países, como modificadores del crecimiento animal. En la tabla 2.1.1.i se resumen los efectos de  $\beta$  agonistas en distintas especies (Mersman, 1998).

*Tabla 2.1.1.i. Efectos de la administración oral de agonistas  $\beta$  adrenérgicos a mamíferos y aves.* Los valores representan el porcentaje de cambio y provienen de resultados de numerosas experiencias, tabulados en el artículo original de Moloney et al, 1991, con múltiples dosis de  $\beta$  agonistas (Mersman, 1998).

<b>Animal</b>	<b>Ganancia en peso</b>	<b>Consumo de alimento</b>	<b>Ganancia en peso/ alimento</b>	<b>Músculo</b>	<b>Grasa</b>
Bovinos	+10	-5	+15	+10	-30
Pollos	+2		+2	+2	-7
Porcinos	+4	-5	-5	+4	-8
Ovinos	+15	+2	+15	+25	-25

Existen abundante literatura sobre los efectos de estos compuestos en cría de aves y mamíferos (Hanrahan, 1987; Beermann, 1989, 1994; Anderson et al, 1991; Bergen y Merkel, 1991; Moloney et al, 1991; McKeith et al, 1994; NRC, 1994; Steele et al, 1994).

Los efectos de los  $\beta$  agonistas más pronunciados se aprecian en ovinos y en bovinos, los efectos en aves son menores y en cerdos son intermedios. Una posible razón por las grandes diferencias en la respuesta entre especies es que algunas especies fueron intensivamente seleccionadas por su velocidad de crecimiento y tienen menos potencial para incrementarlo, pues están próximas a su velocidad de crecimiento biológicamente máxima (por ejemplo: pollos parrilleros). Otras especies, como los ovinos, no han sido tan intensivamente seleccionadas por su velocidad de crecimiento y tienen mayor potencial para incrementarla.

Otra razón para dichas diferencias entre especies es que un agonista particular puede no ser tan efectivo en una especie como en otra; un dado agonista puede no activar el  $\beta$  receptor de un tejido dado en una especie, tan efectivamente como en otras. Posibles mecanismos del agonista incluyen: la afinidad por el receptor, el acoplamiento del complejo agonista-receptor al sistema de transducción de la señal y factores que influyen el transporte del compuesto a los receptores. Además, una especie en particular puede tener un número limitado de receptores  $\beta$  en el tejido en cuestión, lo cual reduce la respuesta del agonista, o el agonista puede desactivarse rápidamente.

Si bien se han realizado intentos para comparar cuantitativamente la eficacia y la potencia de muchos  $\beta$  agonistas, existen demasiados factores en experimentos de crecimiento animal, como para trazar conclusiones comparativas de diferentes experimentos individuales.

### 2.1.2 Modo de acción.

**Músculo esquelético.** Uno de los efectos más obvios de la administración oral de un agonista  $\beta$  adrenérgico al ganado bovino, porcino y ovino, es el incremento de la masa muscular. Como el crecimiento postnatal del músculo esquelético es primariamente el resultado de la hipertrofia, un aumento en la síntesis de las proteínas, la disminución de su degradación o una combinación de ambas, produce un incremento en la masa muscular (Yang y McElligott, 1989; Moloney et al, 1991; Kim y Sainz, 1992; Mersmann, 1995). Esto ha sido demostrado en experimentos individuales, con varios  $\beta$  agonistas, en diferentes especies (Bergen et al, 1989; Claeys et al, 1989; Adeola et al, 1992b). La degradación de proteínas es raramente medida directamente, en cambio frecuentemente es medida la actividad de las proteasas en músculos. A su vez la actividad de las proteasas modula la concentración de sus inhibidores (Wang y Beermann, 1988; Kretchmar et al, 1990; Koohmaraie et al, 1991; Bardsley et al, 1992; Sainz et al, 1993). En cerdos tratados con epinefrina, los datos sugieren una relación positiva entre la epinefrina del plasma y la concentración de calpastatina (el inhibidor de las proteasas calcio-dependientes, las calpaínas) (Sensky et al, 1996). Pero hay que tomar en cuenta que el estado de otros sistemas endócrinos pueden influenciar los efectos observados (Liu et al, 1994). En mamíferos, el tratamiento con agonistas  $\beta$  adrenérgicos causa un incremento en la transcripción del ARN de muchas proteínas musculares. Luego de un tratamiento con  $\beta$  agonistas se incrementan los ARNm de la cadena liviana de miosina (Smith et al, 1989), de  $\alpha$  actina (Helferich et al, 1990; Koohmaraie et al, 1991; Grant et al, 1993) y del inhibidor la proteasa de calpaína: calpastatina (Higgins et al, 1988; Bardsley et al, 1992; Killefer y Koohmaraie, 1994).



La densidad de los receptores  $\beta$  adrenérgicos presente en los músculos bovinos longissimus y semitendinosus no está correlacionada con ningún rasgo de crecimiento (Hoey et al, 1995). Aunque la respuesta de un tipo celular o tejido a un agonista  $\beta$  adrenérgico debería depender del número de receptores, los receptores son inactivados por fosforilación y la respuesta fisiológica generalmente representa la activación de unos pocos receptores.

**Tejido Adiposo.** Otro efecto obvio de la administración oral de un  $\beta$  agonista es la disminución de la grasa en el animal. En células *in vitro* o en explantes de tejidos, estos agonistas estimulan la degradación del triacilglicerol en adipocitos e inhibe su síntesis, así como la de ácidos grasos. Sin embargo, con agonistas específicos en ciertas especies particulares, se ha visto que si bien los agonistas por vía oral producen una disminución de la grasa corporal, pueden tener mínima respuesta en el metabolismo lipídico en adipocitos de la misma especie *in vitro* (Spurlock et al, 1993, 1994; Mills and Mersmann, 1995).

En algunos, pero no en todos los casos, después de la administración crónica de un agonista, el tejido adiposo habrá incrementado la lipólisis o disminuído la lipogénesis *in vitro*. (Mersmann, 1989c, 1990, 1995; Mills and Mersmann, 1995).

Un aumento de la concentración de los ácidos grasos no esterificados en el plasma sugiere la activación del sistema lipolítico en adipocitos. Esto se observa en cerdos y bovinos, como respuesta a muchos de agonistas  $\beta$ -adrérgicos (Mersmann, 1987; Hu et al, 1988; Adeola et al, 1992a) (Blum y Flueckiger, 1988; Eisemann et al, 1988). Si bien,

en bovinos y ovinos, la respuesta es amortiguada con administración crónica del agonista, es siempre medible (Eisemann et al, 1988) (Beermann et al, 1987).

Los efectos en el tejido adiposo pueden no ser persistentes, como en el músculo esquelético. Diferentes diseños experimentales, incluyendo genética de los animales, podrían producir resultados cuantitativos divergentes. Múltiples mecanismos para disminuir la respuesta de las células a la administración crónica de una agonista debería causar inactivación o remoción de los receptores  $\beta$  de la superficie celular, conocido como desensibilización. En cerdos, este fenómeno se produce en mayor medida en tejido adiposo que en tejido muscular, lo que puede ser un mecanismo para producir una menor respuesta en tejido adiposo (Spurlock et al, 1994).

**Otros mecanismos.** Un número de mecanismos menos directos de la actividad de los receptores  $\beta$  adrenérgicos *in vivo* pueden fácilmente contribuir al mecanismo de acción de un agonista administrado por vía oral. Debido a que muchos tipos celulares poseen receptores  $\beta$  adrenérgicos en su membrana celular, es probable que existan múltiples efectos de un agonista en particular en el animal. (Buttery y Dawson, 1987; Mersmann, 1989a, 1995; Zimmerli y Blum, 1990; Moloney et al, 1991).

Entre los efectos encontrados, los agonistas pueden incrementar la circulación sanguínea en ciertas regiones del cuerpo. Un incremento del flujo sanguíneo en el músculo esquelético puede aumentar el proceso de hipertrofia, por recibir cantidades mayores de sustratos y recursos de energía para la síntesis de proteínas. Así mismo, el incremento del flujo sanguíneo en el tejido adiposo podría remover ácidos grasos no esterificados del tejido y aumentar la degradación lipídica. Estos mecanismos pueden

fácilmente aumentar los efectos más directos de los  $\beta$  agonistas de las células musculares y adiposas. El flujo sanguíneo probablemente se incrementa en otros órganos por el incremento en el ritmo cardíaco que producen muchos agonistas  $\beta$  adrenérgicos (e.g., Mersmann, 1987).

Otro posible mecanismo es la modulación de las concentraciones de numerosas sustancias endócrinas. En bovinos, los  $\beta$ -agonistas pueden aumentar la insulina plasmática (Blum y Flueckiger, 1988; Zimmerli y Blum, 1990). En ovinos, la administración crónica de  $\beta$ -agonistas aumenta la concentración plasmática de hormonas tiroideas en ovinos (Beermann et al, 1987). La administración aguda de un  $\beta$  agonista exógeno en cerdos eleva las catecolaminas endógenas en plasma, y estas pueden mediar efectos en varios tejidos (Mersmann, 1989b).

El metabolismo controlado por receptores  $\beta$  adrenérgicos, puede ser alterado por agonistas exógenos; resultando en concentraciones plasmáticas modificadas de metabolitos como la glucosa o el lactato.

Un agonista puede traspasar la barrera hematoencefálica y producir efectos sobre el sistema nervioso central. Esto fue demostrado para el clenbuterol en ratas (Ordway et al, 1987). Por este mecanismo se explicaría una reducción de la ingesta de alimentos que se produce con algunos  $\beta$  agonistas en ciertas especies.

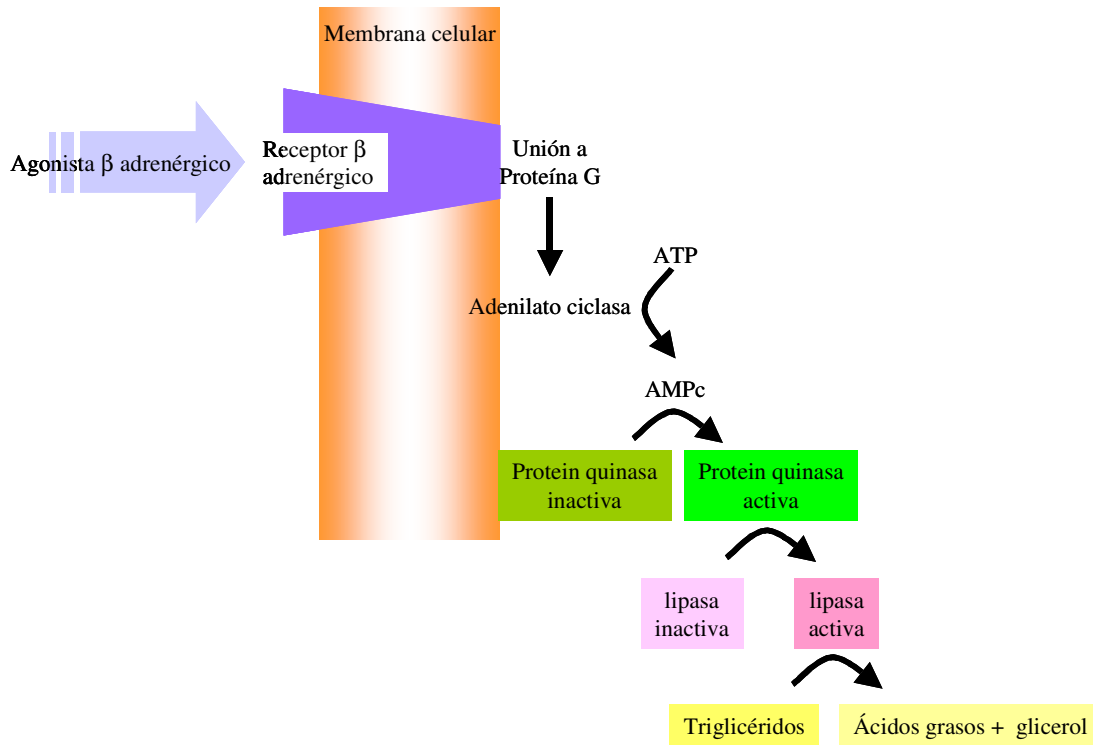
Cada uno de los mecanismos individuales, o más probablemente la combinación de ellos, podrían estar operativos en ciertas especies, para un dado agonista, a una edad

particular, bajo condiciones de producción agropecuaria definidas y alimentados con una dieta particular. Si el agonista llega a un órgano en la concentración apropiada y dichos tejidos producen una respuesta del receptor  $\beta$  adrenérgico, cierta función del tejido contribuirá al mecanismo completo, en esa especie, con ese agonista específico, bajo esas condiciones prescriptas.

***Transporte del ligando.*** Las características de la farmacodinámica y la farmacocinética de una droga pueden variar con la especie, la raza o línea, dieta o estado sanitario del animal, y así modificar los caminos metabólicos de dicha droga. Entre los muchos factores influyen la farmacocinética y farmacodinámica de un agonista, incluyen: 1) formulación, ruta de administración y dosis; 2) estabilidad de la droga en el alimento, el intestino, el tejido adiposo o los músculos (si se inyecta) y en la sangre; 3) la absorción de la droga incluyendo el transporte intravenoso o en el sistema linfático; 4) el metabolismo de la droga, incluyendo la biotransformación a moléculas más activas, la degradación, y la unión a proteínas; 5) el transporte de la droga a sitios activos, en el flujo sanguíneo y la permeabilidad celular de los capilares y las células donde actúa; 6) los subtipos de receptores, su concentración y el grado de activación; y 7) la excreción de la droga. Dado el extenso número de factores cualitativos, debe ser claro que la extrapolación de los resultados para una droga a través de las especies no es apropiado. Dada la cantidad de potenciales modificadores del efecto de una droga, no es sorprendente que los efectos cuantitativos observados en diferentes pruebas con drogas, inclusive usando el mismo diseño, en la misma especie, sean muy divergentes. Los mismos resultados en distintas especies aportan apoyo cualitativo más que reproducibilidad.

### 2.1.3 Acción de los agonistas en la célula.

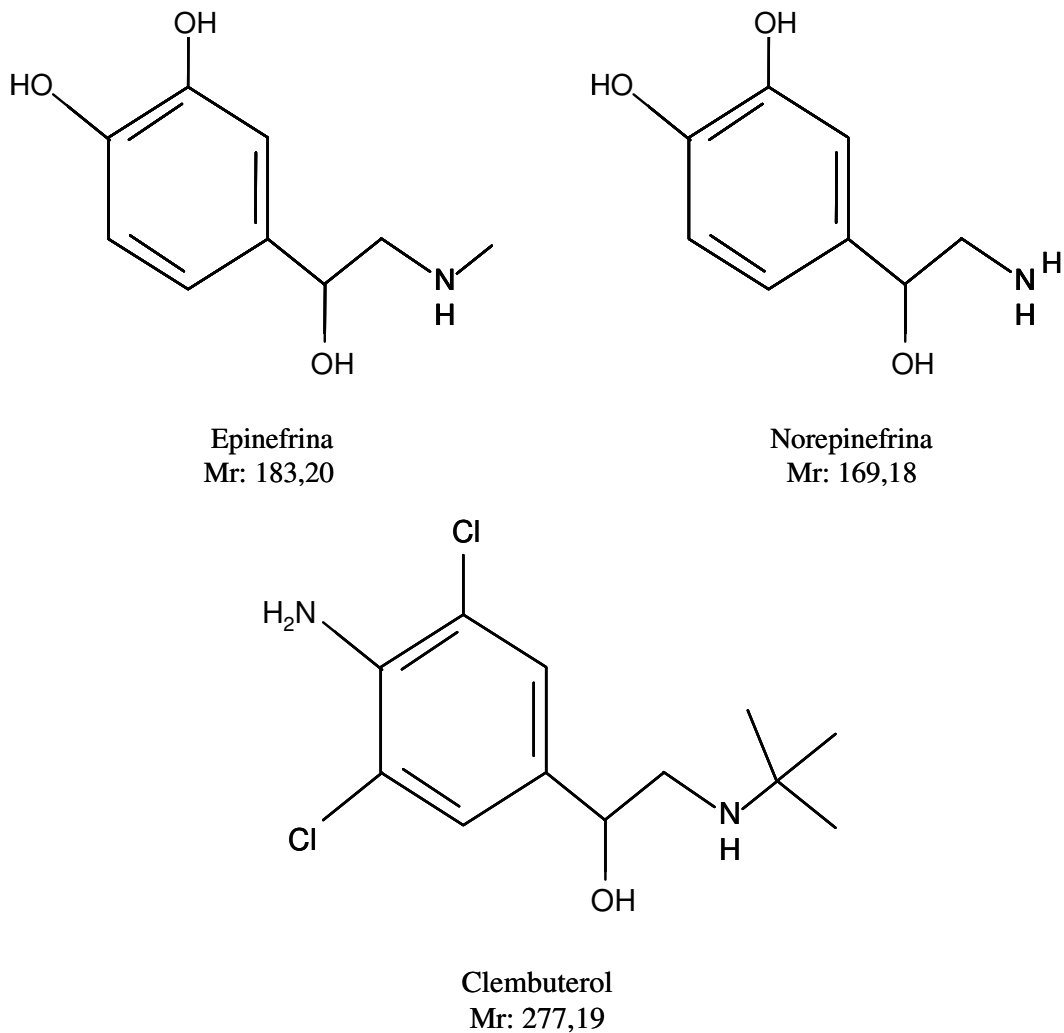
La unión de los agonistas a los receptores  $\beta$  adrenérgicos activan la proteína G. La subunidad  $\alpha$  de la proteína G luego activa la adenilato ciclasa, y esta enzima produce adenosin monofosfato cíclico (AMPC), que es uno de los transmisores de señal más importantes. El mecanismo por el cual el AMPC produce el efecto, es a través su unión a la subunidad regulatoria de la proteína quinasa A, que libera la subunidad catalítica, que luego fosforila proteínas intracelulares. Muchas de estas proteínas son enzimas que se activan por fosforilación (por ejemplo: lipasas sensibles a hormonas, enzimas que limitan la velocidad de lipólisis para la degradación del triacilglicerol en adipocitos). La proteína de respuesta de unión al AMPC (cAMP Response Element Bindng Protein) (CREB) es fosforilada por la proteína quinasa A; el CREB se une al AMPC en la parte regulatoria de un gen y estimula su transcripción. La fosforilación estimula la actividad transcripcional del CREB, proveyendo el mecanismo para la transcripción de un número de genes por activación con un agonista  $\beta$  adrenérgico. Un ejemplo de este mecanismo lo da la regulación de la lipólisis en tejido adiposo (figura 2.1.3.i).



*Figura 2.1.3.i. Regulación de la lipólisis en tejido adiposo.*

Otras enzimas se inactivan cuando se fosforilan (por ejemplo: acetyl-CoA carboxilasa, la enzima que limita la velocidad de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga) (Mersmann, 1989a; Strosberg, 1992; Liggett and Raymond, 1993).

Los mediadores fisiológicos de los  $\beta$ -agonistas son norepinefrina y epinefrina (figura 2.1.3.ii). La norepinefrina es una catecolamina, molécula neurotransmisora del sistema nervioso simpático, que es biosintetizada a partir de la tirosina. La catecolamina epinefrina es sintetizada y secretada por la medula adrenal; circula a concentraciones menores que la norepinefrina en la mayoría de las especies mamíferas, pero durante el estrés generalmente aumenta por sobre el nivel de la norepinefrina. La biosíntesis de la epinefrina se realiza a partir de la norepinefrina por metilación.



*Figura 2.1.3.ii. Estructura de epinefrina y norepinefrina. Estructura de Clembuterol.*

La especificidad en la estructura molecular reactiva con los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, llevó a la síntesis de cientos de moléculas que se unen a ellos, muchos de las cuales actúan como agonistas, mimetizando la acción de las hormonas endógenas, mientras que otras son antagonistas, se unen al receptor, pero no activan a la proteína G y bloquean el efecto biológico del receptor. El interés en los agonistas  $\beta$  adrenérgicos se ha enfocado en la producción de compuestos que específicamente estimulen receptores  $\beta$

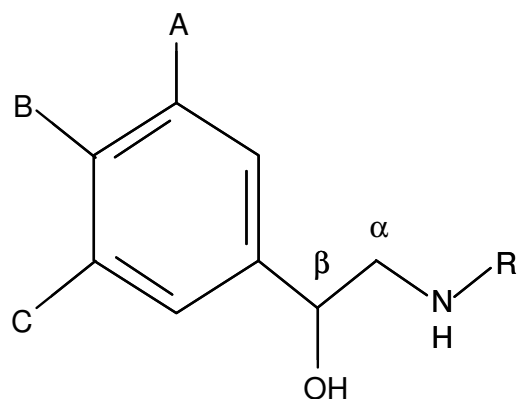
adrenérgicos de la musculatura del tracto bronqueal, causando relajación y dilatación de las vías respiratorias, y así aliviar el asma. También tienen interés, los que poseen especificidad relativa sobre la función cardiovascular, que actúan sobre el ritmo cardíaco, la contractibilidad o la presión sanguínea.

Es necesario disponer de los agonistas en forma apropiada para que los receptores no permanezcan activados. La norepinefrina y la epinefrina son desactivadas por la enzima catecol-o-metil transferasa, que metila el grupo hidróxido del anillo catecol, y por la monoamina oxidasa, una enzima que desamina el ligando. Luego de ser liberado por las terminales nerviosas simpáticas, la norepinefrina puede ser reabsorbida por mecanismos específicos para disminuir la concentración en el sitio efector (Mersmann, 1989a; Hoffman y Lefkowitz, 1990; Landsberg y Young, 1992; Mersmann H.J. 1998).

#### **2.1.4 Estructura y propiedades químicas de los $\beta$ agonistas.**

Los agonistas  $\beta$  adrenérgicos ( $\beta$  agonistas) tienen una estructura general de feniletanolaminas. Para que un  $\beta$  agonista tenga actividad biológica, debe poseer un anillo aromático de seis átomos de carbono, substituido, un grupo hidroxilo en el carbono  $\beta$ , en conformación R, un nitrógeno cargado positivamente en la cadena etil amino lateral, y un substituyente voluminoso en el nitrógeno alifático para conferir especificidad por el receptor  $\beta$  (figura 2.1.4.i) (Carlström et al, 1973; Weiner, 1980). Estos elementos son comunes a todos los  $\beta$  agonistas feniletanolaminas, y con la excepción del grupo voluminoso en el nitrógeno alifático, son también comunes a los neurotransmisores adrenérgicos naturales: epinefrina y norepinefrina.

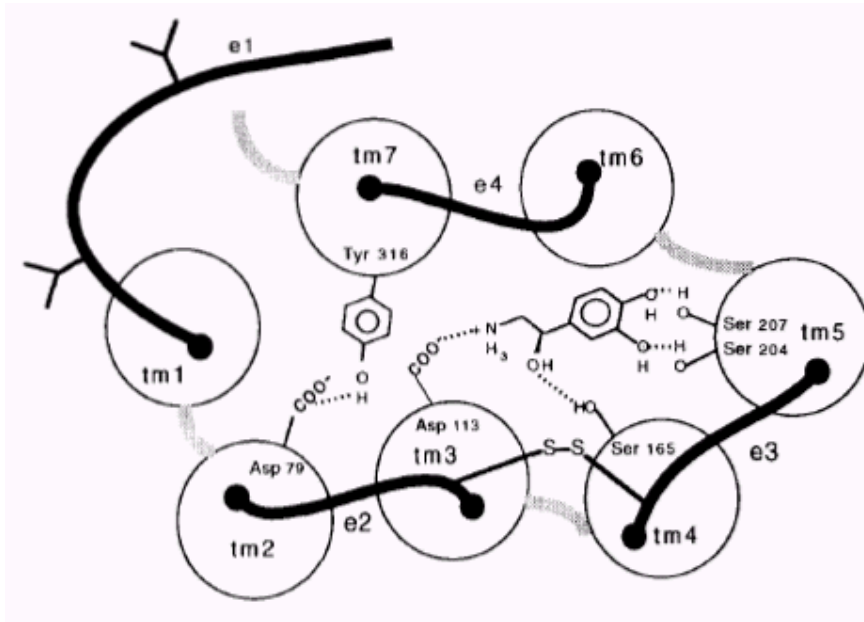




Sustitución Aromática			
A	B	C	Categoría
- H	-OH	-H	fenol
-OH	-H	-OH	resorcinol
-OH	-OH	-H	catecol
-CH <sub>2</sub> OH	-OH	-H	saligenin
-Cl	-NH <sub>2</sub>	-Cl	Clembuterol

Figura 2.1.4.i Estructura general de feniletanoaminas, agonistas  $\beta$  adrenérgicos, patrones de sustitución. En los agonistas  $\beta$  adrenérgicos el grupo R adyacente al nitrógeno alifático es siempre voluminoso, generalmente un grupo t-butilo, isopropilo, alquilfenil o alquil fenol. Se incluyen los sustituyentes del clembuterol. para su comparación.

En 1933, Easson and Stedman propusieron que los receptores  $\beta$  se unían a los  $\beta$  agonistas en tres puntos de la molécula: el grupo  $\beta$  hidroxilo, el nitrógeno alifático y el anillo aromático. Estudios subsecuentes indicaron que la omisión o sustitución de cualquiera de estas regiones producen efectos importantes en la unión al receptor y la actividad agonista (Ruffolo, 1991). Estudios utilizando mutagénesis dirigida a un sitio específico del receptor, han validado esta hipótesis, mostrando que los aminoácidos específicos en la estructura del receptor son los responsables de la interacción con la amina alifática cargada, los sustituyentes del anillo aromático y el grupo hidroxilo de los  $\beta$  agonistas (figura 2.1.4.ii) (Wallis, 1993; Hieble et al, 1995).



*Figura 2.1.4.ii Unión del agonista al receptor  $\beta$  adrenérgico. Vista esquemática de la interacción de la norepinefrina con varios residuos en el sitio de unión del receptor  $\beta$  adrenérgico (Strosberg et al, 1993).*

La actividad fisiológica de los  $\beta$  agonistas depende de su actividad específica en el sitio de unión al receptor, como de su velocidad de absorción, metabolismo y eliminación, y su distribución en los tejidos. Las características químicas que gobiernan la actividad del  $\beta$  agonista en el sitio del receptor, también pueden influir su absorción, distribución, metabolismo y eliminación. Luego, para determinar el mecanismo de acción, se deben considerar las propiedades farmacocinéticas de moléculas individuales.

Similarmente los agentes adrenérgicos feniletanolamias comparten cualidades estructurales pero no todas las feniletanolamias son  $\beta$  agonistas. Algunas de estas moléculas son  $\beta$  antagonistas, otras activan receptores  $\alpha$  y algunas son específicas para una subclase de receptor  $\alpha$  o  $\beta$ . Incluso entre agonistas  $\beta$  adrenérgicos de la misma

subfamilia, las características químicas y farmacocinéticas de un agonista en particular pueden diferir considerablemente con las de otro  $\beta$  agonista.

No obstante, como la interacción con el receptor, y por lo tanto la actividad biológica de una sustancia, está estrechamente relacionada a grupos reactivos de su estructura, vale la pena revisar las principales características de las moléculas de los  $\beta$  agonistas.

Las sustituciones en el anillo aromático influyen apreciablemente el tiempo de vida del  $\beta$  agonista dentro de un tejido de mamífero o ave, y la eficiencia del compuesto en el receptor. El patrón de la sustitución aromática es importante para la actividad biológica. Un grupo hidroxilo en una serina del receptor  $\beta$ , probablemente una por puente de hidrógeno, se une a los sustituyentes del carbono 3-(meta) o 4-(para) (posiciones A o B de la figura 2.1.4.i) (Wallis, 1993; Hieble et al, 1995). El patrón de la sustitución aromática es también determinante de la ruta metabólica de los  $\beta$  agonistas. Casi todos los agonistas poseen átomos de halógenos en los grupos aromáticos substituyendo grupos hidroxilo. El clenbuterol, mabuterol, y cimaterol (figura 2.1.4.iii) son ejemplos de este tipo de agonistas. El átomo de halógeno no inhibe la unión al receptor, pero evita la rápida desactivación metabólica que ocurre con el anillo hidroxilado. El mabuterol y el clenbuterol fueron especialmente diseñados para resistir la rápida degradación metabólica por enzimas que se activan por el grupo hidroxilo (Morgan, 1990).

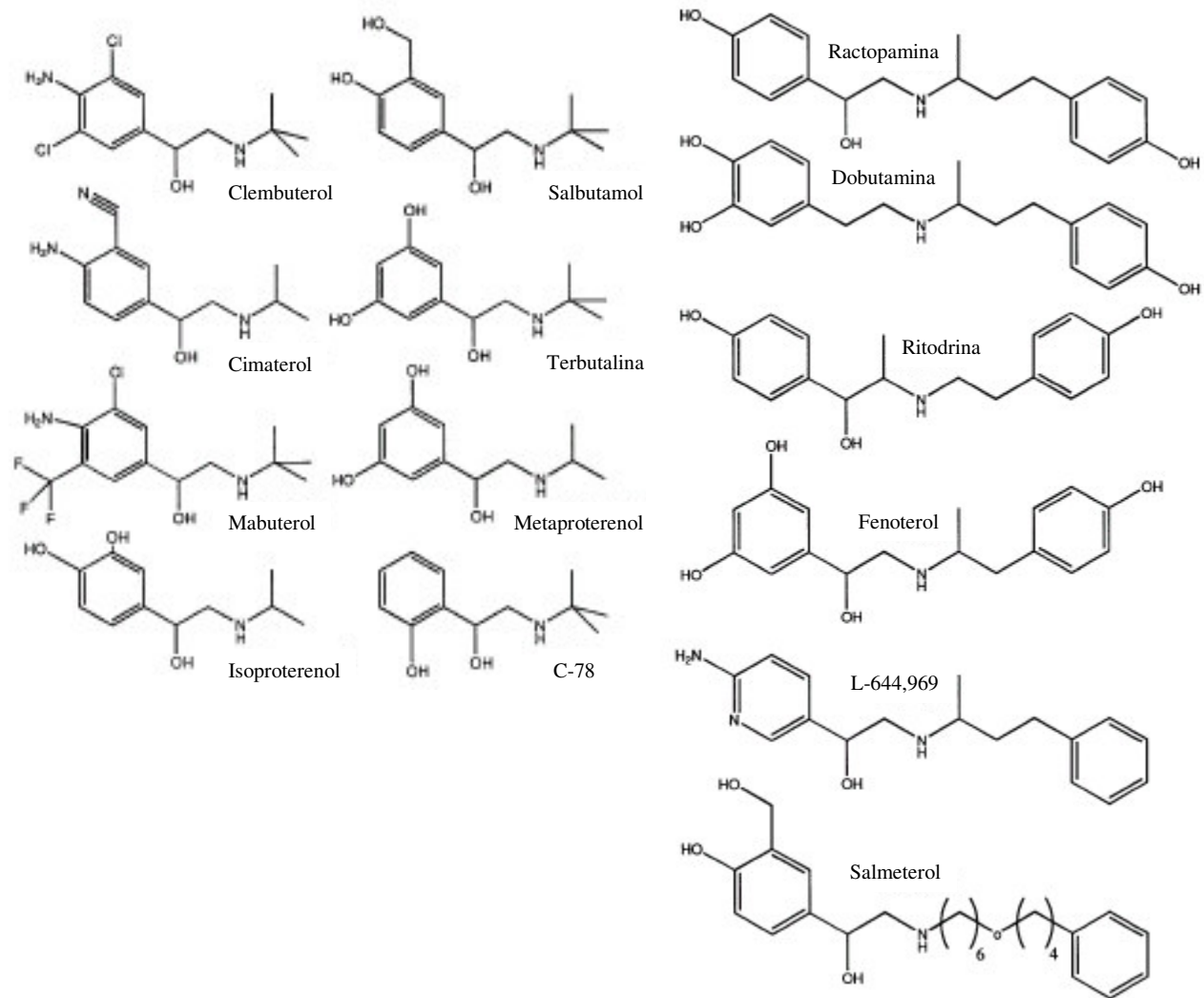


Figura 2.4.2.ii. Estructuras de agonistas  $\beta$  adrenérgicos.

La sustitución con halógenos aumenta la lipofilicidad del anillo aromático respecto de un  $\beta$  agonista hidroxilado. Tal vez gracias a esto el clenbuterol resulta más lipofílico que otros  $\beta$  agonistas (Nazzari, 1985; Witkamp y van Miert, 1992). Sin embargo, la dicloro anilina del clenbuterol se encuentra ligada a un grupo etanolamino. La amina alifática de los  $\beta$ -agonistas poseen un pKa alcalino, que las hace existir como especies protonada (ionizadas), en la sangre y otros tejidos a pH fisiológico 7,4 (Smith, 1998a).

El metabolismo y la disposición de los  $\beta$  agonistas en aves y mamíferos son dependientes de sus estructuras químicas. Así la potencia de un  $\beta$  agonista, por vía oral, puede diferir de la de otro por tres órdenes de magnitud. El clenbuterol, por ejemplo, posee una alta actividad por vía oral, por lo que ha sido el preferido para su uso en producción animal, resultando en carnes contaminadas que producen toxicidad aguda en los consumidores.

### **2.1.5 Residuos.**

Desde el comienzo de la década de los años 1980 se estudió la utilidad de los  $\beta$  agonistas en la dieta para incrementar la eficiencia de la alimentación del ganado y la producción de carne más magra. Sin embargo, la información sobre su farmacocinética, pasos de biotransformación y residualidad en tejidos se encuentra más dispersa. En general los  $\beta$  agonistas, que tienen anillos aromáticos halogenados son metabolizados por pasos de oxidación y conjugación a ácido glucurónico o sulfato, y tienen tiempos de vida media larga en plasma, mientras los  $\beta$  agonistas que tienen anillos aromáticos hidroxilados se metabolizan sólo por conjugación y exhiben vida media en plasma más

corta. Luego, los  $\beta$  agonistas con alta biodisponibilidad oral, larga vida media en plasma y relativa baja velocidad de eliminación tendrán alta potencia oral en humanos. Los residuos del uso ilegal de estos compuestos en tejidos comestibles representan un riesgo genuino en los consumidores. Contrariamente, los  $\beta$  agonistas con baja biodisponibilidad oral y cortos tiempos de vida media en plasma, se eliminan rápidamente, y sus residuos tienen baja potencia en humanos, y podrían no representar un riesgo real para los consumidores (Smith, 1998a).

## **2.2. Receptores $\beta$ -adrenérgicos.**

Los receptores son constituyentes específicos de las células, a los cuales una sustancia química puede unirse para iniciar una respuesta biológica. Ellos reconocen selectivamente el ligando al que se unen, para disparar una respuesta, un cambio en la función del tejido (Kunos, 1981).

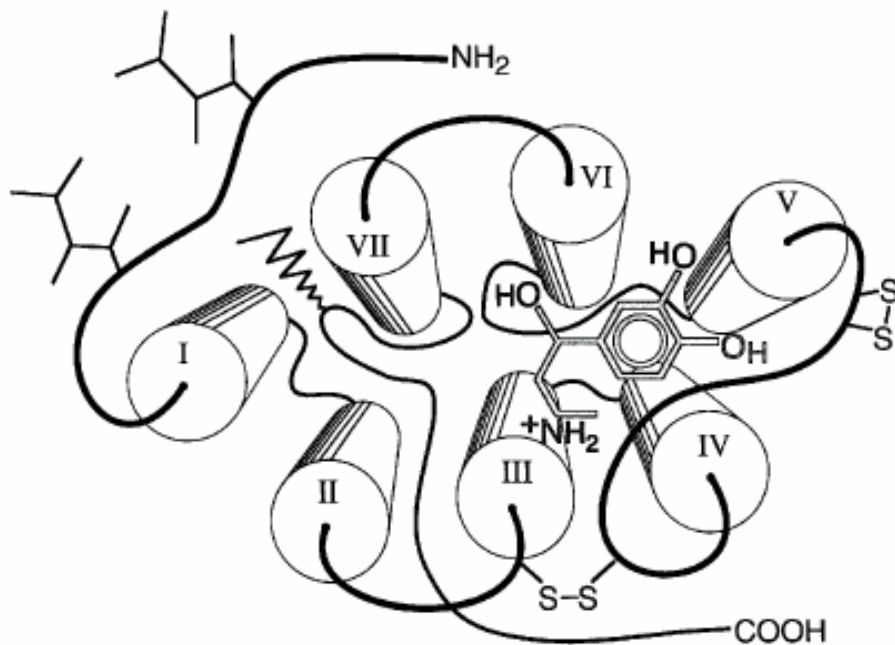
Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos están presentes en la superficie de casi todos los tipos de células de mamíferos. Estos receptores se estimulan fisiológicamente por el neurotransmisor norepinefrina y la hormona de la médula adrenal epinefrina. Entre estos receptores de la membrana celular, se distinguen dos tipos:  $\alpha$  y  $\beta$ , y varios subtipos, cada uno de ellos tiene una función típica.

Existen tres subtipos de receptores  $\beta$ :  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ . La respuesta fisiológica y farmacológica de una célula individual resultará de la proporción en que estos tres tipos de receptores se encuentren en dicha célula. La distribución de cada subtipo y

proporción en cada célula también varía entre tejidos y entre especies. Incluso existe variación de la cadena aminoacídica de un dado subtipo entre especies distintas. El conocimiento de los distintos subtipos presentes en cada tipo de celular, y el conocimiento de la estructura del receptor permitiría comprender la complejidad de las funciones fisiológicas reguladas por los receptores  $\beta$  adrenérgicos (Mersmann, 1998).

### **2.2.1 Estructura.**

Los receptores  $\beta$  adrenérgicos ( $\beta$ -AR ) poseen más de 400 aminoácidos en una cadena continua. El modelo de la estructura del receptor, indica: siete dominios transmembrana, relativamente hidrofóbicos, que anclarían el receptor en la membrana plasmática; cuatro porciones extracelulares fuera de la membrana, el dominio N terminal y tres vueltas que conectan los dominios transmembrana adyacentes; y cuatro porciones intracelulares en la parte interna de la membrana, otras tres vueltas y el extremo C terminal. El sitio de unión al ligando está en el centro de los siete dominios transmembrana e involucran aminoácidos de muchos de los dominios. El receptor interactúa con la proteína G por un sitio que ha sido localizado en porciones de las vueltas intracelulares 2, 3 y 4 (figura 2.2.1.i).



*Figura 2.2.1.i Estructura de receptores  $\beta$  adrenérgicos.* Proyección de la estructura de un receptor  $\beta$  adrenérgico: siete dominios transmembrana (cilindros), ligando unido (norepinefrina), porciones extracelulares (líneas llenas en la parte superior de los cilindros) y porciones intracelulares (líneas delgadas en la pared inferior de los cilindros) (Ostrowski et al, 1995).

Para evitar la activación indefinida del receptor  $\beta$ , los agonistas de deben mover del sitio de unión, por mecanismos de recaptación o degradación, o el receptor puede ser inactivado por varios otros mecanismos. Luego de la unión al agonista, el receptor  $\beta$  puede ser fosforilado por una quinasa específica (proteín kinasa A), en sitios de la vuelta intracelular 4, y así inactivarlo. El receptor puede también ser removido de la membrana plasmática durante condiciones de fosforilación crónica, y así disminuir la respuesta por reducción de los receptores disponibles (figura 2.2.1.ii).



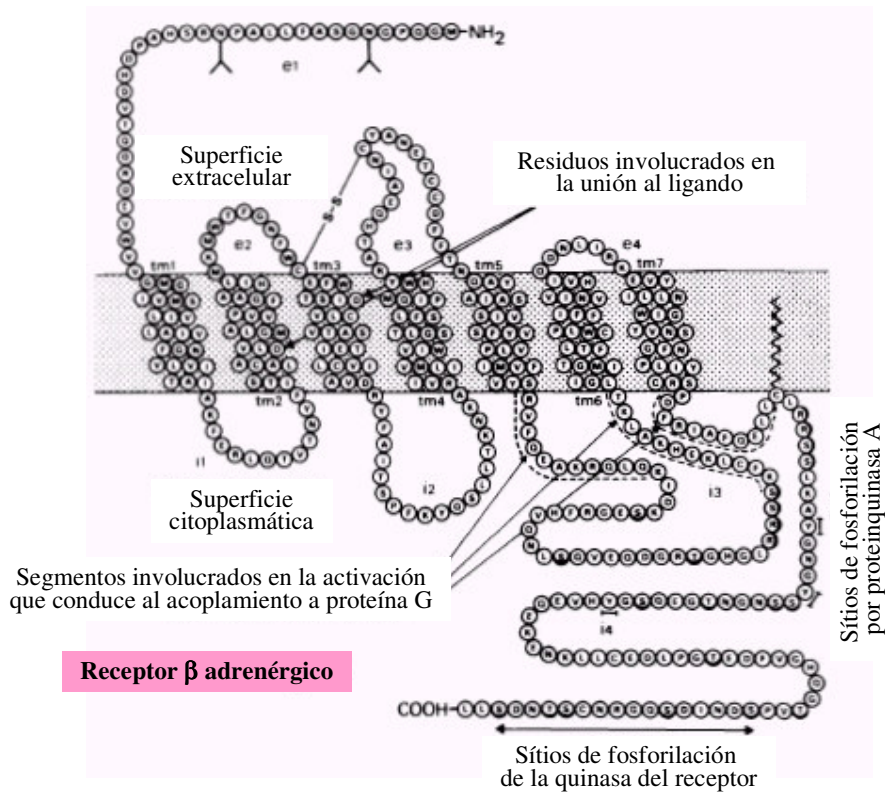


Figura 2.2.1.ii. Modelo de receptor  $\beta$  adrenérgico (Kobilka et al, 1987; Strosberg, 1993).

### 2.2.2 Subtipos.

**Clasificación funcional.** Entre los años 1940 a 1950, la investigación sistemática de las funciones fisiológicas estimuladas o inhibidas por norepinefrina, epinefrina y algunos otros compuestos conducen al concepto de: receptores  $\alpha$  adrenérgicos y  $\beta$  adrenérgicos. Norepinefrina y epinefrina estimulan ambos tipos de receptores, pero la epinefrina es más potente que la norepinefrina, estimula a concentraciones menores. Veinte años más

tarde, los receptores  $\beta$ , fueron subclasificados en  $\beta_1$  y  $\beta_2$ . La norepinefrina es más potente para los receptores  $\beta_1$  que para los  $\beta_2$ . Los esquemas de clasificación permiten una mayor comprensión de la complejidad de la función adrenérgica. También conduce al empleo de tejidos prototípicos, tejidos que predominantemente tienen sólo un subtipo de receptor adrenérgico, por lo cual se utilizan en estudios de clasificación de agonistas y antagonistas. Unos pocos compuestos resultan relativamente específicos para un subtipo de receptor. Éstos compuestos se usaron para clasificar subtipos de receptores  $\beta$  en otros tejidos y especies. Durante los años 1970 a 1980 aparecieron evidencias de un tercer subtipo de receptores:  $\beta_3$ .

***Clasificación por ligando de unión.*** En la década de 1970 se desarrolló la técnica para medir la unión de un ligando a receptores  $\beta$  (Williams and Lefkowitz, 1978). Esta técnica ha sido usada para complementar medidas de la respuesta fisiológica y para la determinar la farmacología y la clasificación del receptor. Para cada subtipo particular de receptor se designa un ligando, sobre la base de la alta afinidad de los receptores prototípicamente presentes en un tejido. De esta manera se clasifican receptores en otros tejidos. Esta técnica es más sencilla para clasificar receptores, pero no predice la función fisiológica porque no mide el acoplamiento de AMP cíclico a protein quinasa A, y no distingue entre agonistas y antagonistas. Por lo tanto, aún se requiere de una aproximación fisiológica para comprender la función de un ligando; en muchos casos se ha medido la activación de adenilato ciclasa como expresión de la función fisiológica (Hoffman y Lefkowitz, 1990; Landsberg y Young, 1992; Mersmann, 1995).

Los experimentos de unión ligando-receptor, que usan un gran número de concentraciones de ligando, pueden generar evidencias de múltiples sitios de unión.

Los tejidos prototípicos poseen un alto porcentaje de un subtipo particular de receptor  $\beta$ , sin embargo la mayoría de los tejidos poseen más de un subtipo. En una dada especie, la proporción de receptores  $\beta_1$  a  $\beta_2$  es diferente en cada tipo de células o tejidos.

La proporción de los dos subtipos en un mismo tejido se pueden determinar por experimentos de unión competitiva al receptor, con un antagonista específico de  $\beta_1$  u otro específico de  $\beta_2$ . Con el antagonista de  $\beta_1$  se determinan sitios de alta afinidad ( $K_H$ ) y sitios de baja afinidad ( $K_L$ ), con resultados similares en todos los tejidos. Por ello este antagonista se designa específico para receptores  $\beta_1$ , basándose en experimentos hechos con tejidos prototípicos; y los sitios de alta afinidad serán designados  $\beta_1$ . Cuando se utiliza el antagonista  $\beta_2$ , éste detecta dos sitios de unión, unos de alta afinidad  $K_H$ , que serán designados  $\beta_2$ , y otros de baja afinidad  $K_L$ .

***Receptor adrenérgico  $\beta_3$ .*** Comenzando en la década de 1970 y hasta entrada la década de 1980, se acumuló evidencia de estudios farmacológicos en adipocitos de ratas, que indicaron un tipo diferente de receptores en este tejido. Este subtipo atípico de receptores  $\beta$  también se encontró en algunas regiones del intestino y en músculo cardíaco y esquelético. El receptor  $\beta_3$  es farmacológicamente distinto a los otros dos subtipos, y su estructura en la cuarta vuelta intracelular provee pocos sitios para inactivación por fosforilación. Existen agonistas y antagonistas específicos para los receptores  $\beta_3$ . Además muchos agonistas para  $\beta_1$  y  $\beta_2$  son parcial o en algunos casos totalmente agonistas de los  $\beta_3$  (Arch and Kaumann, 1993; Howe, 1993).

***Clasificación por biología molecular.*** A mediados de los años '80, por técnicas de biología molecular se verificó la existencia de subtipos individuales de receptores  $\beta$  distintos, con ARN transcriptos, tamaños de proteínas y secuencias aminoacídicas únicas y distinguibles. Si bien han sido secuenciados sólo para unas pocas especies, los resultados indican que los tres subtipos de receptores poseen aproximadamente el 50% de homología en la secuencia aminoacídica dentro de una misma especie, mientras un subtipo de receptor  $\beta$  individual tiene 75% o más de homología a través de las especies. Como la sección del receptor unida a la membrana es difícil de aislar e inestable, y existe tanta similitud estructural, el empleo de la estructura proteica es limitado para la elucidación de la función del receptor (Strosberg, 1992; Hall et al, 1993; Pietri-Rouxel and Strosberg, 1995).

***Modulación de los distintos subtipos.*** Existen numerosos ejemplos de desdiferenciación y desensibilización de los tres subtipos de receptores  $\beta$  adrenérgicos por varios mecanismos. Los receptores  $\beta_3$  son generalmente menos sensibles a la desensibilización que los otros dos subtipos, y existe alguna evidencia sobre la mayor facilidad de los  $\beta_2$  para desensibilizarse que los receptores  $\beta_1$ .

La población de los subtipos de receptores puede cambiar con el paso de diferenciación de una célula o con el medio hormonal al que esté expuesto la célula. Un ejemplo claro de este fenómeno se observa en la línea celular clonal 3T3-F442A, en cultivo. Estas células tipo fibroblásticas se multiplican en cultivo y luego de confluencia se diferencian a adipocitos en presencia de componentes adecuados del medio. En las células indiferenciadas existe aproximadamente un 90% de receptores  $\beta_1$ , algunos  $\beta_2$  y

ningún  $\beta_3$ , por otro lado una vez diferenciadas en adipocitos poseen aproximadamente 90% de receptores  $\beta_3$ , algunos  $\beta_1$ , y muy pocos  $\beta_2$ . Si el medio de diferenciación contiene dexametasona las células tendrán más de un 80% de  $\beta_2$  (Feve et al, 1991; Strosberg, 1992).

***Distribución celular de subtipos de receptores  $\beta$  adrenérgicos.*** El conocimiento de la proporción de los receptores  $\beta$  adrenérgicos presentes en un tipo celular particular en una especie dada, puede ayudar a predecir la respuesta de ese tejido a un agonista en particular. En relación a las principales especies que se crían para producción de carnes existe sólo un conocimiento limitado sobre los subtipos de receptores  $\beta$  en músculo esquelético o en adipocitos, los cuales son los tejidos primarios que responden a los agonistas de actividad por vía oral (Mersmann, 1995).

En ganado bovino, los estudios de unión a ligandos sugieren que predominan los receptores  $\beta_2$  en músculo esquelético y adipocitos (Sillence y Matthew, 1994), mientras otros investigadores sugieren que existe aproximadamente un 75% de  $\beta_2$  y un 25% de  $\beta_1$  en adipocitos (Van Liefde et al, 1994). Por análisis de saturación se encontraron sólo sitios receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , sin distinguir entre ellos (Sillence y Matthews, 1994; Houseknecht et al, 1995). Hasta este momento no hay evidencia de receptores  $\beta_3$  en adipocitos bovinos (Van Liefde et al, 1994). En ovinos, estudios competitivos de unión al ligando indicaron predominantemente receptores  $\beta_2$ , en adipocitos (Bowen et al, 1992). En estudios con bovinos y ovinos, la información es clara pero limitada, porque cada estudio usa sólo un ligando  $\beta_1$  y uno  $\beta_2$ . Por lo tanto la información no excluye la posibilidad de que los resultados representen la afinidad de estos dos componentes por

el receptor específico de la especie presente en adipocitos, más que la detección de receptores  $\beta_1$  o  $\beta_2$ .

Los distintos subtipos de receptores  $\beta$  adrenérgicos pueden ser regulados transcripcionalmente o a través de desensibilización. En adipocitos porcinos están presentes ARNm de los tres subtipos de receptores (McNeel and Mersmann, 1995), pero esta información es sólo cualitativa y no da idea de la proporción de la expresión de cada subtipo. La ausencia de una actividad farmacológica distintiva (medidas de lipólisis o de unión a un ligando), entre subtipos de receptores y la ausencia de anticuerpos específicos para ellos impide obtener conclusiones sobre la expresión funcional de cada subtipo de receptor  $\beta$  en adipocitos porcinos.

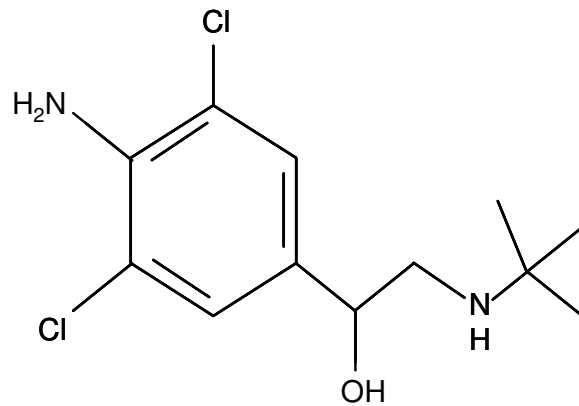
***Mecanismos de activación.*** Cualquier mecanismo predicho para los efectos de los receptores  $\beta$  adrenérgicos debe comenzar con la activación del receptor y continuar a través de proteínas G a la activación de adenilato ciclasa para producir AMP cíclico. La distribución casi universal de receptores  $\beta$  adrenérgicos en todos los tipos de células de mamíferos, provee la posibilidad de mecanismos complejos de acción dependiendo de la población de los distintos subtipos expresados en las células y la distribución de los agonistas en los tejidos. El mecanismo de un  $\beta$  agonista *in vivo* puede estar mezclado con efectos resultantes de eventos secundarios, causados por respuestas fisiológicas u hormonales de los tejidos, al agonista administrado. Sin embargo, el efecto de un  $\beta$  agonista es casi con certeza el resultado de la activación del receptor.

Debido a la similitud en la estructura de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ , es posible que exista alguna activación o inactivación de receptores  $\alpha$  por un  $\beta$  agonista particular. Esta posibilidad no puede ser descartada completamente cuando se analizan los mecanismos *in vivo*, pero son menos posibles si se prueba que la actividad del  $\beta$  agonista es negativa para los receptores  $\alpha$  *in vitro*.

También resulta posible que un  $\beta$ -agonista en una especie actúe como antagonista en otras especies o tejidos, por ejemplo puede unirse al receptor, pero no activar la adenilato ciclasa (Mills y Mersmann, 1995).

### 2.3. Clembuterol.

Ciertos compuestos sintéticos con propiedades químicas y farmacológicas similares a la adrenalina (epinefrina), producen en animales tratados un aumento de la proporción de proteínas y reducción de la grasa. El clembuterol (4-amino-*R*-(*t*-butilamino) metil-3,5-dicloro bencil alcohol) es un ejemplo de  $\beta$  agonista que posee propiedades de alterar la composición corporal en numerosas especies animales (figura 2.3.i).



Clembuterol  
Mr: 277,19

*Figura 2.3.i. Estructura del clembuterol.*

El clembuterol fue desarrollado originariamente para uso terapéutico en tratamientos de enfermedades bronquiales y como tocolítico. Ejerce su actividad por vía oral y sus efectos positivos en el crecimiento del ganado fue descrito inicialmente en 1984 (Baker et al, 1984; Dalrymple et al, 1984; Ricks et al, 1984). Causa una reducción de la grasa corporal y promueve el crecimiento muscular. Para este propósito se requieren dosis de clembuterol 5 a 10 veces mayores que las requeridas para su uso terapéutico



(Miller et al, 1988), por lo que sus residuos pueden quedar en los tejidos comestibles y representar un riesgo para la salud de los consumidores (Meyer y Rinke, 1991).

### **2.3.1 Efecto en animales.**

El efecto del clenbuterol sobre el metabolismo proteico ha sido estudiado exhaustivamente. Muchos de estos estudios muestran que la hipertrofia sobre las células musculares es debida a la disminución en la degradación, más que un incremento de la síntesis de proteínas (Beermann et al, 1986; Bohorov et al, 1987; Rogers y Fazen, 1991). Sin embargo, en otros trabajos se ha reportado el incremento en la síntesis de proteínas (Emery et al, 1984; Bergen et al, 1989; Cleys et al, 1989). Ambos mecanismo probablemente contribuyan al efecto anabólico (Maltin et al. 1987, 1989). Por otro lado, la reducción de la grasa corporal por el tratamiento con clenbuterol se debe al aumento de la lipólisis (Emery et al, 1984; Rothwell y Stock, 1987). Belfrage (1985) mostró incrementos en lipólisis y disminución de la lipogénesis en tejidos adiposos de mamíferos. El incremento en la lipólisis probablemente explique el efecto termogénico del clenbuterol (Emery et al, 1984; Rothwell y Stock, 1987). La mayoría de los estudios indican un efecto directo del clenbuterol en los tejidos estudiados (William et al, 1984; Maltin et al, 1987; Festoff et al, 1987; Cardoso y Stock, 1998). Finalmente, el clenbuterol estimula el crecimiento muscular en animales, en varias condiciones experimentales (Maltin et al, 1987; Zeman et al, 1987; Rothwell y Stock, 1988), y además también influye sobre la formación miofibrilar en fetos (Maltin et al, 1990; McMillan et al, 1990).

### 2.3.2 Efectos en producción animal y en las carnes.

La velocidad del crecimiento y la eficiencia de la alimentación son variables importantes en producción animal. Debido a la demanda de consumidores por carnes más magras, cobra interés la composición de la canal, menos grasa y más músculo. En varias especies, la administración de clenbuterol mejora estas dos características, y al mismo tiempo altera la composición de la canal reduciendo la grasa corporal y aumentando la deposición de carne magra (Beermann et al, 1985; Allen et al, 1987; Merkel, 1988; Muir, 1988). Sin embargo, los  $\beta$ -agonistas producen un efecto negativo sobre la calidad de la carne, como la pérdida de terneza, bovinos, ovinos, porcinos y en músculos de aves (Berge et al, 1990; Fabry et al, 1990; Fiems et al, 1990; Hanrahan et al, 1987; Beermann et al, 1989; Kretchmar et al, 1990; Koohmaraie y Shackelford, 1991; Jones et al, 1985; Merkel, 1988; Warriss et al, 1991; Morgan et al, 1988). Respecto de otras características de calidad de las carnes, la información es más dispersa y los resultados son a veces contradictorios. Algunos estudios indicaron un incremento en el “drip loss” (pérdida de agua por goteo) del músculo *longissimus dorsi* en bovinos (Allen et al, 1987; Fabry et al, 1990), que se contradicen con otros que no observaron tal efecto (Fiems et al, 1990). También se han reportado leves pérdidas por cocción del mismo músculo en bovinos tratados con  $\beta$ -agonistas (Fiems et al, 1990), aunque otros autores no confirman estos resultados (Berge et al, 1990; Fabry, 1990). La administración de  $\beta$  agonistas no afectaría el color de la carne bovina (Berge et al, 1990; Fiems et al, 1990), pero puede causar una disminución del brillo (Berge et al, 1990). Por otro lado, en porcinos se han reportado cambios de coloración de la carne (Warriss et al, 1990; Dazzi et al, 1991), por lo cual se podría concluir que el efecto sobre el color sería dependiente de la especie animal (Geesink et al. 1993).

### 2.3.3 Metabolismo de clenbuterol.

Si bien los efectos del clenbuterol en el ganado son muy conocidos, la información sobre su farmacocinética y biotransformaciones en el animal permanece dispersa. Más aún, la edad, el sexo, la dieta y la interacción con otras drogas pueden alterar su actividad, los metabolitos y la biodistribución de sus residuos en el animal.

Hasta donde sabemos, no existen reportes que describan el metabolismo y la distribución total del clenbuterol y sus metabolitos en el ganado. Existen sin embargo numerosos trabajos que describen la distribución del clenbuterol en los tejidos de varias especies (Meyer and Rinke, 1991; Elliott et al, 1993; Malucelli et al, 1994), pero la relación entre el total de residuos (clenbuterol y metabolitos) y el clenbuterol en tejidos comestibles se desconoce. Esto es de importancia pues los metabolitos de una droga pueden ser tan o más activos que la droga madre (Weber, 1992; Woodward, 1992).

De estudios *in vivo* se sabe que la droga madre representa solo el 43% del total de los residuos de clenbuterol en el hígado y el 40% en orina. Metabolitos de clenbuterol, que guarda similitud estructural con el clenbuterol, han mostrado actividad  $\beta$  agonista (Horiba et al, 1984). Por lo tanto, es posible que metabolitos del clenbuterol puedan contribuir a la toxicidad de la droga (Smith y Paulson, 1997, Smith, 1998a).

El estudio en especies de laboratorio mostró que  $\beta$  agonistas conjugados con grupos glucurónidos eran eliminados por vía biliar, sugiriendo que el hígado juega un

importante rol en la formación de dichos conjugados. Así también, enzimas hepáticas inmovilizadas fueron utilizadas para la síntesis de conjugados de  $\beta$  agonistas con ácido glucurónico (Smith, 1998b, Smith y Paulson, 1997).

Importantes estudios *in vitro* en hepatocitos de distintas especies ayudaron a describir los principales pasos metabólicos del clenbuterol en ratas y bovinos. Por estudios en microsomas y cortes de hígados se determinó que la 4-N-oxidación de la amina primaria del clenbuterol era una vía metabólica importante en ambas especies. Este camino metabólico fue luego confirmado por experimentos *in vivo* (Zalko et al, 1997). La toxicidad de estos metabolitos estaría relacionada con su estado de oxidación, lo que justifica la importancia de determinar su estructura (Zalko et al, 1998).

#### **2.3.4 Efectos adversos.**

Dentro del grupo de los receptores adrenérgicos se distinguen principalmente tres subgrupos ( $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ). Se considera que la lipólisis y la estimulación cardíaca están asociados con la actividad de los receptores  $\beta_1$ , mientras la broncodilatación y la actividad como vasodepresor se asocian con los  $\beta_2$ . El clenbuterol exhibe ambos efectos  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , pero posee una mayor afinidad por los receptores  $\beta_2$ .

El clenbuterol como potente broncodilatador se utilizó inicialmente para tratar broncoespasmos y aliviar enfermedades crónicas de obstrucción pulmonar en caballos (Sasse y Hajer, 1978). Sin embargo, en dosis mayores a las terapéuticas, la administración crónica de clenbuterol demostró una respuesta anabolizante directa sobre las proteínas musculares en una variedad de especies (Claeys et al, 1989;

Dalrymple et al, 1984; MacLennan et al, 1989; Maltin et al, 1989; Ricks et al, 1994). Esto llevó a que se utilizara para incrementar la masa muscular, el peso corporal y la velocidad de síntesis de proteínas (MacLennan et al, 1989).

Cuando esta droga se utiliza con fines terapéuticos, la baja dosis requerida (0,8 ug/kg de peso corporal) y la selectividad del clenbuterol por los receptores  $\beta_2$  asegura que los efectos colaterales de la actividad de los receptores  $\beta_1$  (por ejemplo: taquicardia) sea mínima. Sin embargo, cuando se utiliza en altas concentraciones (aproximadamente 10 veces mayores que la dosis terapéutica), el clenbuterol produce otros efectos como la movilización de depósitos de grasa y aumento de la deposición de proteínas. Aunque este tipo de tratamientos produce un marcado aumento de la rentabilidad en la producción pecuaria, acumula residuos de clenbuterol en tejidos comestibles.

El empleo de  $\beta$ -agonistas como promotor del crecimiento en producción animal está prohibido en Argentina, la Unión Europea, los Estados Unidos y la mayoría de los países. El riesgo para la salud los consumidores de carnes, está asociado con el uso de clenbuterol como promotor del crecimiento en producción animal. Sin embargo, en Argentina, este  $\beta_2$  agonista, está permitido para su uso en afecciones respiratorias en humanos, y esto se extiende a la medicina veterinaria, en bovinos y equinos, como broncodilatador y tocolítico.

El clenbuterol es también, frecuentemente usado abusivamente por atletas, especialmente mujeres, pues su efecto de reparto de nutrientes no está asociado con la actividad androgénica de los esteroides (Prather I.D., 1995, Kearns et al 2001).

El uso ilegal, por no estar controlado, produce que los niveles de dosis sean tan grandes que los residuos de estos tratamientos representen un serio riesgo para la salud humana, especialmente en poblaciones sensibles, con problemas cardíacos. Los residuos presentes en tejidos de terneros tratados ilegalmente con clenbuterol, han causado casos agudos de intoxicaciones, en particular, a través del consumo de hígados contaminados. Ejemplos de intoxicaciones por esta causa son los casos en Francia y España (Martínez-Navarro, 1990; Pulce et al, 1991; Salleras et al, 1995; Sauer et al, 1993; Martínez et al, 1992).

La propensión a la toxicosis en individuos que consumieron productos animales contaminados, se relaciona con la potencia oral del clenbuterol. En la tabla 2.3.4.i se indican las dosis que se requiere de un  $\beta$ -agonista para tener eficacia en humanos por vía oral.

Tabla 2.3.4.i. Dosis terapéuticas de agonista  $\beta$  adrenérgicos usados en humanos como broncodilatadores o tocolíticos.

Compuesto	Dosis Oral <sup>a</sup>		Dosis por día	NOEL	
	$\mu\text{g}$	$\mu\text{g}/\text{kg PC}^b$			
<b>Clembuterol</b>	10-20	0,16-0,33	2	2,5	Prather et al, 1995
<b>Fenoterol</b>	2500-5000	42-83	3	ND	Heel et a.,1978
<b>Salbutamol</b>	2000-4000	33-67	3-4	ND	Price y Clissold, 1989
<b>Terbutalina</b>	5000	83	3	ND	PDR, 1995

<sup>a</sup> Única dosis; la mayoría de los  $\beta$  agonistas requieren de múltiples dosis durante 24hs.

<sup>b</sup> La dosis sobre el peso corporal (PC) fue realizada sobre la base de 60 kg.

Una dosis tan baja como 10mg (masa total, no 10 mg/kg de masa corporal) de clembuterol es un broncodilatador efectivo, aunque para salbutamol o terbutalin, la dosis efectiva oral es de 2000 a 5000mg (masa total). En una terapia continua, el clembuterol sólo necesita ser administrado dos veces al día, mientras otros  $\beta$ -agonistas debieran ser administrados 3 a 12 veces diarias. Existen obvias diferencias entre las potencias orales de los  $\beta$ -agonistas. De acuerdo a esto, la mayor dosis de clembuterol que no producirá efecto observable en humanos, (NOEL, del inglés: no observable effect level) diferirá de otros  $\beta$ -agonistas en la misma magnitud que su potencia oral. Esto trae importantes implicaciones. La dosis oral NOEL del clembuterol en humanos es 2,5 mg de masa total (Boenisch y Quirke, 1992). La determinación racional del NOEL para un dado  $\beta$ -agonista en humanos se utiliza por agencias de control, para calcular la ingesta diaria aceptable (ADI, del inglés: acceptable daily intake), del residuo de una droga. El ADI (NOEL dividido por un factor de seguridad apropiado), representa la cantidad total de residuos que un adulto modelo (60 kg), puede consumir diariamente durante su vida sin sufrir ningún efecto apreciable (Guyer y Miller, 1994).

La concentración segura en un tejido para un residuo químico se calcula a partir del ADI, considerando el consumo promedio de ese tejido animal. Así se determina el límite máximo nivel de residuos (LMR). Por lo tanto el máximo nivel permitido del residuo de una droga en cualquier tejido comestible, es directamente dependiente del NOEL del compuesto. Para clenbuterol el NOEL en humanos es de 2,5mg, esto significa que una persona podría ingerir 2,5 mg por día de clenbuterol sin efectos observables (0,04mg/kg/día para un ser humano de 60kg). El ADI se calcula con un factor de seguridad tomando en cuenta la variabilidad entre humanos (Boenisch y Quirke, 1992), y para el clenbuterol se aplica un valor de 10 porque el NOEL fue calculado en humanos no en animales de laboratorio (Smith, 1998a).

Consecuentemente, los  $\beta$ -agonistas se comenzaron a estudiar intensamente como potenciales toxinas en suplementos alimentarios, y en la legislación europea fueron prohibidos para su uso como agentes mejoradores de la carne (carne más magra). La resistencia al uso de estas sustancias en producción animal se extendió a otros países, incluyendo la Argentina, (Witkamp y van Miert, 1992; Witkamp, 1996). Sin embargo, fue reconocido que la prohibición total del uso de anabólicos en Europa provocó nuevos problemas de seguridad alimentaria, más que resolverlos, entre otras causas por la generación de un mercado negro de estos productos (Meyer, 1991). Luego, la prohibición europea de los agonistas  $\beta$  adrenérgicos no eliminó su uso ilegal (Kuiper et al, 1996), mientras en Estados Unidos y otros países como Argentina se detectó el abuso de estas drogas (Mitchell, 1996; SENASA; 2001).



### **2.3.5 Análisis de residuos.**

Para reducir el riesgo de contaminaciones de alimentos con clenbuterol, como con otros residuos de tratamientos anabolizantes en producción animal, se realizan planes de control que monitorean residuos de estas drogas veterinarias en distintos tejidos, principalmente: orina, sangre e hígado.

En este aspecto, el estudio de los factores que determinan la formación de residuos, y la detección y cuantificación de los mismos, resulta ser de importancia fundamental para la estimación del riesgo asociado. La identificación de potenciales efectos adversos o peligros, y la determinación de la cantidad y posibles medios de exposición humana a sustancias químicas, constituyen la base para la estimación del riesgo y conduce al establecimiento de límites máximos de residuos (LMR). Estos límites máximos están siendo revisados continuamente de acuerdo con la introducción de nuevas técnicas de análisis que detectan cantidades cada vez menores; nuevas matrices de análisis; mayor conocimientos sobre los mecanismos de acumulación y metabolismo de las sustancias; y la introducción de nuevas tecnologías de producción que aporten nuevos riesgos potenciales.

Debido a la rápida eliminación de clenbuterol de estas matrices, se han buscado otros órganos donde se acumule. De acuerdo con Meyer y Rinke (1991) el ojo parece ser el órgano de mayor acumulación en el animal, y Malucelli et al. (1994) encontró aún una mayor acumulación en plumas y en otros tejidos. Dursch y Meyer (1993) compararon nueve capas epiteliales de la retina y la coroides más pigmentadas, lo que resultó en que el tejido de mayor acumulación de clenbuterol era el epitelio más pigmentado de la

coroides, por lo que postularon que el clenbuterol sería acumulado por la melanina (Durschz et al,1995).

Actualmente en Argentina, todo uso de promotores del crecimiento están prohibidos en producción animal (Resolución N° 447, 2004), y los residuos de clenbuterol deben ser analizados en la producción pecuaria. Para esto están aprobadas técnicas de radioinmunoensayo (RIA) y enzimoimmunoensayo (EIA) como métodos de monitoreo y cromatografía gaseosa por espectroscopia de masas como método de confirmación. Los límites de detección requeridos para los ensayos dependen de la matriz de análisis: en ojo e hígado 0,5ng/g, mientras que en pelo 4ng/g de clenbuterol (Plan CREHA 2007, SENASA).

Técnicas confirmatorias, como ser las cromatografías acoplada a espectroscopia de masas, resultan más selectivas, pero requieren equipamiento aún costoso. Esto resulta en una seria limitación en la capacidad de análisis. Las técnicas de inmunoensayo (RIA y EIA), son más sensibles, pero menos selectivas ya que pueden producir falsos positivos derivados de reacciones cruzadas del anticuerpo con interferencias de la matriz. Por esta razón estas últimas están recomendadas con fines de monitoreo.

### **3. Desarrollo de enzimoimmunoensayos para clenbuterol.**

Los métodos fisicoquímicos usualmente utilizados para detección de clenbuterol, como la cromatografía líquida, no pueden alcanzar los límites de detección requeridos acordados para el análisis de residuos. Los inmunoensayos sin embargo, ofrecen el nivel de sensibilidad necesario. Dentro de los inmunoensayos que se utilizan comúnmente se distingue el radioinmunoensayo, cuya señal se produce por un isótopo radioactivo. Éstos tienen el inconveniente de que no siempre se dispone de la molécula marcada, y que para poder realizar el ensayo se requiere de una capacitación y habilitación especial para manejo de material radiactivo por parte de la Autoridad Regulatoria Nuclear. El enzimoimmunoensayo es en este sentido es más apropiado, pues carece de dichas complicaciones.

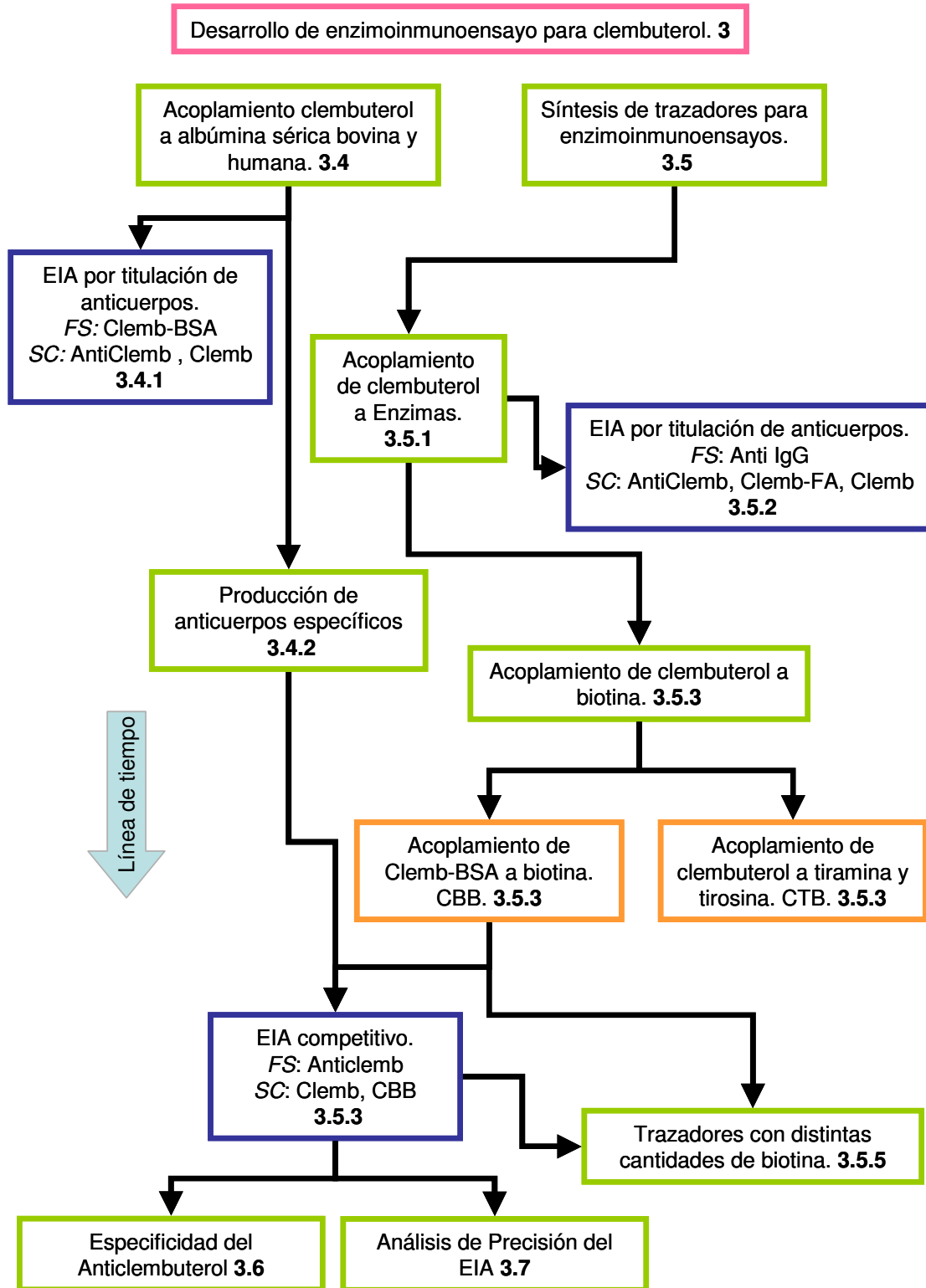
Los enzimoimmunoensayos están basados en dos importantes fenómenos biológicos: la extraordinaria capacidad de los anticuerpos para discriminar entre compuestos, con una afinidad definida, y el poder catalítico y la especificidad de las enzimas que permite su fácil detectabilidad.

Todas estas técnicas requieren extracción y concentración de la muestra previa al análisis, y debido a la posibilidad de falsos positivos deben confirmarse los resultados por técnicas de espectroscopia de masas. Dicha técnica es aún muy cara para análisis de rutina y su sensibilidad no es todavía mayor a las técnicas inmunológicas, por lo que requieren de mucha cantidad de muestra.

### **3.1. Objetivos del capítulo.**

El primer objetivo del trabajo es obtener un enzimoimmunoensayo para clenbuterol, con características de sensibilidad, selectividad y robustez tales que permitan su aplicación en el análisis de residuos.

### 3.2. Desarrollo experimental de las investigaciones.



FS: fase sólida; SC: solución.

### 3.3. Materiales y métodos.

***Diazotación de clenbuterol para la obtención de inmunógenos.*** La derivatización del clenbuterol se realizó por una técnica descrita por Yamamoto e Iwata (1982). Se obtuvo el grupo diazo mediante tratamiento de la amina aromática del clenbuterol con nitrito de sodio en medio ácido. Tres mg de  $\text{NaNO}_3$  en 200 $\mu\text{l}$  de agua se gotearon sobre 3mg de clenbuterol en 400 $\mu\text{l}$  de agua y 100 $\mu\text{l}$  de HCl 1N, en obscuridad a 0°C, con agitación. Luego 30 minutos de reacción se eliminó el exceso de iones  $\text{NO}_2^-$  por agregado de 7mg de sulfamato de amonio en 140 $\mu\text{l}$  de agua, hasta el fin de la emisión de burbujas. La presencia del grupo diazo en el clenbuterol se detectó por reacción colorimétrica con 50 $\mu\text{l}$  de dimetilnilina y 10 $\mu\text{l}$  de reacción, lo que produce coloración amarilla.

***Acoplamiento clenbuterol-albúmina sérica bovina y humana.*** La obtención de inmunógenos de alto peso molecular se realizó mediante acoplamiento del diazoderivado de clenbuterol a albúmina sérica bovina (BSA). 150 $\mu\text{l}$  del derivado diazoico de clenbuterol se goteó sobre 40, 6, 3 y 0 mg de BSA en 200 $\mu\text{l}$  de buffer fosfato de sodio 0,1M pH= 7,5; se ajustó el pH a 7 con NaOH 1N (aproximadamente 15 $\mu\text{l}$ ) y se dejó reaccionar durante toda la noche, a 5°C en obscuridad. El clenbuterol no acoplado se separó por una centrifugación a 5000xg, con membranas de corte de alto peso molecular (30.000 masa molar de corte, Centricom, YM-30 celulosa regenerada), que retuvo la proteína. El filtrado se analizó por HPLC-UV 280nm, con columna de C18 (Vydac 5 $\mu\text{m}$  150x4.5mm) y fase móvil de acetonitrilo y buffer fosfato de potasio 20mM pH= 4,4, en proporción (1:4) y flujo de 1ml/min. La relación óptima para la reacción de acoplamiento se estableció como aquella a la cual el diazo-clenbuterol

libre se reducía significativamente: 0,5mg diazo-clembuterol por 6mg de BSA. Con esta relación de concentraciones se acopló albúmina sérica humana (HSA) a clembuterol para su uso como de antígenos.

***Acoplamiento de clembuterol a Tiramina y tirosina.*** Se repitió el procedimiento empleado para acoplamiento a BSA, tomando una relación molar aproximada, equivalente a la cantidad de tirosinas por molécula de BSA: 0,33mg de tirosina o 0,312mg de Tiramina, en 60µl de buffer fosfato 0,1M pH=7,5. A estas soluciones se les agregó 240µl del buffer de reacción y se les goteó 150µl del diazo derivado de clembuterol. El procedimiento se continuó como el acoplamiento a BSA, hasta el paso previo a la purificación por diálisis.

***Inmunización de animales y obtención de antisueros específicos.*** Se inocularon cuatro conejos criados en bioterio, con clembuterol-HSA, por vía intradérmica. Esto se realizó en grupos de a dos, con diferencia de 15 días. La primera dosis fue suministrada con adyuvante de Freund completo con el objetivo provocar una activación del sistema inmune. Los refuerzos o boosters siguientes fueron suministrados con adyuvante de Freund incompleto. Luego del quinto refuerzo se extrajeron 12 ml de sangre de uno de los conejos, con el fin de obtener suero anti-clembuterol (AntiClemb). A los sueros de todos los conejos se les realizó una determinación cualitativa del título mediante inmunodifusión en agar. Para esto 1,5g agar se disuelven en 100ml de PBS en baño de agua, y se vierten sobre placas de petri para formar capas de no más de 5mm de espesor. Una vez gelificado se marcan y se recortan 6 agujeros en el agar en círculo y uno central, extrayendo pequeñas porciones cilíndricas. En el orificio central se siembra el antígeno Clemb-BSA y en los exteriores distintas concentraciones del suero en buffer

PBS. Se incubó toda la noche a 37°C y se visualizó la presencia de bandas de inmunoprecipitación entre las siembras de suero y de antígeno. Luego de esto los conejos fueron inoculados nuevamente.

***Obtención de la fracción de IgG de los antisueros específicos.*** Para obtener la fracción de IgG del suero, se purificó por columna de proteína A Sepharosa 4B. Las columnas se prepararon en jeringas de 1ml con fibra de vidrio en la base, se bloqueó con una solución de BSA al 5% en PBS. Se rellenaron con 200µl de suspensión de la proteína en PBS con 0,2% de azida sódica y se lavó varias veces con buffer Tris 0,1M pH= 8. El suero, diluido, 850µl con 50µl de buffer Tris 1M pH=8,5, se sembró en la columna. Luego de lavados con 2ml de buffer Tris 0,1M pH=8, se eluyó la fracción de IgG por pasaje de 800µl de HCL pH= 2,5, NaCl 100mM. Este buffer produce la desnaturalización parcial de la porción Fab del anticuerpo (Harlow y Lane, 1988). La concentración de proteínas se calculó por absorbancia a 280nm. Las columnas lavadas con PBS, se almacenaron para su reuso posterior. La fracción eluida de anticuerpos, se neutralizó con el mismo volumen de 0,1M fosfato de sodio pH=8, medio en el que se siembra en placas Maxisorp o guada para su utilización posterior a 4°C.

***Acoplamiento de clenbuterol a fosfatasa alcalina.*** Se realizó el acoplamiento a fosfatasa alcalina por el procedimiento descrito por Yamamoto e Iwata (1982). Brevemente, se purificó 50µl de una suspensión de fosfatasa alcalina (FA) (1mg/ml) con 500µl de buffer fosfato de sodio 0,01M pH= 7,5, NaCl 0,1M y MgCl<sub>2</sub> 1mM, por pasaje por una columna de resina de exclusión molecular, Sephadex G25. Se eluyó con el mismo buffer, y se juntaron las fracciones con actividad enzimática (hidrólisis de 1mg/ml de para-nitrofenilfosfato (p-NPP) en buffer de dietanolamina 1M pH= 9,8



MgCl<sub>2</sub> 0,5mM (buffer DEA)) y lectura de color a 405nm. A aproximadamente 1ml de esta solución se le agregarón 80µl de clembuterol diazotado, en relación de masas de 2,6µg de diazo-clembuterol por cada 50µg de fosfatasa alcalina. Luego de 2 horas de reacción a 4°C, se purificó el producto por columna de Sephadex G25 y se tomaron las fracciones con reacción positiva a p-NPP. La solución final es aproximadamente de 2,5µg/ml de FA.

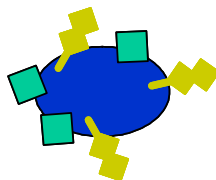
***Acoplamiento de clembuterol a biotina.*** Existen dos vías de obtención de complejos de clembuterol-biotina reactivos, que involucran “moléculas puente”. Éstas deben cotener un grupo fenólico reactivo con el grupo diazo-clembuterol, y un grupo animo alifático terminal, reactivo con la N-hidroxisuccinimido-biotina. Por técnicas de biotinilación de proteínas se acoplaron grupos biotina a BSA y a Tiramina o Tirosina, previamente acoplados a clembuterol (Figura 3.3.i).



**Clembuterol-“molécula puente”-Biotina**



**Clembuterol-Tiramina-Biotina**



**Clembuterol-BSA-Biotina**

*Figura 3.3.i Esquema de acoplamiento de clembuterol a biotina.*

Se preparó una solución fresca de 10mg/ml de N-hidroxisucxinimido-biotina en dimetilsulfóxido (DMSO), y se agregó 70µl de ésta a 200µg/20µl de Clemb-BSA con 150µl de buffer borato de sodio 0,1M pH= 8,8. La reacción con el derivado de Tiramina se realizó con 36µl del reactivo de biotilación, 200µl de borato y 90µl del producto de la reacción de clembuterol-diazo-Tiramina. Se dejó reaccionar por 2 a 3hs. a temperatura ambiente en oscuridad, y luego durante toda la noche a 4°C. La reacción se detuvo por agregado de 30µl de NH<sub>4</sub>Cl 1M. El derivado con BSA (CBB) se purificó por diálisis contra 2 l de PBS toda la noche a 4°C. El derivado con Tiramina (CTB) no se purificó.

***Enzimoimmunoensayo por titulación de anticuerpos.*** Se sembraron 16ng de Cl-BSA en Policubetas: (Polysorp, Nunc), por incubación en 100µl de buffer carbonato 0,1M pH=9, e incubación toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se lavó 5 veces con 0,02% Tween 20 en PBS. Y se bloquearon los sitios activos remanentes en la placa por incubación con 400µl/pocillo de una solución de 20mg/ml de leche descremada en polvo, durante una hora a temperatura ambiente. En el caso de utilizar Formazán como revelador se sembraron 2ng de Clemb-BSA por pocillo y se utilizó 5% de BSA en PBS para el bloqueo. El anticuerpo anti-clembuterol (AntiClemb) se incubó con muestras o soluciones patrón de clembuterol, en buffer de bloqueo, en los pocillos por 1h a temperatura ambiente, o separadamente en tubos por 1h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C y se transfirieron las incubaciones a pocillos donde se incubaron por 30 minutos más a temperatura ambiente. En los casos en que se usó el revelador Formazán, esta incubación se realizó en PBS con 0,1% de BSA y 0,02%

Tween 20. Luego de lavados, el AntiCleb unido a la fase sólida reaccionó secuencialmente con el antisuero de conejo biotilado (AntiIgG-Biot) en el mismo buffer (1h temperatura ambiente), y tras lavados intermedios, con ExtrAvidina fosfatasa alcalina (ExtrAvidin Alkaline Phosphatase, EFA), en PBS 0,1% BSA, por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se reveló la presencia de enzima por la reacción de hidrólisis del complejo p-nitrofenilfosfato (p-NPP) 1mg/ml en buffer DEA (dietanolamina 1M (10% v/v en agua) pH 9,8 MgCl<sub>2</sub> 0,5mM). El último lavado antes del revelado se realizó con buffer DEA. La reacción se detuvo con 1M NaOH, y se midió absorbancia a 405nm. Alternativamente la presencia de enzima es reveló con un sistema de amplificación de la señal para enzimoimmunoensayo Formazan (Gibco BRL) (Lövgren et al, 1994). Para disminuir la señal de fondo producida por la posible presencia de fosfatasa en la leche, el revelador Formazan, más sensible, requiere del bloqueo con BSA y lavados previos al revelado con buffer Tris-HCl 0,05M pH=7,5, 0,15M NaCl. Este revelador consta de un sustrato (solución de NADPH), del que se agregan 50µl y se incuba por media hora a temperatura ambiente, seguido del agregado de 50µl de amplificador (solución de alcohol deshidrogenasa y diaforasa), por el término de media hora. Se detien con la reacción por adición de 50µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3M y el color producido, se lee a 495nm de absorbancia.

Una alternativa más, que se utilizó en situaciones donde la presencia de fosfatasa en la muestra interfería con el ensayo, reemplaza los pasos posteriores a la incubación con el AntiIgG-Biot por los siguientes pasos: incubación con Avidina conjigada a Peroxidasa (1:400) en PBS 0,1%BSA, 100µl por pocillo, por 1 hora a temperatura ambiente, lavados con PBS 0,02% Tween 20 y por último con buffer citrato de sodio 50mM con 0,02% Tween 20. El reactivo de revelado se prepara disolviendo 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina sulfonato) (ABTS) 0,01mg/ml en el mismo buffer citrato con Tween

20 y justo antes de su uso, se agrega 0,001% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se revela la peroxidasa en la fase estacionaria con 100µl de revelador por pocillo y se detiene con 100ml de N<sub>2</sub>Na 1,5mM. Se lee la absorbancia a 340nm.

***Enzimoimmunoensayo por competencia con Clemb-FA.*** Se purificó un antisuero de cabra contra IgG de conejo (AntiIgG), para obtener la fracción de inmunoglobulinas. Para ello se adsorbió 0,5ml de suero diluído con 2ml de buffer Tris 0,1M pH= 8, a una suspensión de 800µl de Proteína A Sepharosa 4B, con suave agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavó por centrifugación muy suave, 2 veces con 2ml de PBS y dos veces con 2ml de NaCl 0,9%. La desorción se realizó con 1ml de HCl pH= 2,5 100mM NaCl, por incubación durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Luego de una separación con suave centrifugación, se neutralizó el sobrenadante por dilución (1:5) con PBS. Para determinar la concentración de proteínas se midió su absorbancia a 280nm, y se guardó a 4°C hasta su uso. Para prepara la fase sólida del enzimoimmunoensayo, esta solución de AntiIgG, se reacidifica durante 10 minutos con HCl pH= 2,5 100mM NaCl, y se neutraliza con fosfato de sodio 0,1M pH= 8. Se incubó toda la noche 100µl por posillo de placas de poliestireno Maxisorp, de dicha solución de AntiIgG a temperatura ambiente. Luego de lavados se bloquearon sitios activos residuales por incubación 400µl por posillo de 5% BSA en PBS con 0,01% Tween 20, 1hora a temperatura ambiente. Separadamente se incubaron muestras y patrones con Clemb-FA y una concentración constante de anticuerpo AntiClemb, en PBS 0,1% BSA con 0,01% Tween 20, toda la noche a 4°C. Las incubaciones se completaron luego en los pocillos cubiertos con AntiIgG por dos horas a temperatura ambiente. Luego de lavados, la presencia de enzima acoplada a la fase estacionaria fue revelada con Formazan.

***Enzimoimmunoensayo por competencia con Cl-Biotina.*** Las placas de poliestireno Maxisorp, se sembraron con la fracción de IgG de suero de conejo, AntiCleb, por el mismo procedimiento descrito para AntiIgG. Luego de lavados se bloquearon los sitios activos residuales por incubación con 400µl por posillo de 5% BSA en PBS. La placa así preparada se puede secar y guardar a 4°C o utilizar en el momento. Para el ensayo se incubaron las muestras y patrones con clembuterol conjugado a biotina (CBB o CTB), en PBS 0,1% BSA con 0,02% Tween 20, dos hora a temperatura ambiente. Luego de lavados con PBS 0,02% Tween 20, se incubó con EFA a una dilución (1:2000) en PBS 0,1% BSA, por 1 hora a temperatura ambiente. La presencia de enzima fue revelada con pNNP 1mg/ml en bufer DEA hasta color, y se midió su absorbancia a 405nm.

### **3.4. Acoplamiento de clenbuterol a albúmina sérica bovina y humana.**

La inmunogeneicidad de una molécula está determinada por la estructura química de la molécula y por la capacidad del sistema inmune del animal para reconocer este compuesto. Muchas moléculas pequeñas pueden ser usadas para producir anticuerpos si están acopladas a moléculas proteicas grandes. Estas proteínas facilitan la respuesta inmunológica mientras la molécula pequeña funciona como epítopo en el reconocimiento por el anticuerpo.

Para obtener una molécula con capacidad de producir inmunogeneicidad se acopló el clenbuterol a albúmina humana (Cleb-HSA), y se utilizó como antígeno para producción de anticuerpos.

También se realizó el acoplamiento del clenbuterol a albúmina bovina, y éste derivado, Cleb-BSA se utilizó como marcador en un ensayo inmunoenzimático.

La reacción de acoplamiento se realizó a través de un intermediario diazoico de la molécula de clenbuterol, que luego se hizo reaccionar con la proteína a la que se acopla por copulación a los grupos fenólicos de las tirosinas (figura 3.4.i).

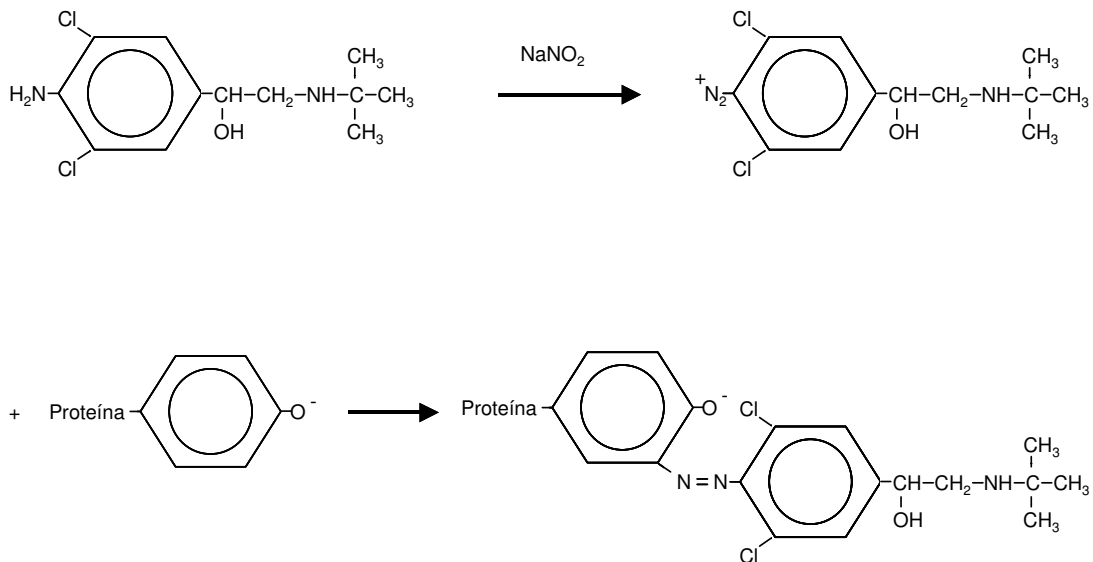


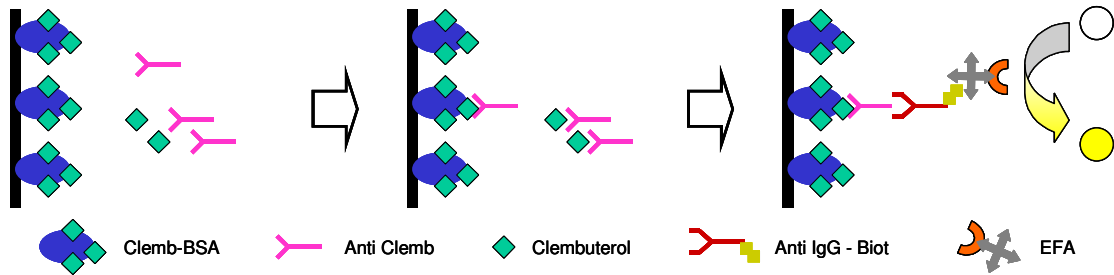
Figura 3.4.i Reacción de acoplamiento de clenbuterol a proteínas.

### 3.4.1 Diseños de enzimoimmunoensayos por titulación de anticuerpos.

#### Clenbuterol-BSA inmovilizado en fase sólida.

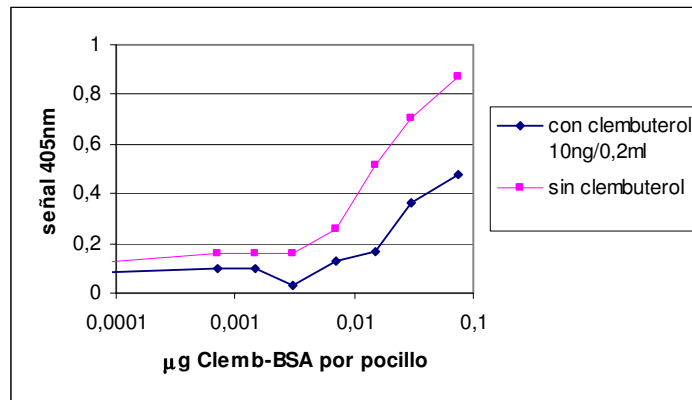
Una vez lograda la molécula de Clemb-BSA, se probó en un enzimoimmuno ensayo por competencia. En este diseño el Clemb-BSA fijado una placa de poliestireno y clenbuterol soluble en el medio de reacción, compiten por la unión a un anticuerpo anti-clembuterol (ver diseño, figura 3.4.1.i). En estos primero experimentos se utilizó un anticuerpo de conejo anti-clembuterol disponible para su uso en radioimmunoensayos. El anticuerpo unido a clenbuterol libre se elimina con los lavados mientras el anticuerpo remanente queda unido a la fase sólida por el Clemb-BSA y es revelado por

un segundo anticuerpo, anti-suero de conejo marcado con biotina (anti-IgG-Biot). La biotina se une a ExtrAvidina Fosfatasa Alcalina (EFA) y es revelado con pNPP.



*Figura 3.4.1.i* Diseño de enzimoimmunoensayo con Clembuterol-BSA inmovilizado en fase sólida. El clembuterol libre compite con el Clemb-BSA por su unión al anticuerpo. En presencia de más cantidad de clembuterol libre en la solución disminuye la señal.

Se ajustaron las condiciones para que este ensayo permita la cuantificación de clembuterol. Se buscó inicialmente, la óptima cantidad de Clemb-BSA en la fase estacionaria. En la figura 3.4.1.ii se muestra la curva de titulación de distintas cantidades de Clemb-BSA.

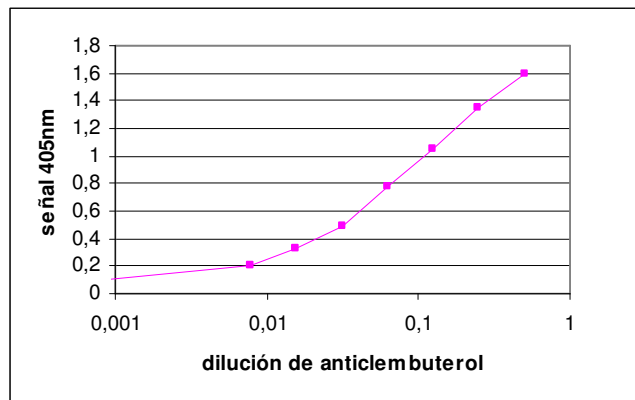


*Figura 3.4.1.ii* Curva de titulación de Clembuterol-BSA en fase sólida. Se sembraron distintas diluciones de Clemb-BSA en placas de poliestireno. Se hicieron reaccionar con la misma concentración de anti-clembuterol comercial, en presencia o ausencia de clembuterol libre 10ng/200µl, seguido de incubaciones con anti-IgG de conejo marcado con biotina y EFA. Se reveló con pNPP.



Se estableció la concentración óptima de 16ng de Clemb-BSA por pocillo. La presencia de 10ng de clenbuterol en los 200µl de reacción con el anticuerpo, redujo la señal, mostrando la especificidad de unión.

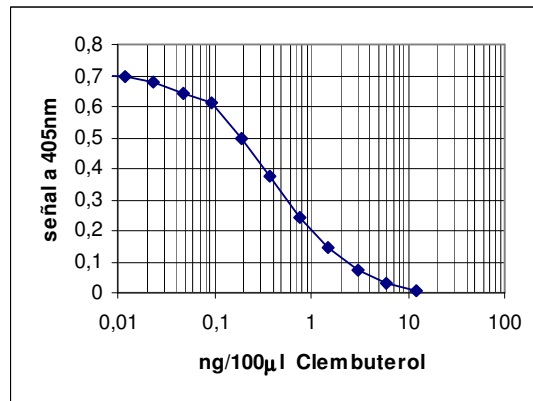
Incubando distintas diluciones de anticuerpo (figura 3.4.1.iii), se estableció la concentración óptima del anti-clembuterol en (1:16) de la concentración original recomendada del anticuerpo comercial.



*Figura 3.4.1.iii Curva de titulación del anticuerpo anti-clembuterol.* Se sembró 16ng/pocillo de Clemb-BSA en placas de poliestireno. Se hicieron reaccionar con 100µl de diluciones desde (1:2) a (1:128) de la concentración recomendada para RIA del anticuerpo anti-clembuterol, en presencia de 100 µl de buffer. Luego de reacción es con segundo anticuerpo con biotina y EFA, se reveló con pNPP. El punto de inflexión de la curva, que es el provee de mayor sensibilidad al ensayo, se encontró a una dilución de (1:16).

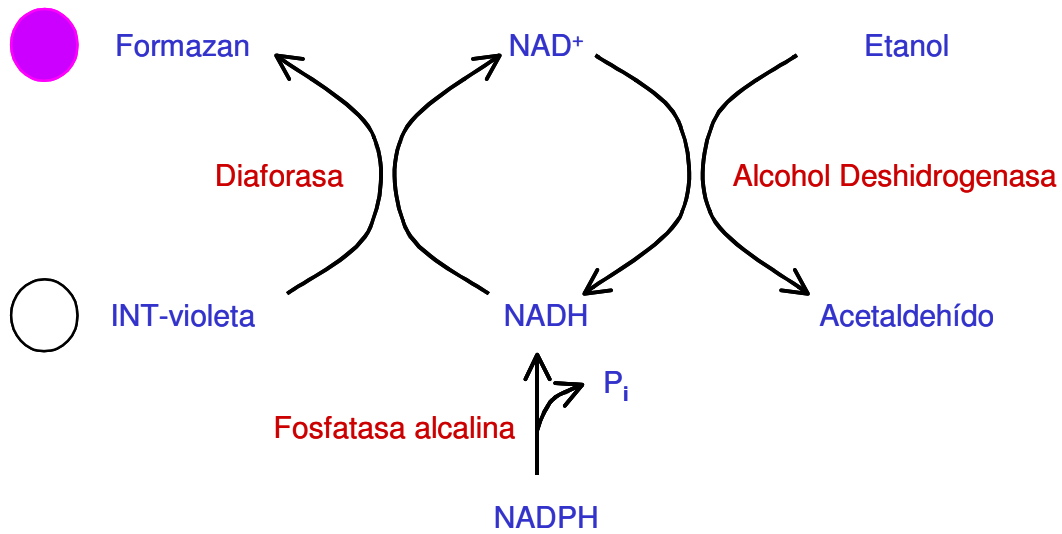
La reacción para la curva de calibración con el diseño escogido se realizó con distintas concentraciones de clenbuterol libre de la matriz o por una incubación secuencial. En el segundo caso, el anticuerpo y el clenbuterol se dejan reaccionar en tubos por espacio de una hora a temperatura ambiente o a 4°C durante toda la noche. La mezcla de reacción luego se transfiere a las policubetas con la matriz de Clemb-BSA, que captura los anticuerpos remanentes. Estas distintas condiciones de incubación dieron resultados

similares, por lo que se escogió para su uso general la incubación directa de anticuerpo y clenbuterol libre en las policubetas con Clemb-BSA, por 1h a temperatura ambiente. La curva, en el rango de concentraciones de 0,1 a 10ng./100ul se muestra en la figura 3.4.1.iv.



*Figura 3.4.1.iv Curva de calibración de clenbuterol-BSA. Clenbuterol en fase sólida. Revelado con pNPP. Se sembró 16ng/pocillo de Clemb-BSA en placas de poliestireno. Se hicieron reaccionar con (1:16) de anti-clenbuterol, en presencia de distintas concentraciones de clenbuterol, de 0 a 10ng/100µl. Se reveló con pNPP. En estas condiciones el rango útil de la curva de calibración se establece en 0,1-10ng/100µl de clenbuterol.*

Se intentó mejorar la sensibilidad del ensayo con un reactivo de mayor señal. Para esto se probó un sistema de amplificación de la señal (ELISA Amplification System, Gibco), en base a Formazán. Este sistema incrementa la señal, por lo menos 10 veces, sobre el tradicional revelador de fosfatasa pNPP. En este sistema la fosfatasa alcalina unida a la placa a través de los complejos inmunes, actúa sobre el sustrato NADPH, cuyo producto inicia una reacción enzimática secundaria cíclica, que resulta en un producto coloreado (figura 3.4.1.v). Cada molécula de producto de la primera reacción toma parte en muchos ciclos de la segunda reacción, por lo que la señal es amplificada.



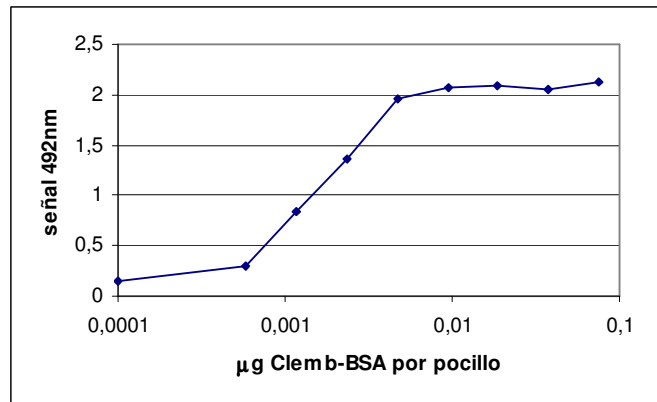
*Figura 3.4.1.v Revelador Formazán.* El sustrato es la forma reducida de niconiamida adenin dinucleótido fosfato (NADPH), la cual es desfosforilada por la fosfatasa unida a la fase sólida. La forma reducida, NADH, activa un segundo sistema enzimático, conformado por un ciclo redox, de diaforasa y alcohol deshidrogenasa. En este ciclo NADH, en presencia de diaforasa, reduce una sal tetrazolium (iodonitrotetrazolium violeta, INT-violeta) para formar un colorante intenso (Formazan). El producto oxidado  $NAD^+$ , se reduce a NADH mientras el etanol es oxidado a acetaldehído en presencia de alcohol deshidrogenada. La reducción de la sal tetrazolium es directamente proporcional a la concentración de NADH originalmente formada por la fosfatasa.

Con el empleo de este nuevo revelador se pusieron a punto las condiciones del ensayo.

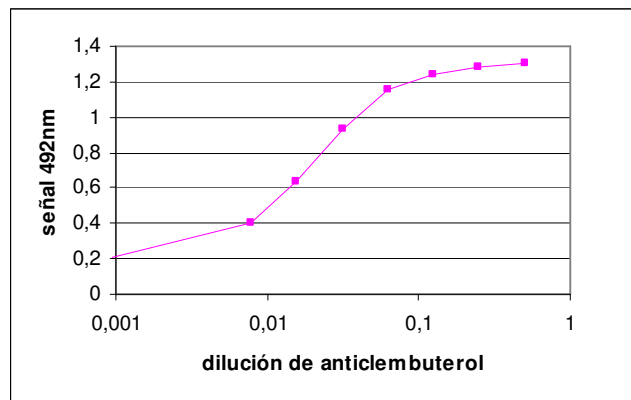
Por una curva de Clemb-BSA en placa se estimó la cantidad óptima en 2ng por pocillo

(figura 3.4.1.vi). Se tituló el anticuerpo y se eligió (1:50) como la dilución más

conveniente (figura 3.4.1.vii).



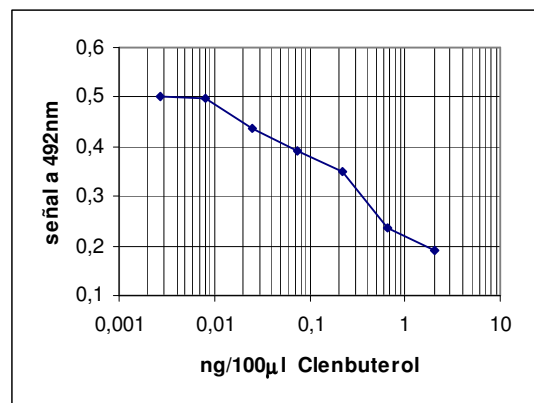
*Figura 3.4.1.vi Curva de titulación de Clemb-BSA en fase sólida.* Se sembraron distintas diluciones de Clemb-BSA en placas de poliestireno. Se hicieron reaccionar con la misma concentración de anti-clembuterol, seguido de incubaciones con anti-IgG conejo marcado con biotina y EFA. Se reveló con Formazán.



*Figura 3.4.1.vii Curva de titulación del anticuerpo anti-clembuterol.* Se sembró 2ng/pocillo de Clemb-BSA en placas de poliestireno. Se hicieron reaccionar con 100µl de diluciones desde (1:2) a (1:128) de la concentración recomendada para RIA del anticuerpo anti-clembuterol, en presencia de 100 µl de buffer. Luego de reacción es con segundo anticuerpo con biotina y EFA, se reveló con Formazán. El punto de inflexión de la curva, que es el provee de mayor sensibilidad al ensayo, se encontró a una dilución de (1:50).

Las condiciones de incubación escogidas para este sistema fueron: preincubación en tubos del anticuerpo y el antígeno por 1 hora a y trasvasado a pocillos con Clemb-BSA bloqueados, donde se incuban las soluciones 30 minutos a temperatura ambiente.

El rango útil de concentraciones para el ensayo de clenbuterol se extendió de 0,01 a 1ng/100µl (figura 3.4.1.viii).



*Figura 3.4.1.vii Curva de calibración de clenbuterol. Cemb-BSA en fase sólida. Revelado con Formazan.* Se sembró 2ng/pocillo de Clemb-BSA en placas de poliestireno. Se hicieron reaccionar con (1:50) de anti-clenbuterol comercial, en presencia de distintas concentraciones de clenbuterol, de 0 a 10ng/100µl. Se reveló con Formazan. En estas condiciones el rango útil de la curva de calibración se establece en 0,001-1ng/100µl de clenbuterol.

Si bien este rango de concentraciones alcanzado permite un nivel más bajo de detección de clenbuterol, resulta menos robusto que el anterior sistema.

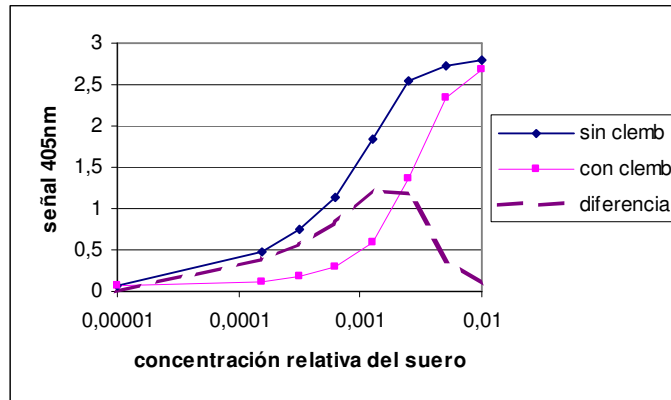
La reacción de EFA con Formazán es extremadamente sensible, tanto para la señal específica como para la señal inespecífica o de fondo. La presencia de pequeñas cantidades de esta enzima en el material usado para bloqueo del poliestireno (leche descremada en polvo), elevó la señal en los controles o “ceros”. En ensayos posteriores,

donde se utilizó este revelador, fue necesario cambiar el buffer de ploqueo por BSA 5% y los buffers de incubación por BSA 1%, ambos en PBS 0,02% Tween 20.

### **3.4.2 Producción de anticuerpos específicos.**

Se sintetizó clemb-HSA con lo que se inocularon cuatro conejos para la producción de un anticuerpo policlonal. Se prefirió utilizar el derivado acoplado a albúmina humana (Clemb-HSA) en lugar Clemb-BSA, pues los anticuerpos resultantes serían utilizados en análisis de muestras bovinas y estos podrían mostrar reacción cruzada por la presencia de albúmina en las muestras. Una vez completado el término de inmunización se realizó una determinación cualitativa del título mediante inmunodifusión en agar, usando como antígeno Clemb-BSA . Con el suero de conejo sin diluir formó bandas de inmunoprecipitación con el Clemb-BSA.

Luego del sangrado de los conejos, se tituló el suero de uno de ellos, por el diseño de EIA desarrollado con anterioridad, de Clemb-BSA en placa y revelado con pNPP (sección 3.4.1). En la figura 3.4.2.i se visualiza la curva de titulación del suero y se verifica la disminución específica de la señal por presencia de clembuterol (100ng/100µl ) en la incubación.



*Figura 3.4.2.i Curva de titulación del suero de conejo inmunizado con Clemb-HSA. Se sembró 16ng/pocillo de Clemb-BSA en placas de poliestireno. Se hicieron reaccionar con 100µl de diluciones desde (1:100) a (1:64000) de suero de conejo, en presencia de 100µl de buffer o clembuterol 100ng/100µl. Se reveló con pNPP. Se puede observar una disminución de la señal por la presencia de clembuterol a prácticamente todas las diluciones de anticuerpo. La mayor diferencia de la señal se produce a diluciones (1:400) y (1:800) del suero.*

Para ser utilizados como anticuerpos anti-clembuterol en posteriores ensayos, se purificó la fracción de IgG del suero por absorción a una columna de proteína A Sepharosa.

### 3.5. Síntesis de trazadores para enzimoimmunoensayos.

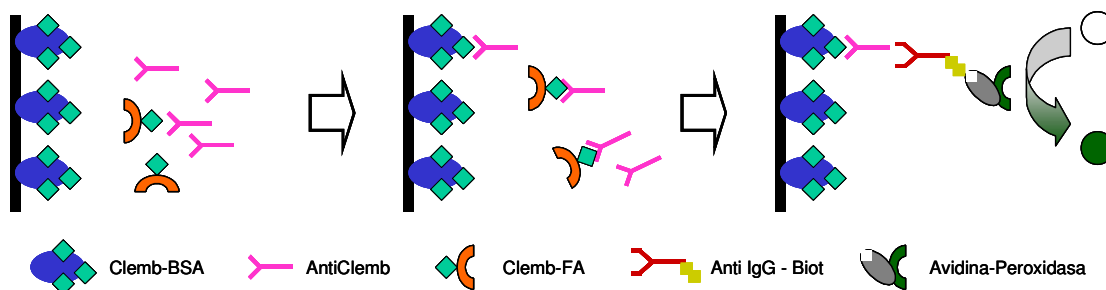
El enzimoimmunoensayo hasta aquí logrado, poseía muchos pasos de reacción. Esta característica incrementaba mucho el tiempo del ensayo y cada paso distinto aportaba sus propias interferencias (reacciones cruzadas del primer anticuerpo, reacciones cruzadas del segundo anticuerpo, interferencias en el sistema avidina- biotina, contaminación con fosfatasa). Una forma de eliminar un paso de reacción es el de acoplar directamente el sistema enzimático al primer anticuerpo (anti-clembuterol) o al

antígeno (Clenbuterol). Los procedimientos de conjugación, idealmente, deberían tener un rendimiento alto, lograr una molécula de composición definida, sin pérdida de actividad de la enzima o del anticuerpo, producir una unión estable y ser simple y reproducible. En nuestro caso, la marcación del anticuerpo por ser policlonal, no reducía las interferencias por reacciones cruzadas. Por otro lado, la marcación del antígeno resultaba más conveniente además, por la disponibilidad de cantidades ilimitadas de clenbuterol ya purificado.

### **3.5.1 Acoplamiento de clenbuterol a enzimas.**

Un complejo de Clemb-FA fue obtenido utilizando la reacción del derivado diazoico como intermediario. Para cuantificar el número de moléculas de clenbuterol por molécula de complejo se utilizó en ensayo de inmunoenzimología descrito anteriormente (sección 3.4.1.). En este caso el Clemb-FA fue la muestra incógnita que reacciona con el anti-clenbuterol en solución. El anticuerpo en exceso se unirá al Clemb-BSA de la fase sólida, y el complejo Clemb-FA-anticlenbuterol se eliminará con los lavados. El anticuerpo unido a la fase sólida se revela con un segundo anticuerpo biotinilado que se une a Avidina Peroxidasa y se revela con ABTS (figura 3.5.1.i).

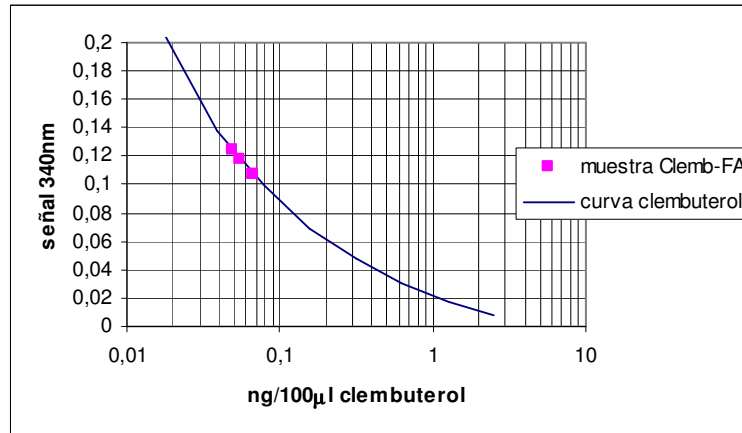




*Figura 3.5.1.i Enzimoinmunoensayo para cuantificación de Clemb-FA. El Clemb-FA compete con el Clemb-BSA en la fase sólida por su unión al anticuerpo. La señal se compara contra una curva de calibración de clembuterol libre. Se revela con segundo anticuerpo biotinilado, Avidina-peroxidasa y ABTS.*

Para prevenir posibles interferencias con una unión inespecífica de Clemb-FA, la biotina del segundo anticuerpo fue revelada con Avidina-Peroxidasa y ABTS. El empleo de un sistema con peroxidasa evita la interferencia de la FA acoplada a clembuterol, cuantificando así sólo los grupos clembuterol de la molécula de Clemb-FA.

En la figura 3.5.1.ii se muestra el resultado obtenido con diluciones de la muestra. Por ajuste logit-log de la curva, se calcularon las concentraciones de clembuterol en cada dilución. Sólo las dos concentraciones mayores (3 y 1,5ng/100ul) de Clemb-FA caen dentro del rango de la curva, a partir de los cuales se calculó la proporción masas y moléculas de clembuterol unidas por moléculas de FA ( $M_{FA} = 140-160kD$ ). Como resultado del acoplamiento, de 9 a 15 moléculas de clembuterol quedaron unidas por molécula de FA.



*Figura 3.5.1.ii Curva de calibración de clembuterol. Cuantificación de moléculas de clembuterol unido al complejo Clemb-FA. Se sembró 16ng/posillo de Clemb-BSA en placas de poliestireno. Se hicieron reaccionar por duplicado, con (1:16) de anti-clembuterol, en presencia de 0 a 10ng/100µl de clembuterol, o en presencia de 3, 1,5, 0,75, 0,38 y 0,19ng/100µl de la muestra de Clemb-FA. El complejo unido a la fase sólida se hizo reaccionar con antisuero de conejo biotinilado y avidina conjugada a peroxidasa. Se reveló con ABTS. Por ajuste logit-log de la curva, se calcularon las concentraciones de clembuterol. Sólo las dos concentraciones mayores caen dentro del rango de la curva, que son las que están graficadas.*

### 3.5.2 Diseños de enzimoimmunoensayos por titulación de anticuerpos.

#### Segundo Anticuerpo inmovilizado en la fase sólida.

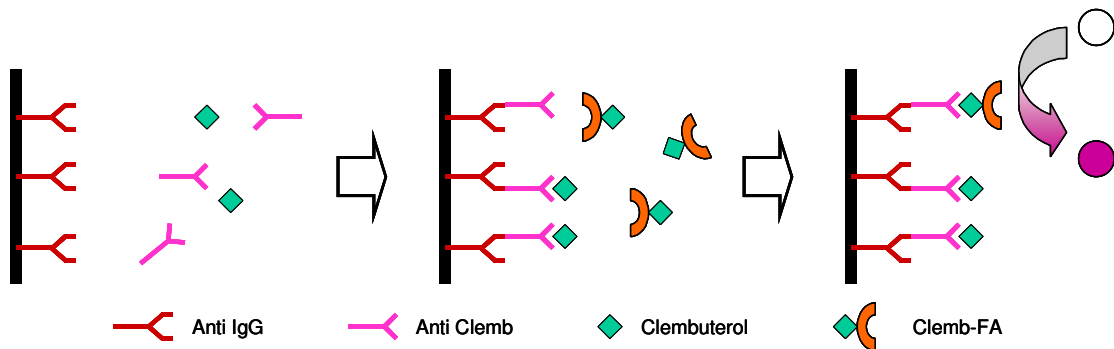
Para reducir la cantidad de pasos y el tiempo total del ensayo, se intentó un nuevo enzimoimmunoensayo utilizando clembuterol conjugado a fosfatasa alcalina (Clemb-FA). Se utilizó en un diseño por titulación de anticuerpos.

Se sembraron diluciones de anticuerpo de cabra, anti IgG de conejo, en la fase sólida.

Para este diseño se prefirió policubetas Maxisorp como fase sólida, ya que está especialmente recomendado por el fabricante (Nunc) para la fijación de anticuerpos por la mayor hidrofiliidad de este material. Una vez sembradas con antisuero de cabra, anti

IgG de conejo, y bloqueadas, las placas lavadas y secas, se pueden guardar a 4°C hasta su uso, sin pérdida de eficiencia, por al menos dos semanas.

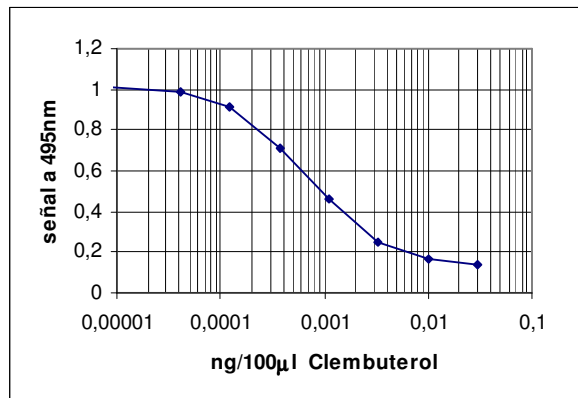
Los anticuerpos, AntiCleb se incuban con clenbuterol libre y una cantidad fija de Clemb-FA. Los inmunocomplejos son luego capturados por el antisuero unido a la fase estacionaria. Cuanto más clenbuterol libre haya en la reacción, menos Clemb-FA se unirá a la placa, y menor será la señal producida por el revelador de fosfatasa (figura 3.5.2.i).



*Figura 3.5.2.i. Diseño de enzimoimmunoensayos por titulación de anticuerpos. Segundo Anticuerpo inmovilizado en la fase sólida. El clenbuterol libre compite con el Clemb-FA por su unión al anticuerpo. El complejo antígeno anticuerpo es luego capturado en la fase sólida por el segundo anticuerpo, antiIgG de conejo. En presencia de más cantidad de clenbuterol libre en la solución disminuye la señal.*

Tras las primeras pruebas se prefirió el uso del revelador más sensible, Formazán, por lo que el bloqueo se realizó con BSA 5% en PBS, 0,02% Tween 20, y las incubaciones con BSA 0,1% en PBS, 0,02% Tween 20.

La curva de calibración obtenida en la figura 3.5.2.ii. En esta curva se observa que el rango óptimo de trabajo para detección de clenbuterol es de 0,1 a 0,0001ng/100µl.



*Figura 3.5.2.ii Curva de calibración de clembuterol por titulación de anticuerpos con Clemb-FA. Se sembró 10ug/50µl por pocillo de antiRIgG en placas Maxisorp. Se hizo reaccionar en tubos, 50µl de anti-clembuterol comercial (1:4), con 50µl de 3 a 0,00004ng/100µl de clembuterol, y 50µl de Clemb-FA (1:20) toda la noche a 4°C. Al día siguiente se trasvasan por duplicado 50µl por pocillo a las tiras sembradas y se incuban por 2 hs. a temperatura ambiente. Se revela con Formazán. El rango de uso de esta curva abarca de 0,01 a 0,0001 ng/100µl de clembuterol.*

Para mayor eficiencia de este suero fue necesaria su purificación por absorción a proteína A Sepharosa de la fracción IgG del suero. La incubación en medio ácido produce la desnaturalización parcial del dominio Fc del anticuerpo. Esto permite, en la purificación la desadsorción de la proteína A, y en la siembra a la fase sólida, aumentar la probabilidad de anclaje del anticuerpo por el dominio Fc, dejando activa la porción variable Fab.

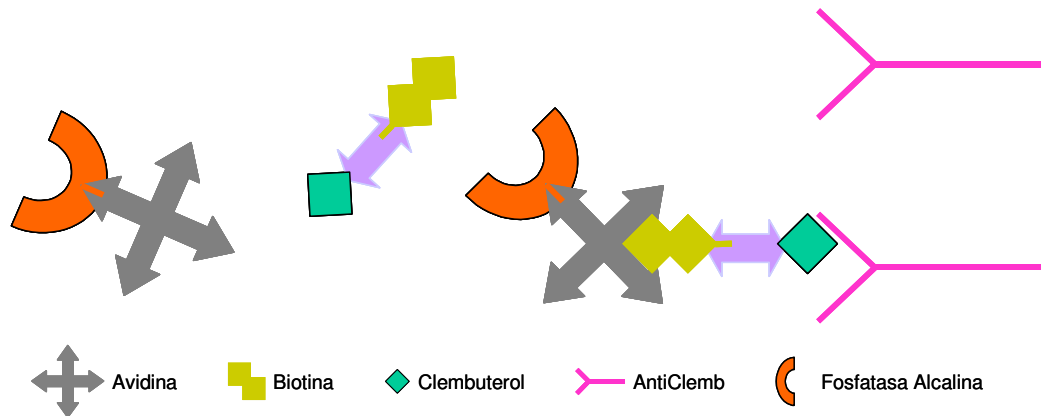
La preparación de Clemb-FA fue guardada en heladera para mantener la actividad de la fosfatasa alcalina. Sin embargo, después de unas semanas en estas condiciones, no se obtuvieron resultados similares. Por otro lado, el producto de la conjugación, rendía para pocos ensayos. Por estas razones se necesitó repetir la síntesis con frecuencia, y por consiguiente debieron ajustarse las condiciones del EIA con cada nuevo conjugado.

### 3.5.3 Acoplamiento de clenbuterol a biotina.

Se requería una molécula conjugada más estable, que pudiera guardarse sin pérdida de actividad por largos períodos, o cuya reacción de conjugación siempre produjera el mismo grado de sustitución. Se pensó entonces en unir biotina al clenbuterol en vez de la enzima propiamente dicha.

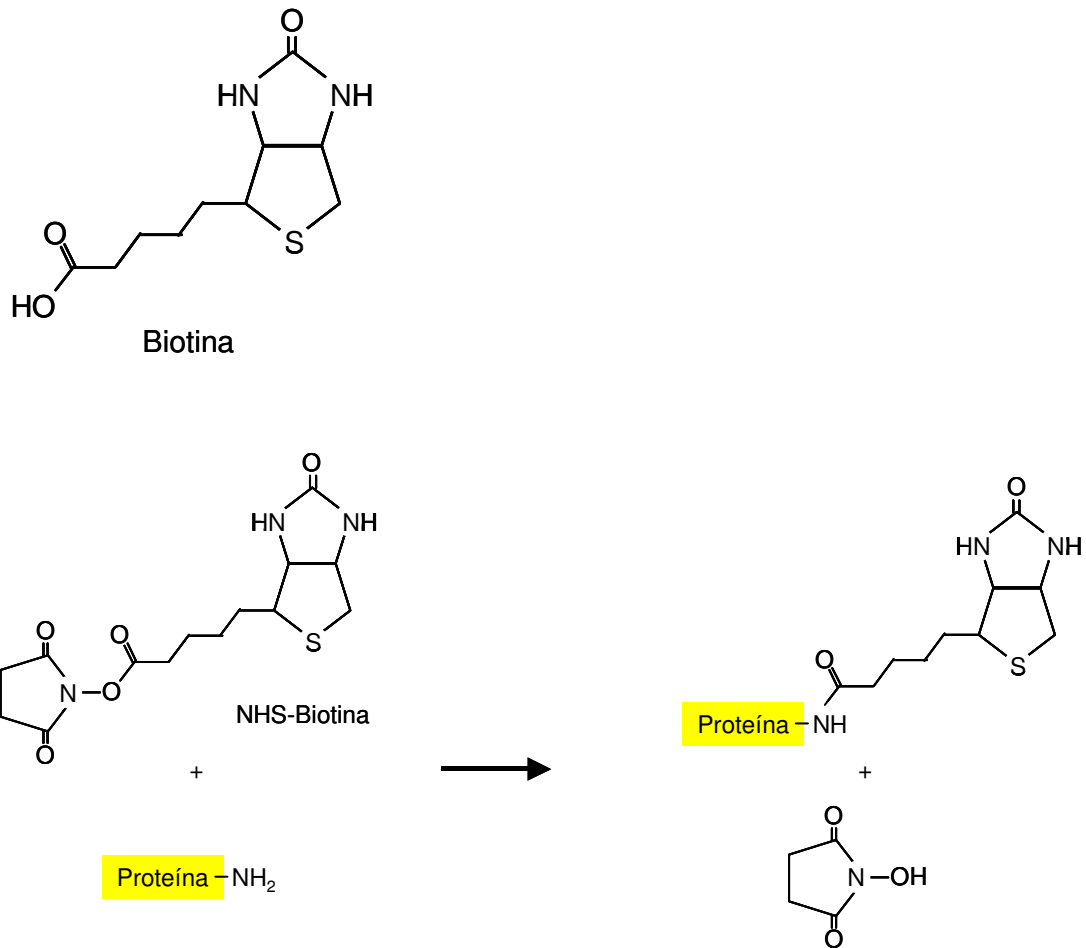
El sistema avidina-biotina resulta una herramienta muy útil en enzimoimmunoensayos debido a: 1) excepcionalmente alta afinidad entre estas dos moléculas ( $10^{15}M^{-1}$ ), 2) la facilidad de acoplar biotina a anticuerpos u otras macromoléculas sin pérdida de actividad, 3) que la avidina es muy estable y tiene muchos sitios de unión por lo que puede usarse de molécula puente entre otras dos moléculas biotiniladas, y 4) el empleo del sistema avidina-biotina permite mayor detectabilidad sin incrementar la señal del fondo.

Se probó la síntesis de clenbuterol biotinilado para su uso como trazador. La biotina como grupo funcional se une específicamente a moléculas de avidina, la que se obtiene comercialmente acoplada a distintas enzimas o marcadores fluorescentes (por ejemplo: avidina unida a fosfatasa alcalina, EFA)(figura 3.5.3.i).



*Figura 3.5.3.i Complejos Biotina-Avidina.* El conjugado clembuterol-biotina, se uniría simultáneamente al anticuerpo específico anti-clembuterol y a una enzima acoplada a avidina (EFA).

La biotinylación se realiza utilizando un éster de succinimida biotina. El acoplamiento está descrito para grupos amino de una proteína. Intentamos, por lo tanto, la estrategia de copulaci3n diazoica del clembuterol con una molécula que poseyera un grupo amino aromático (Tiramina o tirosina), y un grupo amino alifático el cual fuera capaz de reaccionar con el éster de biotina (figura 3.5.3.ii).



*Figura 3.5.3.ii Biotinilación de proteínas.* La biotina activada con NHS reacciona a pH= 7-9, con aminas primarias, para formar uniones amida estables. Las proteínas generalmente poseen abundantes aminas primarias, de la cadena lateral de las lisinas o los grupos amino terminales de los polipéptidos.

Como beneficio adicional, la molécula acoplada alarga el espacio entre el clembuterol y la biotina, lo que reduce posibles impedimentos estéricos entre un anticuerpo que reconozca al epítopo del antígeno y la avidina que se une a la biotina por el otro extremo de la molécula.

Se sintetizaron Tiramina diazo clembuterol y Tirosina diazo clembuterol. La primera se logró separar por HPLC y luego se hizo reaccionar con N-Hidroxisuccinimida-Biotina (NHS-Biotina) (figura 3.5.3.iii).

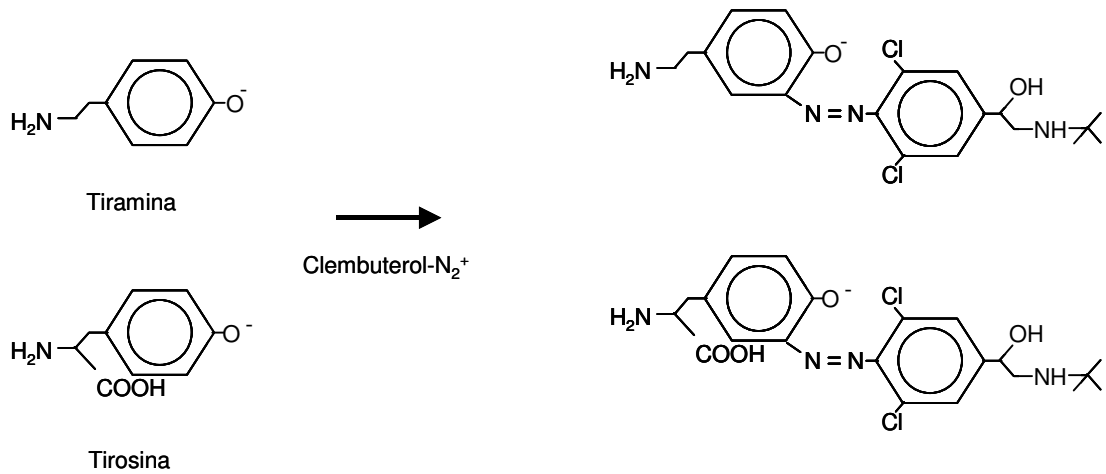


Figura 3.5.3.iii Copulación diazoica de clembuterol con Tiramina o Tirosina.

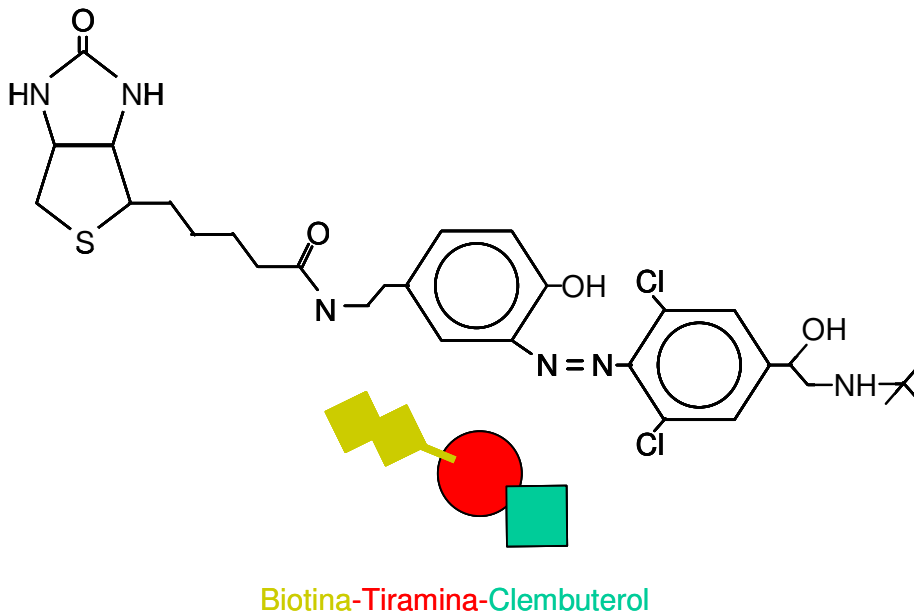
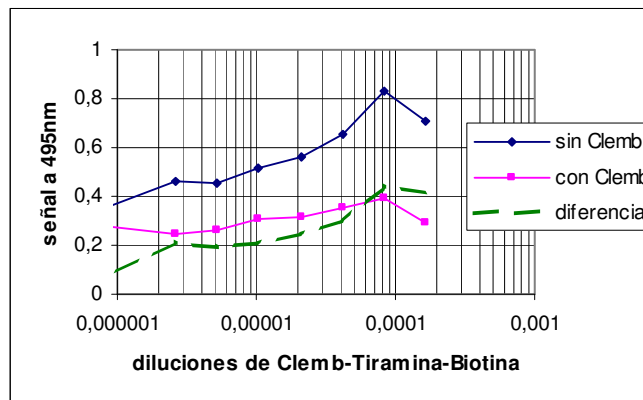


Figura 3.5.3.iv Derivado biotinilado de Clembuterol con Tiramina. Estructura propuesta.



Sin embargo estas pruebas con Tiramina tuvieron un éxito relativo, ya que si bien se consiguió una molécula biotinilada que era reconocida por el anticuerpo comercial anti clembuterol, no se pudo lograr una buena purificación del producto de sus reactivos. Al utilizar entonces una mezcla de clembuterol biotinilado con clembuterol y clembuterol unido a Tiramina, para lograr un desplazamiento específico de su unión al anticuerpo se requería de muchas moléculas de clembuterol libre. Esto lleva a sistemas de enzimoimmunoensayo para rangos de trabajo en altas concentraciones del analito. En la figura 3.5.3.v, se muestra una curva del trazador sintetizado, en un EIA de diseño similar al de la figura 3.5.2.i. Se puede observar que una concentración de 100ng/100ul de clembuterol produce un pequeño cambio en la señal, pero no la anula completamente. Se requeriría de mucha más concentración de clembuterol para alcanzar la señal de fondo.



*Figura 3.5.3.v Curva de titulación de Clemb-Tiramina-Biotina.* Se sembró 10ug/50ul por pocillo de antiRIgG en placas Maxisorp. Se hizo reaccionar en tubos, 100ul de anti-clembuterol (1:4), con 100ul de buffer o 100ng/100ul de clembuterol, y 100ul de Clemb-Tiramina-Biotina en diluciones de (1:2000) a (1:128000), toda la noche a 4°C. Al día siguiente se trasvasan por duplicado 50ul por pocillo a las tiras sembradas y se incuban por 2 hs. a temperatura ambiente. Se revela con, EFA (1:2000) y Formazán. La diferencia de señal en presencia o ausencia de clembuterol, demuestra que la molécula sintetizada se une al anticuerpo específicamente, sin embargo esta diferencia de señal específica es muy baja en relación a la señal inespecífica producida en ausencia de clembuterol.

Al no conseguir resultados positivos por esta vía, se eligió continuar con otra estructura de trazador que permitiera una fácil purificación. El puente entre el clembuterol y la biotina fue una proteína: la BSA. Algunos grupos funcionales aromáticos de la BSA reaccionan con el diazo-clembuterol mientras los grupos amino libre reaccionan con NHS-Biotina. La purificación se facilita por la gran diferencia de tamaño entre la proteína y el clembuterol o la NHS-Biotina, utilizando métodos de diálisis y centrifugación a través de una membrana de corte. La molécula derivatizada, interpone un espacio entre el clembuterol y la biotina, pudiéndose además controlar la relación biotina:clembuterol sobre la molécula de BSA, de manera que resulte en un factor de amplificación (Figura 3.5.3.vi).

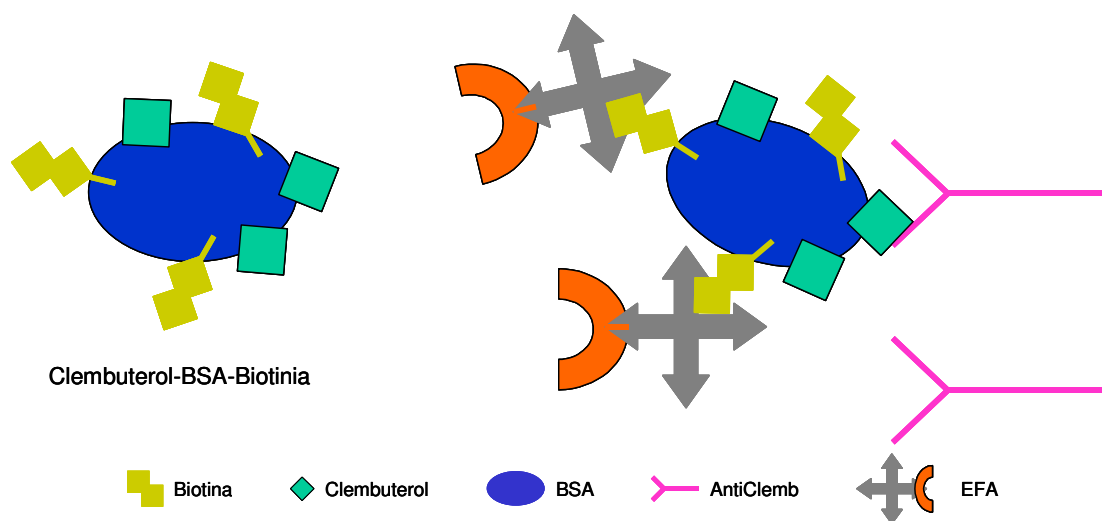
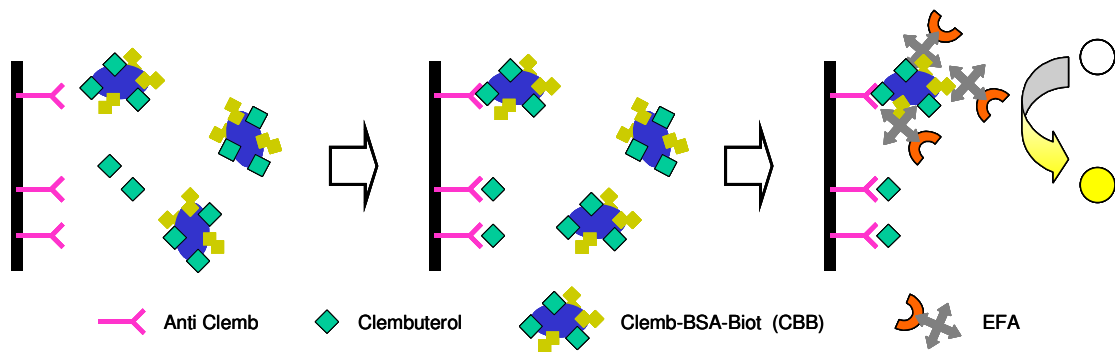


Figura 3.5.3.vi Derivado biotinilado de Clembuterol con BSA. Estructura propuesta y factor de amplificación postulado.

Se comprobó la síntesis del trazador Clemb-BSA-Biotina, en reacción con anti-clembuterol fijado a la fase sólida. Se utilizó el anticuerpo comercial y el antisuero desarrollado. Los anticuerpos, purificados por columnas de proteína A Sepharosa, fueron sembrados en placas Maxisorp. Se utilizó el anticuerpo comercial a la

concentración (1:1,8) y dos diluciones del antisuero obtenido en el laboratorio a (1:1800) y (1:900). La figura 3.5.3.vii muestra un esquema del ensayo y la figura 3.5.3.viii, los resultados del ensayo. La presencia del trazador biotinilado se revela por reacción posterior con EFA y pNPP. Para demostrar la especificidad de la unión se interfirió la reacción con clenbuterol disuelto en el medio de reacción. Se utilizó una concentración de Clemb-BSA-biotina (1:13000), y se interfirió con clenbuterol libre (20ng/μl).



*Figura 3.5.3.vii Diseño de enzimoimmunoensayo competitivo. Anti-clembuterol inmovilizado en la fase sólida. El clenbuterol libre compite con el Clemb-BSA-Biotina (CBB) por su unión al anticuerpo inmovilizado. El trazador se une formando el complejo Avidina-Biotina a la enzima fosfatasa alcalina (EFA), que es finalmente revelada con pNPP. En presencia de más cantidad de clenbuterol libre en la solución disminuye la señal.*

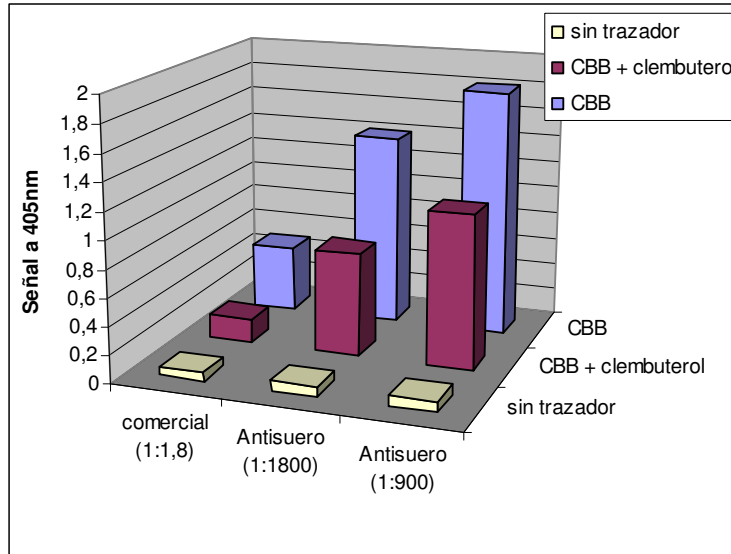


Figura 3.5.3.viii Comprobación de la síntesis de trazador biotinilado: Clemb-BSA-Biotina (CBB). El anticuerpo comercial (1:1,8) y el antisuero desarrollado (1:1800) y (1:900), fueron sembrados en placas Maxisorp. Se hicieron reaccionar con 100µl de trazador CBB (1:13000) y 100µl de buffer o clembuterol 20ng/100µl, por 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente se revela con EFA (1:2000) y pNPP. Se observa reducción de la señal por desplazamiento específico con clembuterol.

Finalmente se realizó una prueba comparativa de los dos trazadores biotinilados:

Clemb-Tiramina-Biotina (CTB) y Clemb-BSA-Biotina (CBB) con el antisuero desarrollado fijado a la fase sólida, competido o sin competir con clembuterol en el medio de reacción (figura 3.5.3.ix y x).

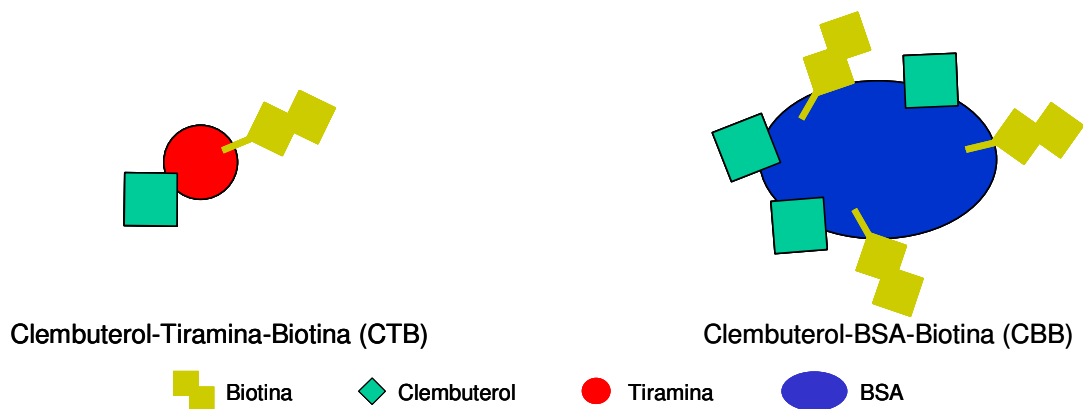
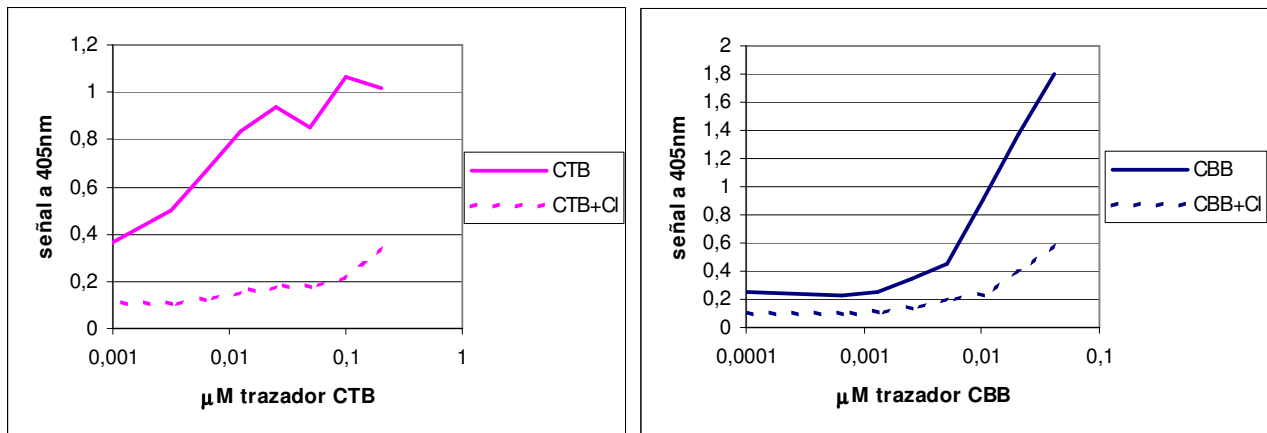


Figura 3.5.3.ix Derivados biotinilados de Clembuterol con Tiramina y con BSA.

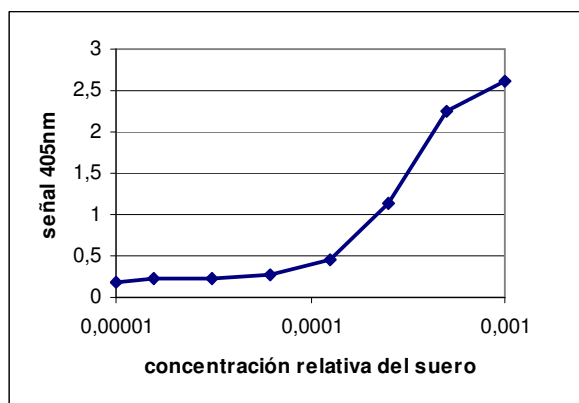


*Figura 3.5.3.x Comparación de los dos trazadores biotinilados: Clemb-Tiramina-Biotina (CTB) y Clemb-BSA-Biotina(CBB). El antisuero desarrollado (1:500) fue sembrado en placas Maxisorp. Se hicieron reaccionar con 100μl de trazador a las concentraciones molares que se indican en el gráfico y 100μl de buffer o clembuterol 250μM, 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente se revela con EFA (1:2000) y pNPP. La concentración molar de CTB fue estimada a partir de la concentración de clembuterol en la reacción, mientras que la de CBB fue calculada midiendo la concentración de BSA por reacción de Bradford. En ambos casos se observa reducción de la señal por desplazamiento específico con clembuterol. Sin embargo CBB produce mayor señal específica por mol. A 0,02 μM de ambos trazadores, la señal específica es de 0,7 unidades de absorbancia para CTB y casi de 1 para CBB.*

A 0,1μM de CTB la señal parece llegar a una meseta, mientras que la señal de CBB sigue aumentando con la concentración. Esto puede deberse a que, al no estar purificado, otras especies como Clemb-Tiramina o Clembuterol que no han reaccionado y coexisten en el medio, están ocupando sitios de unión en el antisuero. En el otro caso, el trazador CBB, fácilmente purificable, ofrece una buena posibilidad para el desarrollo del enzimoimmunoensayo.

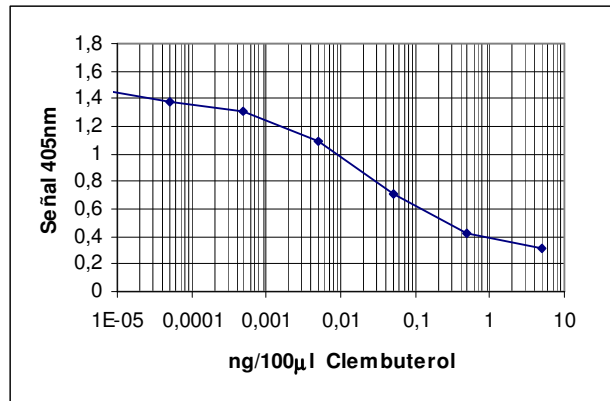
### 3.5.4 Diseños de enzimoimmunoensayos competitivo. Anticlembuterol inmovilizado en la fase sólida.

El primer emzimoimmunoensayo para clembuterol resultó poco práctico debido a la gran cantidad de pasos de incubación requeridos, y el excesivo tiempo que insumía (sección 3.4.1). El segundo sistema de ensayo, con menos pasos, requería de un trazador (Clemb-FA) cuya síntesis no era reproducible y el rendimiento del producto era escaso (sección 3.5.2). La síntesis del trazador de Clemb-BSA-Biotina permitió un nuevo diseño de enzimoimmunoensayo, basado en la fijación del primer anticuerpo, anti-clembuterol en la fase sólida y la afinidad del sistema avidina-biotina para la marcación del trazador. En la figura 3.5.3.vii ya se esquematizó este diseño de EIA con anticlembuterol en la fase sólida. En la figura 3.5.4.i se muestran la curva de titulación del anticuerpo con el trazador diluido (1:6000). A partir de esto se eligió la concentración (1:2000) de antisuero en fase sólida.



*Figura 3.5.4.i Curva de titulación del Anticlembuterol inmovilizado en la fase sólida.* Se sembró 100µl/posillo del suero purificado a distintas concentraciones a partir de (1:1000), en placas Maxisorp. En los posillos bloqueados con BSA 5% en PBS 1mM Cl<sub>2</sub>Mg, se hicieron reaccionar 100µl del trazador Clemb-BSA-Biotina a dilución (1:6000), 2 horas a temperatura ambiente. Luego de lavados se incubó con EFA (1:2000) y se reveló con pNPP. A partir de la dilución (1:2000) del suero, el anticuerpo comienza a ser el reactivo limitante.

Se construye una curva de calibración de clenbuterol con este diseño (figura 3.5.4.ii).



*Figura 3.5.4.ii Curva de calibración de clenbuterol con Anti-clenbuterol inmovilizado en fase sólida y Clemb-BSA-Biotina como trazador.* Se sembró 100µl de suero anti-clenbuterol purificado (1:2000) por posillo en placas Maxisorp. Se hizo reaccionar, 100µl de trazador biotinilado (1:3000) con 100µl de 10 a 0,000005ng/100µl de clenbuterol, 2 horas a temperatura ambiente. Luego de lavados se incubó con EFA (1:2000) y se reveló con pNPP. El rango de uso de esta curva abarca de 5 a 0,0005 ng/100µl de clenbuterol.

Se buscaron las mejores condiciones favorecieran una mayor asociación manteniendo baja la disociación de los inmunocomplejos. Se evaluaron distintos tiempos de incubación y temperaturas. Las mejores condiciones de incubación resultaron: 2hs a temperatura ambiente.

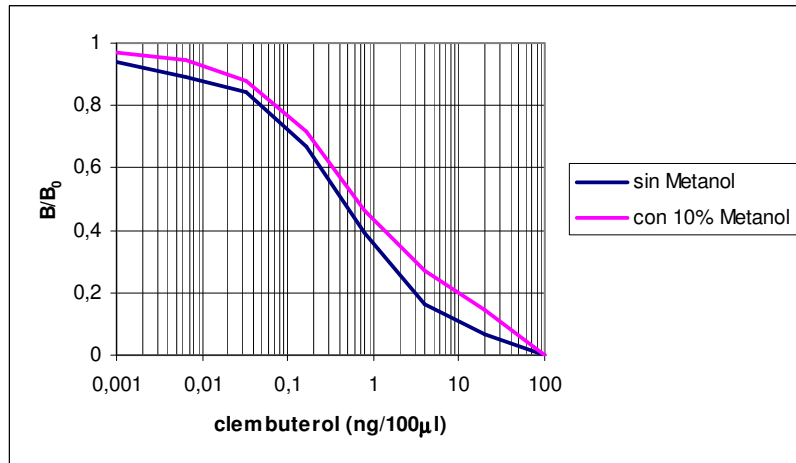
Se probaron distintos agentes bloqueantes: lacto albúmina, leche en polvo descremada y BSA. Con leche en polvo como agente bloqueante, la señal del revelado tenía una cinética de desarrollo del color muy veloz, pero la relación señal-fondo no variaba. El uso de lacto albúmina o BSA eran equivalentes, pero se eligió BSA por ser de menor costo y tener baja variabilidad como reactivo químico.

Se evaluó la estabilidad del anticuerpo unido a la fase sólida y el trazador, en las condiciones de guarda. El anticuerpo en la fase sólida, después del bloqueo de sitios activos, se puede guardar durante varias semanas en la heladera sin cambio en su actividad.

El trazador se guardó en distintas condiciones durante un mes. Congelado mantuvo el 72% de su actividad, a temperatura ambiente o a 4°, sólo el 40%. Diluido para su uso apenas mantiene un 8%. La mejor condición de conservación fue: liofilizado en una solución de BSA. En estas condiciones no perdió actividad aún guardado a temperatura ambiente, mientras que liofilizado sin BSA bajaba al 35%.

Por último, para poder utilizar el sistema para la detección de residuos de clenbuterol en distintas matrices, el sistema se probó con un 5% de metanol. En las extracciones de residuos frecuentemente incluyen pasos de concentración. Éstos se realizan por evaporación a sequedad de los extractos, bajo corriente de aire o nitrógeno, a bajas temperaturas para evitar descomposición del analito. El paso siguiente es entonces la resuspensión en un volumen menor de algún solvente que facilite la disolución, siendo el más frecuente el metanol. Este solvente podría desnaturalizar parcialmente los anticuerpos, o interferir de alguna forma en su reacción con el antígeno. Sin embargo, el empleo de un 10% de metanol en las soluciones de clenbuterol, produjo sólo un desplazamiento del punto medio de la curva (50% de la señal desplazada, EC 50), de 0,22ng/100µl a 0,27ng/100µl de clenbuterol (figura 3.5.4.iii).





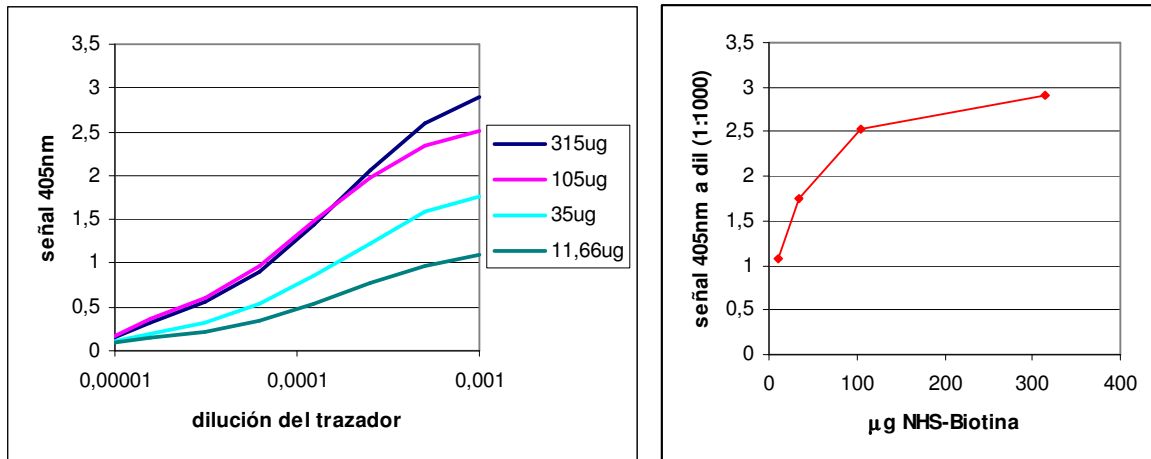
*Figura 3.5.4.iii Desplazamiento de la curva de calibración de clembuterol por metanol.* Se sembró 100µl de suero anti-clembuterol purificado (1:2000) por posillo en placas Maxisorp. Se hizo reaccionar, 100µl de trazador biotinilado (1:3000) con 100µl de 100 a 0,0064ng/100µl de clembuterol en buffer o con o sin agregado de 10% metanol, 2 horas a temperatura ambiente. Luego de lavados se incubó con EFA (1:2000) y se reveló con pNPP. Igual desplazamiento de la señal se produce a concentraciones mayores de clembuterol en presencia de metanol.

### 3.5.5 Síntesis de nuevos trazadores con distintas concentraciones de biotina.

Con el objeto de producir una mayor amplificación de la señal, se analizó la relación de moléculas de Biotina en la molécula del trazador. Asumimos para esto, que a mayor cantidad de Biotinas se unirán mayor cantidad de enzimas que producirán mayor desarrollo de color (ver figura 3.5.3.vi).

Se realizaron cuatro síntesis del trazador con 100µg de Clemb-BSA y distintas cantidades de NHS-biotina (315, 105, 35 y 11,66 µg). (La síntesis original había sido realizada con 70µg). Con los cuatro trazadores así obtenidos se realizaron curvas de

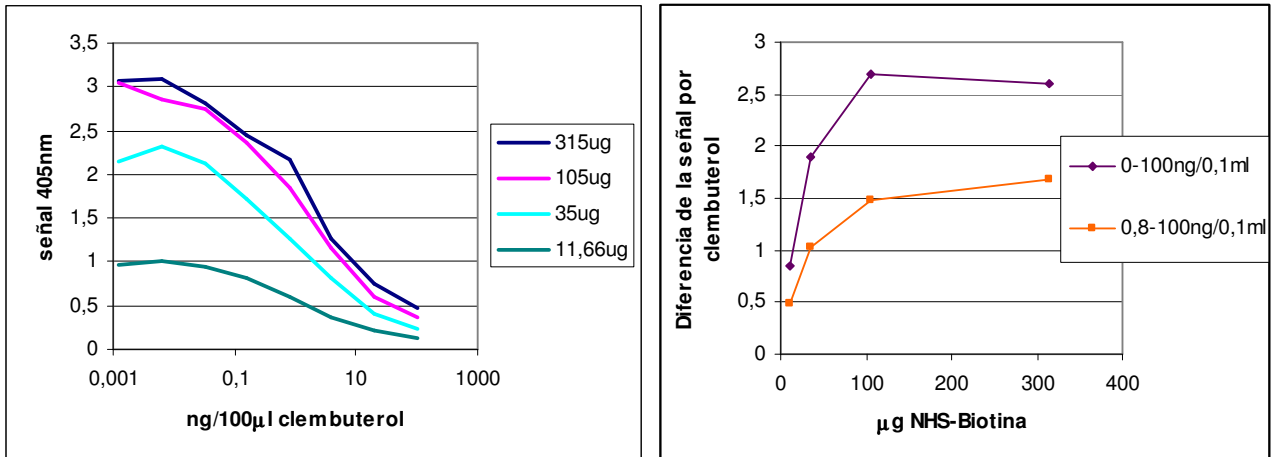
titulación de trazador contra antisuero en placa (1:2000) a diluciones de trazador variable entre (1:1000) y (1:100000) (figura 3.5.5.i).



*Figura 3.5.5.i Curvas de trazadores sintetizados con distintas concentraciones de NHS-Biotina.* Se sintetizaron cuatro trazadores con 11,66-35-105-315 $\mu$ g de NHS-Biotina. Se sembró 100 $\mu$ l de antisuero Anti-clembuterol (1:2000). Se hizo reaccionar 100 $\mu$ l de trazador biotinilado a diluciones de (1:1000) a (1:64000) con 100 $\mu$ l de buffer, 2 horas a temperatura ambiente. Se incubó con EFA (1:2000) y se reveló con pNPP. La señal máxima aumenta con la cantidad de NHS-Biotina.

A mayor cantidad de biotina incorporada al trazador, mayor señal del trazador. Sin embargo a cantidades mayores a 100 $\mu$ g de NHS-Biotina usada en la síntesis, el desarrollo de color no aumenta linealmente. No pudo establecerse si este efecto es debido a saturación de los sitios biotinilables, o a que por impedimento estérico existe un número máximo de moléculas de EFA que pueden unirse al trazador.

Se trazaron curvas de calibración de clembuterol de 100 a 0,0064ng/100µl (figura 3.5.5.ii).

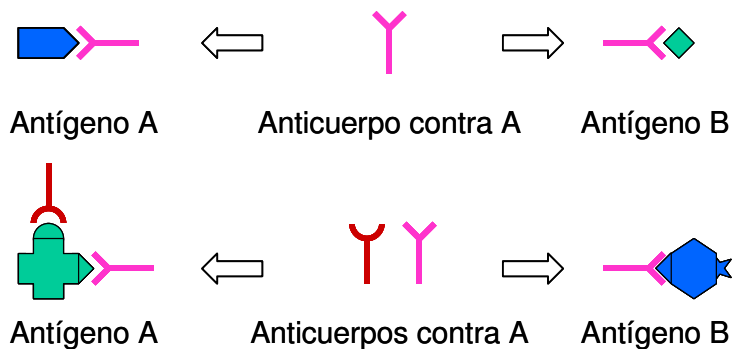


*Figura 3.5.5.ii Curvas de calibración con trazadores sintetizados con distintas cantidades de NHS-Biotina.* Se sembró 100µl de antisuero Anti-clembuterol. Se hizo reaccionar en tubos, 100µl de cada trazador biotinilado a dilución (1:4000) con 100µl de distintas concentraciones de clembuterol (100, 20, 4, 0,8, 0,16, 0,032, 0,0064 y 0ng/100µl), 2 horas a temperatura ambiente. Se incubó con EFA (1:2000) y se reveló con pNPP. A la izquierda se grafican las cuatro curvas en el rango de 10 a 0,01ng/100µl de clembuterol. A la derecha se grafica la diferencia de señal por desplazamiento con 100ng/100µl de clembuterol para cada trazador.

Todas las curvas permiten una cuantificación en el rango de 10 a 0,01ng/100µl de clembuterol. A mayor cantidad de biotina incorporada mayor complejo Clemb-BSA-Biotina-EFA formado, por lo tanto mayor desarrollo de color. Las dos curvas de mayor señal prácticamente se superponen, por lo que se elige 105µg de NHS-Biotina como óptima cantidad para la síntesis del trazador para el ensayo.

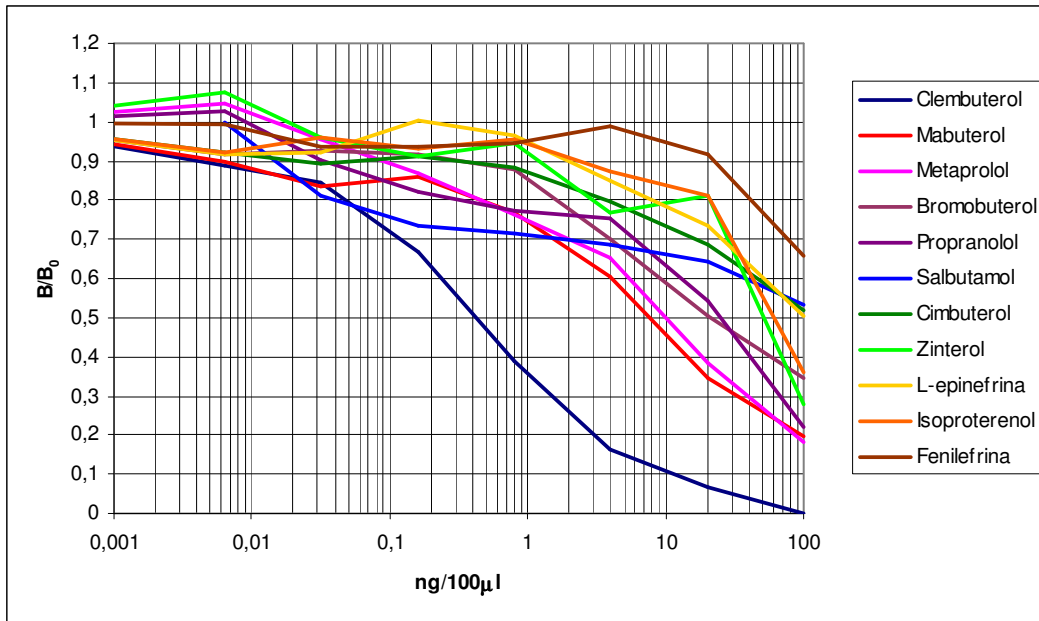
### 3.6. Estudio de la especificidad del enzimoimmunoensayo.

Una vez optimizado el ensayo con el trazador Clemb-BSA-Biotina se analizó la especificidad del método. La mayor fortaleza de los inmunoensayos reside en la especificidad, y se refiere al grado de discriminación del ensayo entre muestras negativas y positivas. El concepto de especificidad es complementario al concepto de reacción cruzada. Los anticuerpos tienen la habilidad de unirse a epitopes estructuralmente relacionados. Esta posibilidad está restringida a un limitado número de haptenos. La reacción cruzada está vinculada a dos conceptos: el primero se refiere a la capacidad de un anticuerpo policlonal con reactividad hacia estructuras muy distintas del mismo antígeno. El segundo concepto involucra la existencia de un epitope común en diferentes antígenos (Figura 3.6.i.). En este sentido la selectividad se determina por la relación entre las distintas constantes de afinidad del anticuerpo por los antígenos.



3.6.i. Conceptos de reacción cruzada.

Se construyeron curvas con distintos agonistas (figura 3.6.ii). Analizando esas curvas se estimó la concentración de cada agonista necesaria para desplazar el 50% de la señal del trazador en su unión con el anticuerpo (EC 50), los resultados se ven en la tabla 3.6.i.



*Figura 3.6.ii Curvas de calibración con distintos agonistas.* Se sembró 100µl de anti-clembuterol (1:2000). Se hizo reaccionar 100µl de Clemb-BSA-Biotina a dilución (1:2000), con 100µl de distintas concentraciones de clembuterol u otros agonistas (100, 20, 4, 0,8, 0,16 ,0,032 ,0,0064 y 0ng/100µl), por 2 horas a temperatura ambiente. Luego de lavados se incubó con EFA (1:2000) y se reveló con pNPP. Las curvas se realizaron por duplicado en cuatro experimentos con distintos agonistas y clembuterol como control cada vez. Se graficaron las curvas normalizadas como  $B/B_0 = (A - A_{100}) / (A_0 - A_{100})$ , tomando A como la absorbancia a 405nm, A<sub>100</sub> la absorbancia del a concentración 100ng/100µl de clembuterol, y A<sub>0</sub> la absorbancia a 0ng/100ul de clembuterol.

Tabla 3.6.i Reacción cruzada con agonistas. Estimación del EC 50.

Agonista $\beta$ -adrenérgico	EC 50 (ng/100 $\mu$ l)
Clembuterol	0,36
Mabuterol	3,50
Metaprolol	5,50
Propranolol	14,94
Bromobuterol	17,16
Zinterol	41,44
Isoproterenol	52,06
L-Epinefrina	180,82
Cinbuterol	212,59
Salbutamol	292,46
Fenilefrina	389,18

A mayor EC 50, la afinidad por el antisuero es menor, y esto puede correlacionarse con la existencia de epitopes comunes en diferentes antígenos o a la multiespecificidad del antisuero. En este caso las mayores reacciones cruzadas las producen el mabuterol y el metaprolol, y en el otro extremo se encuentran la epinefrina (agonista endógeno), el cinterol el salbutamol y la fenilefrina.

### 3.7. Interpretación de los resultados.

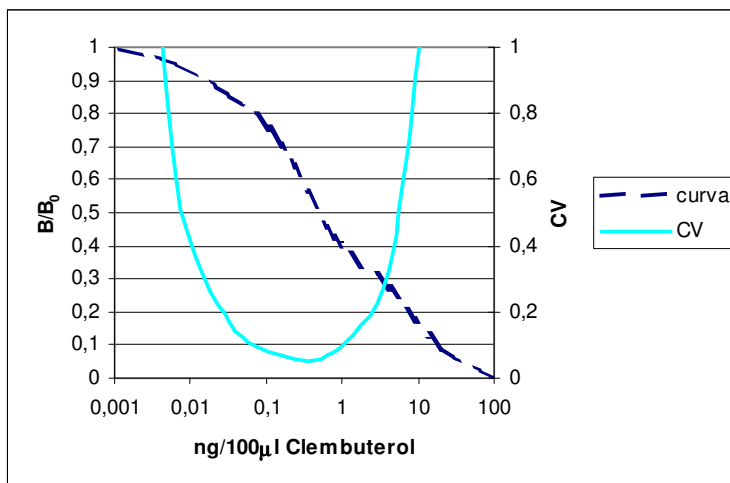
El método descrito, guarda relación lineal con el logaritmo de la concentración de clenbuterol en el rango de 0,5 pg a 5 ng en 100µl. Para análisis de muestras incógnitas con el empleo de este EIA, fue necesario adaptarlo a condiciones donde la muestra estuviera resuspendida en 10% de metanol. Esto modificó el rango de la curva de calibración, trabajándose a partir de aquí entre 100 y 0,0064ng/100µl.

La sensibilidad del ensayo, determina el rango potencial de utilización, y se define como la cantidad de analito requerida para producir un cambio en la respuesta, que es significativamente diferente de la respuesta obtenida en ausencia de analito. La sensibilidad de una curva dosis-respuesta sigmoidea, como lo es en el caso de un enzoinmunoensayo, decrece a cada extremo de la curva logarítmica. El rango de utilización de una curva de EIA es posible estimarlo considerando el coeficiente de variación (CV%) de cada punto de la curva. Esto expresa la desviación estándar (SD) como un porcentaje de la media.

Si la sensibilidad se define como, la diferencia de la señal por variación de la concentración, puede expresarse como la derivada:  $dS/dC$ , de la curva Señal (S) vs Concentración (C). El intervalo de confianza de un resultado,  $\Delta C$ , será una relación del error de la respuesta respecto de la sensibilidad a esa respuesta.  $\Delta C = \Delta S / (dS/dC)$ .

El rango de utilización de una curva se definirá como el intervalo donde el  $\Delta C$  no supere un dado porcentaje de la concentración C, por ejemplo: CV menor a un 20%, ( $CV = \Delta C / C < 0,2$ ). Este valor de CV% se establecerá en función del impacto de falsos positivos.

En la figura 3.7.i se graficó el CV promedio de 12 curvas de calibración de clenbuterol con 10% metanol, en función de la concentración. Se utilizó la aproximación lineal logit-log para calcular la derivada  $dS/dC$ .



*Figura 3.7.i Perfil de precisión.* Se calculó el coeficiente de variación (CV) como la desviación estándar de doce curvas de clenbuterol, dividido por la concentración (C). Se graficó el promedio de los CV y la curva normalizada promedio ( $B/B_0$ ), en función de C. Entre 0,02 y 4 ng/100µl de clenbuterol el CV se mantiene menor a 0,2, y crece en los extremos de la curva.

El CV de la curva es mínimo en la región central de la curva. A concentraciones por encima de 10ng/100µl o menores a 0,001ng/100µl el coeficiente de variación crece debido a que la curva de calibración se aplana, es decir la señal no cambia por cambios en la concentración. El rango de uso, definido como aquél donde el CV es menor al 20%, será de 0,02 a 4ng/100µl. La sensibilidad calculada en ese rango decrece en tres órdenes de magnitud a mayores concentraciones y se calcula un valor en el EC50 (0,36ng/µl) de 0,42.



### 3.8. Discusión del capítulo 3.

En este trabajo se ha desarrollado un enzimoimmunoensayo altamente específico, sensible y robusto. Estas características se lograron gracias a la obtención de un trazador biotinilado que amplifica la señal, un antisuero con buena especificidad y un diseño de ensayo adecuado que minimiza las interferencias.

Por acoplamiento del clenbuterol a una proteína se lograron derivados que pudieron ser utilizados en varias etapas del desarrollo. Esta reacción de acoplamiento a macromoléculas resultó fácilmente reproducible y con alto rendimiento. El primer derivado fue el Clemb-BSA que pudo ser fijado en forma sencilla a una fase sólida (placa) para realizar un enzimoimmunoensayo por titulación de anticuerpos. Esta reacción de acoplamiento se utilizó también para producir una molécula con capacidad antigénica (Clemb-HSA) y así producir anticuerpos específicos. Un procedimiento similar permitió el acoplamiento de clenbuterol a fosfatasa alcalina (Clemb-FA) que se utilizó como marcador en otro diseño de enzimoimmunoensayo. Finalmente, al incorporar biotina a Clemb-BSA, se logró un trazador Clemb-BSA-Biotina (CBB) con capacidad de formar un complejo con el anticuerpo y con avidina fosfatasa alcalina.

En el desarrollo del trabajo se obtuvieron tres trazadores con capacidad de unión al anticuerpo y a un sitio de revelado. El primero de ellos Clemb-FA, se utilizó con éxito en un ensayo, mostrando que los sitios activos de la enzima no eran afectados por la reacción de acoplamiento. Sin embargo el Clemb-FA perdía actividad después de unas semanas, lo que requería reajustar el ensayo con frecuencia.

Se logró acoplar el clenbuterol a biotina por una molécula “puente”, y así poder utilizar el sistema avidina-biotina para unir la enzima al clenbuterol. Como beneficio adicional, la molécula acoplada alarga el espacio entre el clenbuterol y la biotina, lo que reduce posibles impedimentos estéricos entre un anticuerpo, que reconozca al epítipo del antígeno, y la avidina que se une a la biotina por el otro extremo. Se obtuvieron así dos derivados: el primero usando Tiramina como molécula “puente” (CTB) y el segundo usando una molécula de BSA (CBB).

El derivado con Tiramina pudo ser utilizado con éxito en varios experimentos, pero el derivado Clemb-BSA-Biotina resultó más conveniente por muchas razones: demostró reacción específica con el anticuerpo anticlenbuterol, es fácil de sintetizar y purificar, es sumamente estable a distintas condiciones de almacenamiento, y más importante aún, es posible optimizar el nivel de amplificación de la señal controlando la cantidad de moléculas de biotina incorporadas por molécula de BSA.

Con el empleo del derivado Clemb-HSA se inocularon conejos para la producción de anticuerpos específicos contra clenbuterol. El antisuero producido resultó eficiente para enzimoensayos, demostró una alta afinidad por el clenbuterol, por la molécula derivada Clemb-BSA y los trazadores Clemb-BSA-Biotina y Clemb-Tiramina-biotina, tanto en solución como fijado a una fase estacionaria. El antisuero mostró buena estabilidad durante el almacenamiento congelado, y una vez extraída la fracción IgG del suero éste se pudo guardar congelado por meses, o a 4°C. El anticuerpo sembrado y secado sobre poliestireno, no presentó pérdidas detectables de actividad, luego de semanas de almacenamiento a 4°C.

Este anticuerpo resultó muy resistente a las condiciones de ensayo y almacenamiento, incluyendo los medios de incubación con 5% de metanol. Es de suponer que el metanol produzca desnaturalización, pero a dicha concentración no es completa. Al presentar el antígeno un epítopo de tamaño pequeño, como el clenbuterol, la probabilidad de que la desnaturalización afecte esa porción de la IgG que identifica al antígeno sería más baja, e incluso podría estar afectando a algunos clones. Por otro lado, debido a la naturaleza hidrofóbica de la unión del epítopo al paratopo, el metanol podría inclusive favorecerla; bajando la actividad del agua en el medio y aumentando un entorno no polar, propicio para la unión.

En lo que respecta a la especificidad del anticuerpo, fue evaluada la reacción cruzada con otros agonistas. La mayor reacción cruzada se produce con mabuterol y metaprolol, mientras que la reacción cruzada con epinefrina (el agonista endógeno) resultó extremadamente baja. De acuerdo con los valores calculados, para lograr la misma señal, se requeriría de una concentración quinientas veces mayor de epinefrina. Esto implica que el análisis en muestras biológicas no requeriría de preparaciones previas complicadas, ya que los agonistas endógenos no interferirán en el ensayo.

Estas herramientas permitieron diseñar sistemas de enzimoimmunoensayos, cada uno con distintas condiciones de uso y propiedades. El primero de ellos, por titulación de anticuerpos (sección 3.4.1), utiliza Clemb-BSA fijado a la fase estacionaria, donde son captados anticuerpos remanentes de la reacción con el clenbuterol de la muestra. Con este sistema se lograron excelentes detectabilidades y rangos analíticos. Con el empleo del revelador pNPP se logró la cuantificación en el rango de 0,1 a 10ng de clenbuterol en 100µl, mientras que con Formazán se corrió este rango a niveles más bajos de 0,01 a

1ng de clenbuterol en 100µl. Como contrapartida este diseño demandaba muchos pasos de reacción, insumiendo mucho tiempo, lo que lo hace poco práctico para un análisis de rutina. Por último el revelador Formazán, es extremadamente sensible a la fosfatasa como a otras interferencias, aumentando el fondo de color en la lectura. Esto es particularmente inconveniente tomando en cuenta que el ensayo está pensado para ser utilizado en muestras biológicas complejas.

Los siguientes diseños utilizaron distintos trazadores que competían con el clenbuterol por su unión al anticuerpo. El primer sistema utilizó de Clemb-FA; éste compite con el clenbuterol por su unión al anticlenbuterol y un segundo anticuerpo (antiIgG), unido a la fase estacionaria, captura el complejo final (sección 3.5.2). Con este sistema se obtuvo un rango de trabajo de 0,0001 a 0,001ng de clenbuterol en 100µl con Formazán como revelador. Este rango resulta muy tentador para el análisis de residuos, pero posee como inconvenientes, la cantidad de pasos y tiempo, y las interferencias del Formazán y la estabilidad del trazador Clemb-FA ya mencionados.

El segundo sistema utiliza el anticuerpo anticlenbuterol desarrollado, fijado por su extremo Fc a la fase sólida. Sobre este antisuero se realiza la reacción por competencia entre el trazador y el clenbuterol de la muestra. El trazador fijado al antisuero es finalmente revelado por reacción con EFA. El rango de las curvas de titulación con el trazador Clemb-BSA-Biotina (CBB), es de 0,0005 a 5ng de clenbuterol en 100µl. Al poder guardar las policubetas ya sembradas con el anticuerpo y bloqueadas a 4°C, el ensayo se reduce a un paso de incubación de dos horas, seguido de incubación con EFA y revelado. Esto es sumamente conveniente y práctico para su uso rutinario. Además, el empleo del revelador pNPP evita los inconvenientes del Formazán, manteniendo

igualmente una alta detectabilidad. Este sistema permitió el uso de 5% de metanol, lo que es conveniente en muestras que han pasado por un proceso de extracción, purificación y concentración, dado que deben ser resuspendidas en este alcohol para una efectiva solubilización del residuo.

Este último diseño fue estudiado en su perfil de precisión (sección 3.7), que permitió un rango de uso de tres órdenes de magnitud (0,02 a 4ng de clenbuterol en 100µl) dentro de un coeficiente de variación del ensayo es menor al 20%.

La sensibilidad en el rango antes mencionado, y definida como la diferencia de la señal por variación de la concentración, ( $dS/dC$ ) decrece en tres órdenes de magnitud a mayores concentraciones y en el EC50, el valor calculado para la sensibilidad es de 0,42. Esto implica que en el punto medio de la curva, una variación de la concentración de 0,36 a 0,39ng/100µl (10%), produciría un cambio en la señal de absorbancia de 0,500 a 0,512, lo que es perfectamente detectable en un lector de ELISA convencional.

El ensayo finalmente desarrollado, de diseño competitivo y el siguiente complejo final detectado: fase estacionaria-Anti Clenbuterol-CBB-EFA, cumple con características de sensibilidad, selectividad, precisión y robustez que lo hacen sumamente apto para el análisis de residuos. En el desarrollo presentado, se han logrado importantes herramientas (trazadores, anticuerpos, otros diseños de enzimoimmunoensayo), de importantes características que pueden ser utilizados para otros tipos de problemas de detección como se detallará en el capítulo 5.

#### **4. Farmacocinética de $\beta$ -agonistas en bovinos por enzimoimmunoensayo.**

Los agonistas  $\beta$  adrenérgicos como el clenbuterol, se han utilizado como promotores del crecimiento y mejora en el rendimiento de la producción animal. Si bien este empleo está prohibido, el clenbuterol está permitido para su uso en medicina humana como broncodilatador y medicina veterinaria como tocolítico para facilitar las condiciones de parto. En este último caso las dosis recomendadas son del orden de 0,3mg en vacas, 0,3 a 0,45mg en yeguas, 0,21mg en ovejas y 0,15mg en cerdas. Estas dosis son mucho menores a las requeridas para un efecto anabolizante del clenbuterol en estas especies, y el tratamiento implica la restricción que los animales tratados no deben ser faenados para consumo antes de un determinado plazo, según la especie y el tejido. De esta forma el período de retiro de la droga, desde la última aplicación es de 12 días para la detección de residuos en riñón e hígado y de 3 días para carne y leche de bovinos, mientras que en ovejas se requiere de 16 días para la detección en órganos y 7 días en carne y leche (Planipart, Boehringer Ingelheim, certificado de SENASA prov. N° 89512).

La dosis terapéutica como tocolítico es de 0,8 $\mu$ g/kg de peso corporal, administradas dos veces al día por un período de 5 días. Los residuos de clenbuterol puede detectarse luego de 14 días (0,3ng/g) en riñón e hígado, mientras que en retina se detectan cantidades mayores (27ng/g) donde aún permanecen residuos detectables luego de 42 días posteriores a la última administración (Elliot et al, 1995). Una dosis eficiente como anabólico en bovinos debe ser cinco veces mayor y se extiende por más de 30 días de administración. En estos casos la curva de eliminación en plasma presenta dos fases, la primera de una vida media de 10 horas y la segunda de 2,7 días. (Elliot et al, 1993).

Numerosos trabajos muestran la afinidad del clenbuterol por la melanina, y por lo tanto la capacidad de los tejidos pigmentados de acumularlo (Sauer y Anderson, 1994; Howells et al, 1994; Smith et al, 2002). Debido a esto la retina y el pelo son matrices recomendadas para el análisis de estos residuos. En particular el pelo tiene la ventaja que por no ser un tejido irrigado, no metaboliza ni elimina al clenbuterol (Adam et al, 1994, Pollettini et al, 1995; Durschz et al,1995).

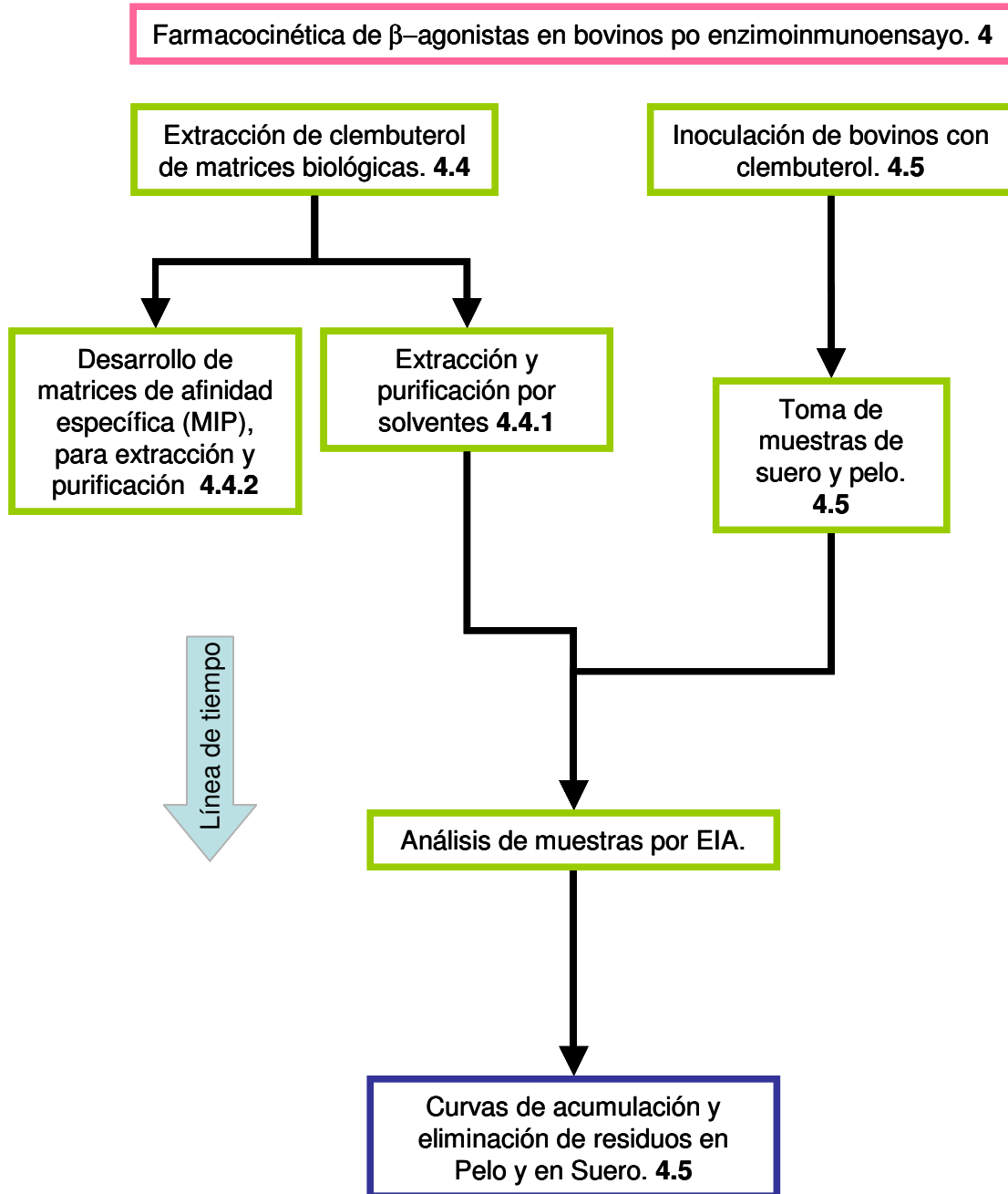
En esta parte del trabajo se determinarán las concentraciones de clenbuterol halladas en pelo y suero de animales tratados. Se inyectó una única dosis terapéutica y una segunda dosis tres veces mayor, del orden de una dosis anabolizante, treinta días más tarde, y se analizó la presencia de residuos durante un período de un mes posterior a cada administración.

El enzimoimmunoensayo es una herramienta útil para la determinación de pequeñas cantidades residuales de drogas veterinarias en animales. Los residuos de clenbuterol se analizaron con el empleo del EIA desarrollado y descrito en esta tesis.

#### **4.1. Objetivos del capítulo.**

El segundo objetivo es caracterizar la farmacocinética del clenbuterol en bovinos con el empleo del enzimoimmunoensayo desarrollado.

## 4.2. Desarrollo experimental de las investigaciones.





### 4.3. Materiales y métodos.

**Tratamiento de los animales.** En el experimento se utilizaron tres novillos *holando-argentino* de entre 2,5 a 3 años de edad y aproximadamente 450 kg. De acuerdo al fenotipo de estos animales tienen pelaje blanco con amplias regiones de pelaje negro. Dos de ellos fueron tratado con una inyección intravenosa yugular de 10ml de un formulado veterinario que contiene 0,03mg/ml (0,3mg por animal) de clenbuterol, de acuerdo a las instrucciones del protocolo. Treinta y ocho días posteriores a la primera inyección, a los mismos dos animales se les aplicó una dosis mayor, de 65ml (1,95mg por animal) en dos veces, por la mañana y por la tarde. Los tres animales fueron alimentados a pasto con libre acceso al agua de bebida. Cada semana posterior a las aplicaciones se tomaron muestras de pelo de la misma región del animal, de manera que siempre represente el pelo recién crecido. Todas las muestras de conservaron a 4°C hasta su análisis. Los días siguientes a las inyecciones se tomaron muestras de sangre, que se centrifugaron en el día para la separación del suero y se guardaron a -20°C hasta su análisis.

**Extracción de clenbuterol del pelo.** El pelo bovino fue lavado con una solución de SDS 1% y enjuagado con agua muchas veces, luego se secaron en papel de filtro por 24hs y se procedió a la extracción. Para ella se pesan 100mg de pelo, a los que se agrega 2,5ml de NaOH 5N y calienta durante 10 minutos a 95°C. Luego de enfriar a temperatura ambiente, se comienza la extracción por agregado de 3ml de t-butilmetil éter, con agitación con vórtex, seguido de 15 minutos de incubación en baño de ultrasonido y 15 minutos de mezcla por rotación a temperatura ambiente, finalmente se centrifuga por 10 minutos a 300 g. Este procedimiento se repite una vez y las fracciones

orgánicas se juntan y se evaporan a sequedad bajo corriente de aire (Haasnoot et al, 1998). El residuo se resuspendió en metanol y se diluyó en buffer de EIA. La recuperación del método de extracción se calculó por agregado de 10ng de clenbuterol por g de pelo en 1ml de metanol. La muestra fortificada se incubó toda la noche a temperatura ambiente y se secó en estufa a 80°C antes de iniciar la extracción.

***Extracción de clenbuterol del suero.*** Las muestras de suero sanguíneo se diluyeron con igual volumen de agua con 5% de metanol, y se hacen pasar por una columna de extracción en fase sólida de C18, (LiChrolut RP-18, 100mg, Merck) previamente acondicionada con 5ml de NaOH 0,001M. La columna luego, se lava con 1ml NaOH 0,001M y 2 ml de agua con 5% de metanol. Finalmente se eluye con 1ml de metanol que se evapora a sequedad y se resuspende en buffer de EIA. La recuperación de esta extracción se evaluó con muestras fortificadas con 100ng/ml de clenbuterol.

***Enzimoimmunoensayo.*** Para el análisis de las muestras se utilizó el enzimoimmunoensayo descrito en el capítulo anterior, con el trazador biotinilado, construyendo curvas de 100 a 0,0064ng/100ul de clenbuterol en buffer con un 10% de metanol. El agregado de este porcentaje de metanol no afecta significativamente la señal y permite resuspender las muestras luego de la evaporación. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y los resultados fueron calculados por aproximación logit-log de la curva de patrones.

***Polímeros de Impresión Molecular (MIP).*** En tubos delgados de vidrio se colocaron: 300µl de cloroformo con o sin 4mg de clenbuterol, 15µl ácido metaacrílico, 135 µl de etilenglicol dimetaacrilato y por último 60µl de 2,2'azobisisobutironitrilo (24mg/ml en

cloroformo). Se desgasificaron los tubos sometiéndolos a baño de ultrasonido por 10 minutos, se purgaron con nitrógeno y cerraron con teflón y parafilm. Se irradiaron con luz de 336nm a 4°C por 24 horas. Finalizada la polimerización se fracturaron mecánicamente los tubos con los polímeros, y se molieron con Politron a velocidad intermedia a alta, lavando con agua destilada para eliminar las partículas más pequeñas. A la matriz pulverizada, se le agregaron 2ml de acetonitrilo y se decantó por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de retirado sobrenadante se repitió la operación dos veces y se lavó cinco veces con 0,5ml de metanol:ácido acético (9:1) y cinco veces con 0,5ml de metanol. Se secó el polímero decantado por centrifugación con vacío.

Para las pruebas de especificidad de los MIP, se incubaron 1mg de polímero triturado, con 0,23µg de <sup>3</sup>H-clembuterol (26400cpm) y 50 o 0µg de clembuterol frío, en acetonitrilo, a un volumen final de 500µl. La incubación se realizó con rotación suave por 5 minutos. Por centrifugación se separó el sobrenadante y lavó tres veces con 500µl de metanol y para la elusión se incubó dos veces por 5 minutos con 500µl de metanol:ácido acético (9:1). Se midió la radioactividad de los sobrenadantes y lavados posteriores por centelleo líquido. Las pruebas se realizaron por triplicado.

#### **4.4. Extracción de clenbuterol de matrices biológicas.**

Para analizar el clenbuterol que permanece como residuo en los tejidos animales, es necesaria la puesta a punto de técnicas de extracción y purificación. Estas técnicas deben tener en cuenta la separación del analito de sustancias que, por similitud estructural, produzcan reacción cruzada con el anticuerpo y por consiguiente falsos positivos en la detección por EIA.

Las técnicas de preparación de la muestra incluyen pasos de extracción entre fases líquido-líquido o en extracción en fase sólida, que utilizan de propiedades particulares de polaridad o afinidad por una fase, de un grupo de compuestos con similitud estructural. Otras técnicas más específicas pueden utilizar cromatografías en geles de anticuerpos (cromatografía de inmovilización de anticuerpos) donde la extracción de matriz compleja resulta mucho más específica, y se reduce a sustancias que sean reconocidas por los anticuerpos en el gel.

##### **4.4.1 Extracción y purificación de las muestras.**

Se adaptaron técnicas descritas para análisis en pelo y suero (Degand et al, 1992; Sauer et al, 1993; Adam et al, 1994) (figura 4.4.1.i). Para estimar el porcentaje de recuperación de éstas, se realizó sobre una cantidad de clenbuterol conocida.

El procedimiento final se escogió por simplicidad y efectividad, con una recuperación promedio de 56% para 10ng iniciales de clenbuterol agregado por g de pelo. Este método sin embargo presentó una señal de fondo en los blancos de  $(7\pm 2)$ ng/g de pelo negro. Esta interferencia pudo ser causada por algún residuo del proceso de extracción

que pudiera producir algún tipo de reacción inespecífica con la enzima o desnaturalización parcial del anticuerpo (por ejemplo NaOH).

Para la extracción del suero se evaluaron tres técnicas distintas y se escogió la descrita en la sección 4.3, por ser la de mejor rendimiento, que presenta un 83% de recuperación.

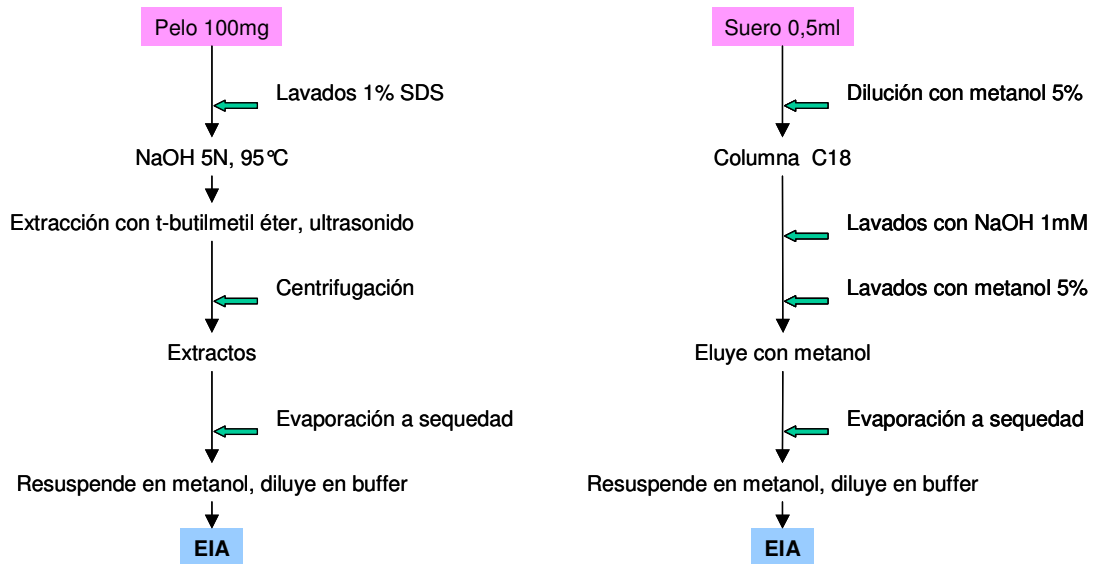


Figura 4.4.1.i Procedimientos de extracción de clenbuterol del pelo y del suero.

#### 4.4.2 Matrices de afinidad. Polímeros de impresión molecular (MIP).

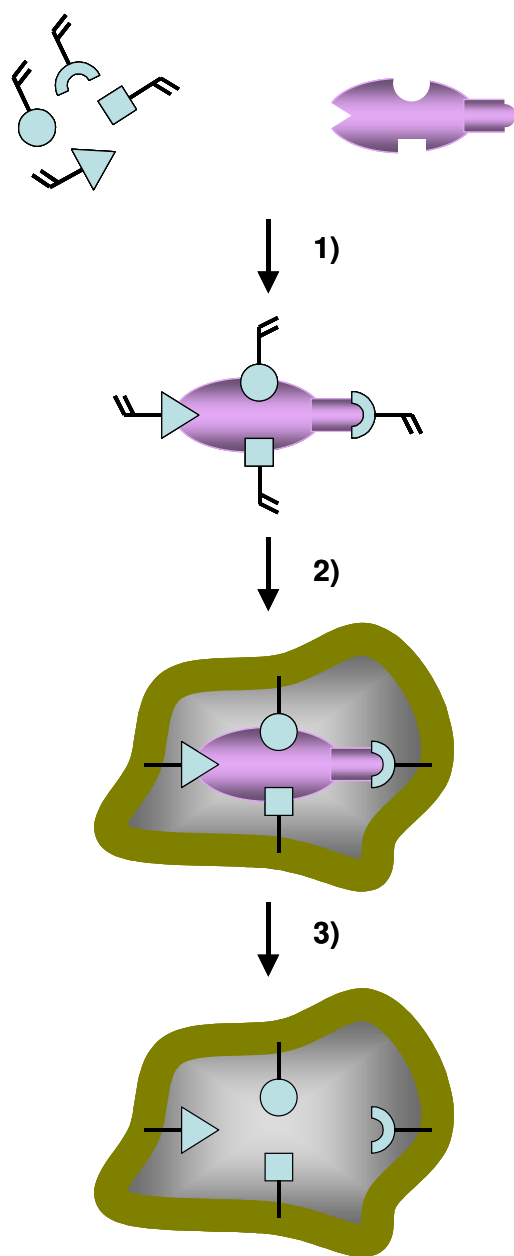
La Impresión Molecular (Molecular Imprinted Polymers, MIP) es una técnica descrita para preparación de matrices de afinidad específica. Una matriz polimérica es sintetizada con sitios de reconocimiento específicos para una dada molécula. Estos polímeros, se pulverizan y las partículas pueden usarse luego como matrices de cromatografía líquida,

con fines preparativos o analíticos. También han sido propuestas como símiles de anticuerpos para ensayos inmunoanalíticos.

La Impresión Molecular involucra la polimerización de monómeros funcionalizados interactuando con una molécula molde según distintos mecanismos. La remoción de la molécula molde, deja a la matriz polimérica con sitios complementarios con afinidad selectiva por dicha molécula. El polímero reconocerá a la molécula por sitios de unión con memoria espacial y estereospecíficos. Una ventaja de estos MIP respecto de moléculas biológicas como receptores, enzimas o anticuerpos, incluye su robustez física, alta resistencia a temperaturas y presiones, y a la acción de los ácidos, bases, iones metálicos y solventes orgánicos (Zhang, 2006; Ansell, 1996).

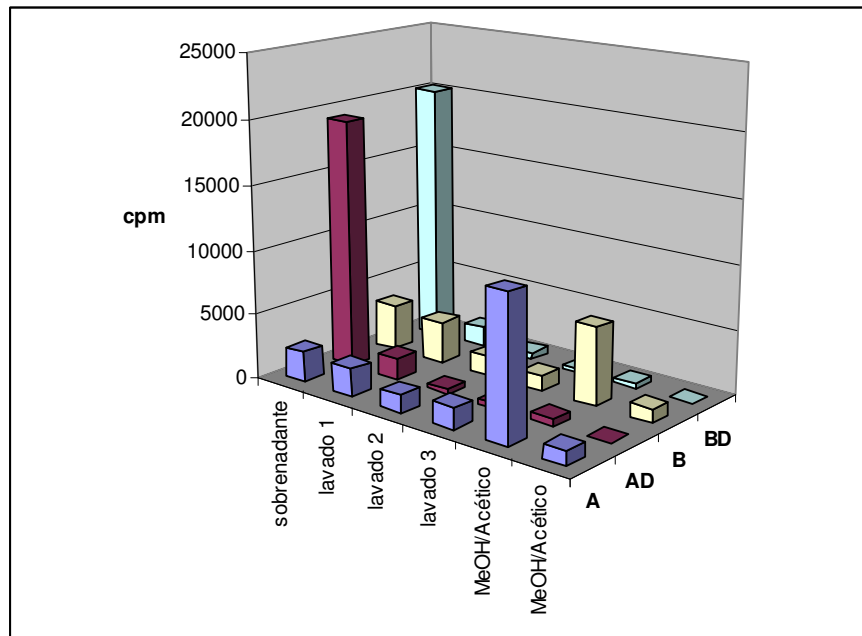
La preparación de estas partículas poliméricas fue pensada para su uso en el tratamiento previo (clean-up) de la matriz biológica donde debe ensayarse el clenbuterol. Sin embargo, existe la factibilidad de usarlo como sustituto del anticuerpo, puesto que ya ha sido descrito con éxito en otros sistemas (Vlatakis et al, 1993).

Para los ensayos se utilizó como moléculas *molde* al clenbuterol, como monómero el ácido metaacrílico como monómero, como entrecruzador el dimetaacrilato de etilenglicol y como iniciador el 2,2-azobis-(2-methylpropionitrilo) (AIBN), en acetonitrilo (Andersson y Mosbach, 1990). Las polimerizaciones se realizaron por irradiación a 366 nm, simultáneamente con y sin clenbuterol para obtener un polímero blanco (control) sin Impresión Molecular.



*Figura 4.4.2.i Representación esquemática de la preparación de MIP. 1) Monómeros funcionales interactúan reversiblemente con una molécula molde generando un complejo en solución; 2) por agregado del entrecruzador y el iniciador se polimeriza, reteniendo en el polímero la interacción entre la molécula molde y los monómeros; 3) la molécula impresa es removida, dejando en el polímero sitios de unión complementarios, con grupos funcionales posicionados y el formato.*

Los polímeros obtenidos se trituraron y se pasaron por malla de 25 $\mu$ m, se lavaron repetidas veces con solventes de distinta polaridad para eliminar la molécula *molde*. Se realizaron entonces ensayos por competencia incubando el polímero MIP y el blanco con clembuterol marcado con trítio, y separando luego el sobrenadante por centrifugación. Se midió la radioactividad en el sobrenadante y en distintos solventes de lavado posteriores. En la figura 4.4.2.ii se esquematizan los resultados obtenidos en dos experiencias.



*Figura 4.4.2.ii Polímero de Impresión Molecular.* Se incubó 1mg del polímero sintetizado con clembuterol como molécula *molde* (A) o el polímero sin molécula *molde* (B), con clembuterol tritiado, en acetonitrilo por 5 minutos a temperatura ambiente con rotación. Simultáneamente se incubaron los polímeros en presencia de clembuterol frío para desplazar al clembuterol tritiado de su unión al MIP (AD y BD). Luego de centrifugación se midió la radioactividad remanente en los sobrenadantes y lavados posteriores con acetonitrilo y los eluidos con metanol:ácido acético (9:1). La radioactividad en los sobrenadantes de AD y BD, son mayores, debido a un desplazamiento del clembuterol radiactivo de su adsorción a los polímeros por clembuterol frío. En los eluidos de los polímeros A y B se midió la radioactividad proveniente de desorción inespecífica. En el eluido de A, la radioactividad es levemente mayor, esta diferencia indicaría unión específica del clembuterol tritiado por este polímero.



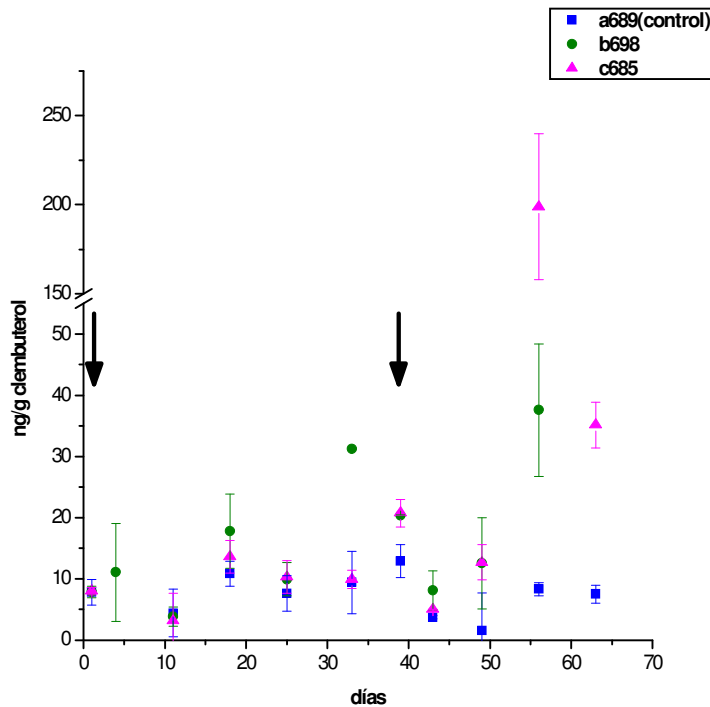
El MIP de clenbuterol (A) captó mayor proporción que el polímero blanco (B), sin embargo esta diferencia, unión específica, resultó pequeña (92% A versus 77% B en porcentaje de las cuentas totales). La elusión posterior con metanol:acético confirmó unión específica de clenbuterol por el polímero A.

El primer inconveniente en el empleo de este polímero en matrices biológicas, fue la imposibilidad de encontrar condiciones de incubación en solventes acuosos, posiblemente debido a la naturaleza de las fuerzas que gobiernan la afinidad molecular. Si bien se logró un MIP, estos resultados no fueron suficientes como para considerar esta matriz apta para extracción específica de residuos de clenbuterol.

#### **4.5. Estudios de determinación de clenbuterol en bovinos.**

Se efectuó un trabajo para determinar el tiempo de aparición y de eliminación del clenbuterol en pelo de bovinos. Se utilizaron tres novillos holando-argentinos de entre 2,2 a 3 años, peso aproximado 450kg, identificados por los números a689, b685 y c698. A dos de ellos (b685 y c698) se les inyectó vía endovenosa un preparado veterinario de clenbuterol (30ug/ml), 10ml en una primera dosis y 65ml 38 días después. Desde la primera aplicación y hasta un mes posterior a la segunda dosis se recogieron muestras de pelo negro a intervalos de aproximadamente una semana. El día uno, día de la primera inyección, se realizó el primer corte de pelo en una zona dada. El día cuatro y cada semana posterior, se rasuró en la misma zona del pelaje, que indicarían la acumulación secuencial del residuo. Para evaluar la acumulación total en este período, se rasuró otra zona del pelaje el día uno, y se dejó crecer hasta el final de la experiencia, cuando se tomó la muestra.

En la figura 4.5.i. se graficaron los resultados del análisis de residuos en pelo para cada animal.



*Figura 4.5.i Residuos de clembuterol en pelo.* Se analizó la acumulación secuencial de clembuterol en pelo negro de bovinos. Las flechas indican los días de administración: día 1, 300µg y día 38, 900µg de clembuterol por animal. Los c685 y b698 corresponden a las muestras de animales tratados, mientras que a 689 corresponde al control.

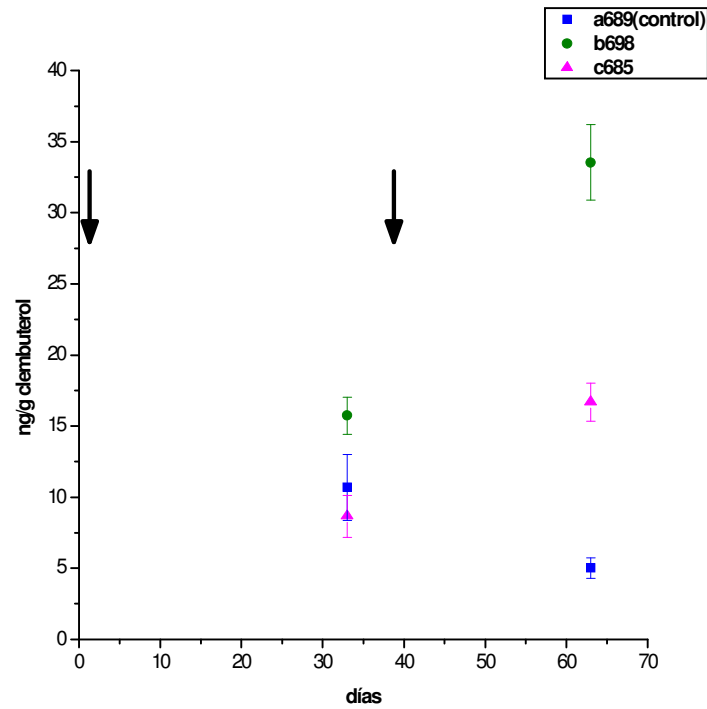
Con la primera dosis (300µg por animal), es posible la detección de clembuterol, sólo en uno de los dos animales inyectados (b698) al día 33 del experimento. La cinética de acumulación y la concentración máxima alcanzada son distintas en ambos animales.

Esto puede deberse a distintas características de cada individuo: distinto metabolismo de clembuterol, distinta velocidad de crecimiento del pelo. Como fue mencionado en el capítulo introductorio (sección 2.3.2) y en el comienzo de este capítulo, el clembuterol

tiene una alta afinidad por la melanina, por lo que la distinta proporción de melanina en el pelo podría también afectar la acumulación de residuos de clenbuterol. Estas diferencias entre animales coinciden con el trabajo de I. Durschz et al (1995), inclusive en pelo blanco, que si bien tiene una acumulación mucho menor que en pelo negro, no es nula, posiblemente por afinidad del clenbuterol a otro componente de la matriz o a melanina residual.

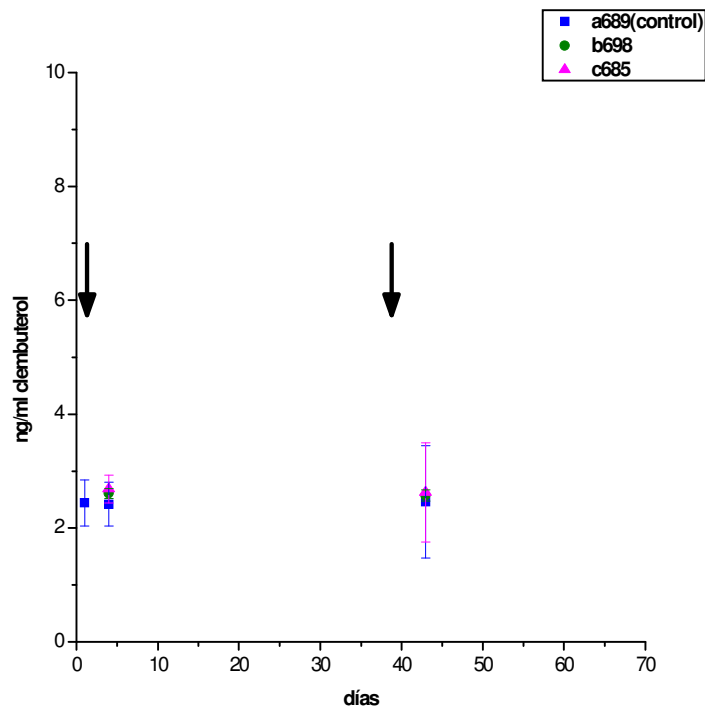
Del análisis de los datos se puede ver un notable aumento de clenbuterol en pelo después de la segunda inyección (900µg por animal).

Muestras analizadas de pelo crecido a lo largo de cada experimento, tomadas los días 33 y 63 se presentan en la figura 4.5.ii. En estos análisis se detectó acumulación de clenbuterol inclusive con la dosis más baja, en el animal b698, luego de casi un mes de la inyección.



*Figura 4.5.ii Residuos de clenbuterol en pelo.* Se analizó la acumulación total de clenbuterol en pelo negro crecido a lo largo del experimento en bovinos. Las flechas indican los días de administración: día 1, 300µg y día 38, 900µg de clenbuterol por animal. Los c685 y b698 corresponden a las muestras de animales tratados, mientras que a689 corresponde al control.

Se analizaron las muestras de suero más próximas a los días de inyección de clenbuterol en los animales. Los resultados se muestran en la figura 4.5.iii.



*Figura 4.5.iii Residuos de clenbuterol en suero.* Se analizó la presencia de clenbuterol en suero de bovinos. Las flechas indican los días de administración: día 1, 300 $\mu$ g y día 38, 900 $\mu$ g de clenbuterol por animal. Los c685 y b698 corresponden a las muestras de animales tratados, mientras que a689 corresponde al control.

Las concentraciones de clenbuterol detectadas en suero se encuentran cercanas a la señal de fondo de 2,26 ng/ml promedio de los valores obtenidos por éste método para el animal control, inclusive después de la segunda dosis.

#### 4.6. Discusión del capítulo 4.

El clenbuterol es un  $\beta$  agonista, activo por vía oral, que fue originariamente desarrollado para uso terapéutico. Se ha utilizado en medicina veterinaria como tocolítico y en tratamiento de enfermedades bronquiales, sin embargo su uso abusivo como promotor del crecimiento, representa un riesgo para los consumidores de carnes. Por esta razón, es necesario un control adecuado de residuos.

Utilizando el enzimoimmunoensayo desarrollado y descrito en esta tesis, se detectaron residuos de clenbuterol en pelo y suero de animales inyectados. Para realizar los análisis se desarrollaron técnicas de extracción y purificación de las muestras. Se intentó el desarrollo de matrices con afinidad (polímeros MIP), para extracción selectiva de clenbuterol. El polímero obtenido mostró adsorción por el  $\beta$ -agonista, pero no resultó suficientemente específica para utilizarla en la extracción de microcantidades en matrices complejas. Las incubaciones además, requerían de medios no acuosos, lo que dificulta su empleo en matrices biológicas. La metodología por digestión alcalina del pelo resultó ser más apropiada, rápida y económica.

El EIA desarrollado y descrito en el Capítulo 3, resultó particularmente simple, estable y de alta detectabilidad, que lo hace especialmente apropiado para las mediciones a muy bajos niveles de clenbuterol. Con él se pudo cuantificar residuos de clenbuterol en pelo bovino, provenientes de una sola inyección, hasta 30 días posteriores a la misma. El clenbuterol fue detectado en los dos animales, que habían sido tratados con una cantidad significativamente menor a la usada como dosis anabolizante (2mg en una

dosis versus 40mg en una semana). Paralelamente se verificó que en suero la concentración de residuos no es detectable al día siguiente de la aplicación.

Se pudo observar un retraso en la aparición del clenbuterol en el pelo. Esto se puede interpretar como el tiempo que el pelo demora en crecer a través de la piel, para recuperar clenbuterol en el corte. Los resultados en pelo presentaron grandes diferencias entre animales, debido posiblemente a características de cada individuo. Sin embargo, la gran ventaja del análisis en pelo proviene de la alta afinidad del clenbuterol por la melanina, que evita la eliminación metabólica, produciendo una acumulación mayor que en otras matrices de análisis como el hígado, la orina o el suero, y su permanencia a muchos días posteriores a la aplicación del producto.

Desde la perspectiva del control de residuos, el análisis en pelo resulta además una matriz muy interesante para animales vivos, que podrían incluir por ejemplo a caballos de carrera, donde se sospeche al clenbuterol como agente de dopaje, por sus características de broncodilatador.

Para el clenbuterol como anabólico, se ha descrito el “efecto reverso de los  $\beta$ -agonistas”, que produciría una acumulación de grasa y reducción de la masa muscular luego de un período posterior al retiro de la droga (Elliott et al, 1993). Este efecto hace que se pierda la ganancia en músculo lograda por el clenbuterol como anabolizante, a menos que se continúe su tratamiento hasta tiempos próximos a la faena. En estos casos el nivel de residuos acumulado sería mucho mayor. En nuestro experimento, se demuestra que los residuos de una práctica de este tipo serían detectables en pelo hasta treinta días más tarde, lo cual la desalentaría. Pero además, este método permite saber si

el animal estuvo expuesto a clenbuterol en dosis mucho más bajas, y abre la posibilidad a normas que prohíban inclusive el uso veterinario, acentuando una política de “tolerancia cero”.



## **5. Metabolismo de clenbuterol. Caracterización de receptores $\beta$ -adrenérgicos.**

Muchos factores pueden influir en la formación de residuos de una droga. La biodistribución y la formación de residuos en una dada especie animal puede ser influenciada por una gran variedad de factores que incluyen: la edad, el sexo, la dieta o el estado de salud del animal (Fink-Gremmels y van Miert, 1994). Como la molécula de un dado compuesto puede sufrir muchos cambios metabólicos en el animal vivo, el control de los tratamientos veterinarios, por análisis de residuos de la droga madre, puede resultar inapropiado, por lo cual, es necesario conocer su farmacocinética, sus metabolitos y la distribución de los residuos en el animal, como la interacción con otras drogas, a fin de validar un método de detección para residuos.

Los  $\beta$  agonistas, se suelen utilizar en combinación con otras drogas como los glucocorticoides (Groot et al, 1996). Existe evidencia de que ciertas hormonas pueden afectar la capacidad de los tejidos de responder a agonistas  $\beta$  adrenérgicos por aumento de la expresión de receptores específicos, o la excreción de ciertos anabólicos, efecto causado por la dexametasona (Illera et al, 1998; Courtheyn et al, 1993; Calvarese et al, 1994).

El metabolismo de una droga es un aspecto esencial de la farmacología por varias razones, por un lado porque controla el nivel de concentración en sangre, por lo tanto su actividad terapéutica y o su posible efecto tóxico. Segundo, algunas drogas requieren biotransformarse en metabolitos que son especies activas farmacológicamente. Tercero, de una droga se puede generar un metabolito altamente reactivo que se una covalentemente a proteínas o a ácidos nucleicos, generando severos efectos colaterales o

patologías, como mutaciones del ADN. Cuarto, las drogas pueden afectar la expresión y la actividad de las enzimas que las metabolizan, modificando la respuesta del organismo a compuestos que son biotransformados por esos sistemas enzimáticos.

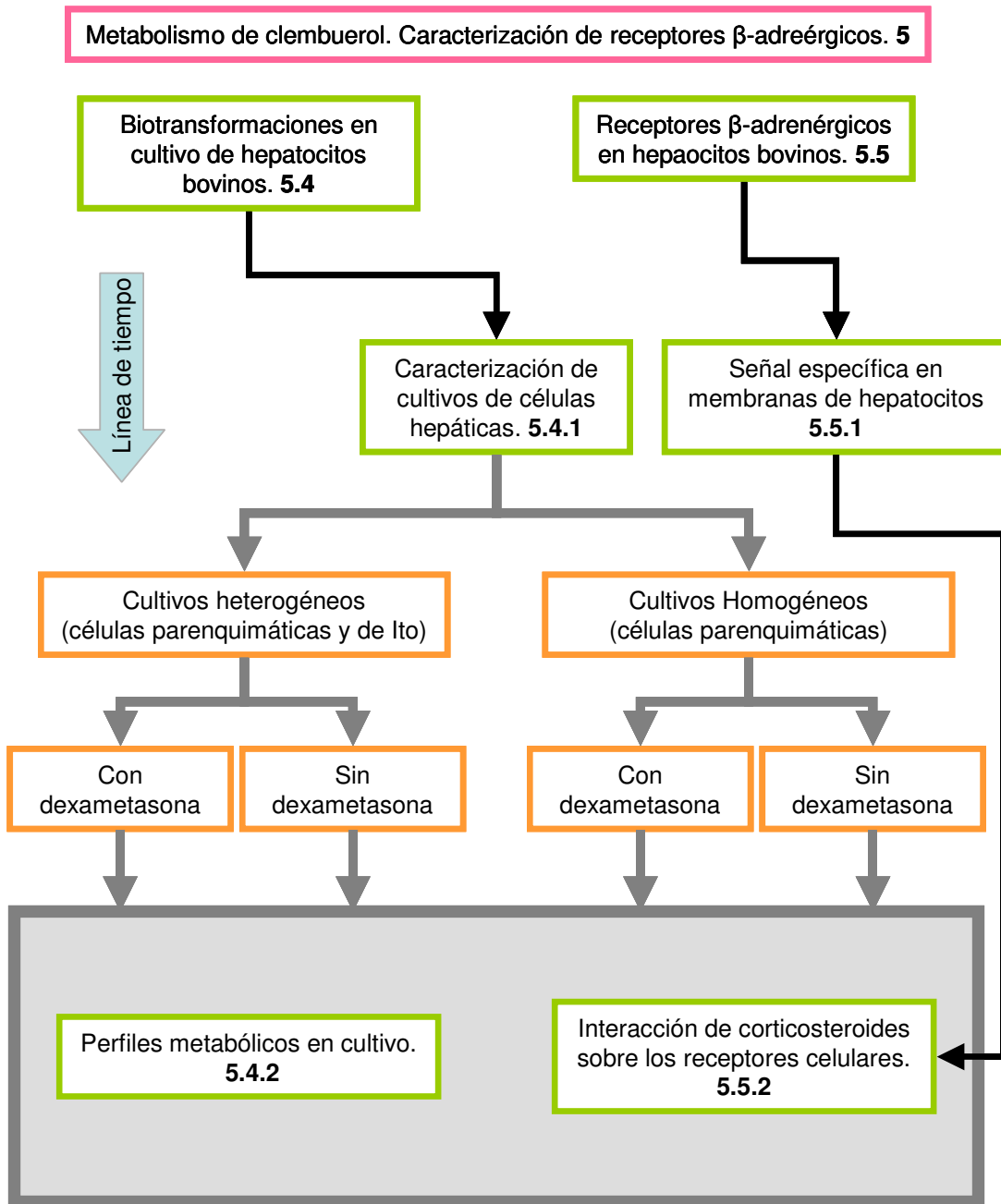
Existen muchas enzimas involucradas en el metabolismo de los xenobióticos que sirven para proteger al organismo de estos agentes químicos. Básicamente, estas enzimas convierten xenobióticos, generalmente lipofílicos, en metabolitos hidrosolubles para poder eliminarlos por orina o bilis. Estos sistemas enzimáticos que actúan en el metabolismo de drogas, se han clasificado en fase I (oxigenasas, reductasas, hidrolasas) y fase II (enzimas de conjugación) (Jakoby, 1980). Entre estos sistemas, los citocromos P450 (CYP), juegan un papel predominante (Nelson et al, 1993). Como el hígado es el principal órgano involucrado en la biotransformación de xenobióticos, muchos sistemas hepáticos *in vitro* se utilizan para investigar dichos procesos (Maurel, 1996). Estas enzimas se expresan a niveles altos en el hígado pero también en otros órganos como: intestino, riñón, pulmones, piel. Los cultivos primarios de hepatocitos son capaces de llevar a cabo las fases I y II del metabolismo, constituyéndose en un marcador de calidad de las preparaciones *in vitro* obtenidas (Shull et al, 1986).

### **5.1. Objetivos del capítulo.**

La parte final de este trabajo tiene como objetivo establecer la posible regulación de receptores  $\beta$  adrenérgicos en hígado y cambios metabólicos del clenbuterol por interacción con corticosteroides.

Para este trabajo se ha puesto a punto una técnica de cultivo primario de hepatocitos sin perfusión, se han caracterizados los tipos celulares obtenidos, y se ha incluido un paso de separación de células parenquimáticas. Los cultivos primarios en monocapa se utilizaron luego, para el estudio del metabolismo de clenbuterol o de receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

## 5.2. Desarrollo experimental de las investigaciones.



### 5.3. Materiales y métodos.

**Clembuterol radioactivo.**  $^{14}\text{C}$ -clembuterol fue gentilmente donado por el Dr. David Smith. Actividad específica 9,14  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ , 20285 dpm/ $\mu\text{g}$ , pureza radioquímica mayor al: 95%, (Figura 5.3.i).

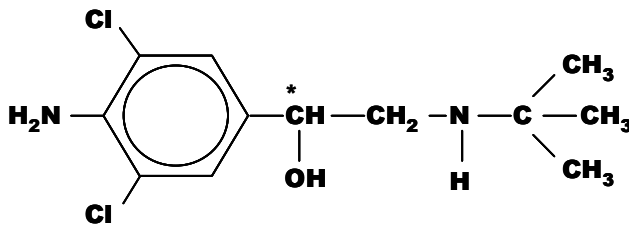


Figura 5.3.i.  $^{14}\text{C}$ -Clembuterol. (\*) Posición de  $^{14}\text{C}$  en la molécula.

**Muestras de hígado bovino.** Los hígados fueron gentilmente donados por EcoCarnes Argentina. Se extrajeron los hígados bovinos de terneros y novillos sanos recién faenados en el frigorífico. Al hígado se le extrajo el lóbulo caudal, cortándolo por su base, y éste se sumergió en etanol 70% por 30 segundos, para reducir la contaminación superficial. Inmediatamente se transportó al laboratorio en una bolsa estéril, sumergida en hielo. El traslado no debe demorar más de 30 minutos.

**Reactivos y soluciones.** Colagenasa tipo II, 390units/mg, solución salina balanceada de Hank (HBSS), medio Eagle modificado de Dulbecco (D-MEM) con mezcla de nutrientes Ham F-12 (1:1), con L-glutamina y clorhidrato de piridoxina (D-MEM/F12), suplemento A 100x de insulina (1g/l), transferrina (0,55g/l) y selenito de sodio (0,00067g/l) (TIS), antimicótico Fungizone (250ug de anfotericina B y 250ug de desoxicolato de sodio por ml), de Gibco BRL Invitrogen Corporation. Hepes en buffer

HBSS, pH 7,8, conteniendo 1,78mM NaHCO<sub>3</sub>, 5,5mM d-glucosa, 10mM Hepes, (HBSS-Hepes). EGTA 10mM en PBS, pH llevado a 7,0 con 10M NaOH, esterilizado o filtración y agregado a PBS hasta una concentración final de 0,1M. Penicilina G sódica 300.000UI, Gentamicina 0,15g y Estreptomicina 0,20g, en 300ml de PBS (ATB 100x). Percoll estéril de Pharmacia. Suero fetal bovino (FBS), de Laboratorio Toulbey S.R.L. Argentina. Anticuerpo policlonal de conejo contra Albúmina Bovina (anti-BSA) y clembuterol biotilado (CBB o CTB), desarrollados en nuestro laboratorio. Anticuerpo monoclonal de ratón específico contra  $\alpha\gamma$  actina de músculo (anti-Actina) de Novocasta Laboratories. Protein Block (suero normal de cabra), Multilink, Avidina, de Biogenex. Blocking kit de Vector Laboratories. Avidina conjugada a Isotiocianato de Fluoresceína (Avidina-FITC), de SIGMA. 3,3'diaminobenzidina tetracloruro (DAB) (0.02%) en buffer Tris-HCl (0.05M), pH 7.6, y 100ul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> agregados previo a su uso.  $\beta$ -glucuronidasa Tipo H-1 de Hellix Pomatia 486000unidades/g, 7-etoxicumarina (7-EC) y 7-hidroxycumarina (7-HO), de Sigma. Cocktail centellante Ultima Gold, de Packard, Canberra Company.

***Aislamiento de hepatocitos.*** Se preparó una solución de Colagenasa II, 500ng/ml en buffer HBSS-Hepes, esterilizada por filtración y mantenida en hielo hasta su uso. En área estéril se extrajeron porciones internas de tejido, que se transfirieron en forma aséptica a un vaso de precipitados con PBS ATB 2x. El tejido se cortó finamente con tijeras y se lavó varias veces con 1,9g EGTA en 500ml de PBS para remover coágulos. Luego de un último lavado con PBS (sin EGTA), la muestra se transfirió a un frasco cónico con hendiduras con la solución de colagenaza fría y se agitó suavemente durante 12 minutos (150ml de solución de Colagenasa solución cada 1 a 5g de tejido). La disgregación se detuvo por agregado de 10ml de FBS y 100ml de HBSS con 5%

FBS enfriado en hielo. La suspensión de células se filtró por una gasa y se centrifugó 5 minutos a 50 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet de células se lavó dos veces con PBS ATB 2x, centrifugando a 150 g por 2 minutos cada vez (Fry et al, 1976; Donkin y Armentano, 1993; Walsh et al, 1995). Finalmente el pellet se suspendió en PBS para purificación posterior de las células parenquimáticas, o en medio de crecimiento para determinar la viabilidad celular por el método de exclusión de azul Tripán (Shull et al, 1986).

***Purificación de células parenquimáticas.*** Para obtener una subpoblación pura de células parenquimáticas, se vertieron 5ml de la suspensión celular obtenida del aislamiento, sobre 15ml de Percoll 60% (9 partes de Percoll con 1 parte de PBS 10x, diluido (6:10) en PBS), en un tubo cónico de policarbonato de 50ml. Los tubos se centrifugaron a 400 g a 4°C por 5 min. El sobrenadante se descartó y el pellet se lavó con PBS. Las células así purificadas se suspendieron en medio de crecimiento para determinar su viabilidad (Alston-Smith y Pertof, 1995).

***Cultivo de células.*** Las células fueron sembradas sobre placas de poliestireno a una densidad de 4,5 a  $1 \times 10^5$  de células viables por  $\text{cm}^2$ , en medio de crecimiento (D-MEM/F12) con 10% de FBS, y fueron cultivadas a 37°C en atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$ . Luego de dos o tres días, se controló la contaminación y se cambió el medio. En lo sucesivo se observaron las células y se cambió el medio dos veces por semana. En el tercer cambio de medio el suero fue reducido a 5% de FBS. Para realizar cultivos en suspensión, 1ml de la suspensión celular ( $5 \cdot 10^5$  células por ml) se cultivó en tubos estériles con una suave agitación. En esas ocasiones el FBS fue reemplazado por TIS en el medio de cultivo.

***Estudios metabólicos.*** Con el fin de comprobar la capacidad para metabolizar drogas de las células, en cada nuevo cultivo se incluyó un experimento de metabolismo con 7-etoxicumarina. Al medio de cultivo se agregó 25 $\mu$ M de 7-EC y se midió la biotransformación de 7-EC a 7-OH, cuantificando el 7-OH formado por HPLC. Previo al análisis se interpuso una reacción enzimática para liberar los conjugados glucurónico y sulfato de 7-OH. Brevemente: 1ml de  $\beta$ -glucuronidasa 2mg ml<sup>-1</sup> en buffer acetato 1,25M pH 5, se incubó con 1ml de medio toda la noche a 37°C. Los metabolitos fueron extraídos tres veces con 500 $\mu$ l de cloroformo, llevados a sequedad bajo corriente de nitrógeno, y finalmente redisoluertos en 100 $\mu$ l de buffer glicina 0,5M pH 11. El análisis por HPLC se realizó con un equipo Hewellett Packard 1050 de bomba cuaternaria, columna Hypersil de 3 $\mu$ m ODS 4.6x150mm, de Phase Separations, y guarda columna Widedore C<sub>18</sub> ODS 4x3mm, de Phenomenex. La fase móvil consistió en metanol, ácido acético 10% y agua, en gradiente: (20:2:88) de 0-2min. y (60:2:38) de 10-15min, a 1ml/min de flujo y 35°C. La detección se realizó por absorbancia a 320nm. Bajo estas condiciones los tiempos de retención para 7-OH y 7-EC fueron de 8,2 y 13,0 min. respectivamente.

***Metabolismo de clenbuterol en cultivo de hepatocitos.*** Se cultivaron células de hígado bovino sobre placa, con medio sin suero con adición de 1mg/ml de insulina bovina y 1mg/ml de BSA. Para ver cambios en el metabolismo por presencia de un corticosteroide, las células fueron estimuladas por al menos dos días con 100 $\mu$ M de dexametasona en el medio. Simultáneamente se cultivó igual cantidad de placas sin dexametasona como controles. En otros experimentos las células fueron cultivadas en



suspensión en medio sin suero con TIS, y las células fueron estimuladas o no con dexametasona. Luego del período de estimulación, se agregó al medio de cultivo 25µM de clenbuterol, <sup>14</sup>C-clenbuterol 230.000cpm/ml.

***Caracterización de las células por inmunocitoquímica.*** Las células cultivadas en monocapa, fueron lavadas con PBS y fijadas con formaldehído al 3,7% en PBS a temperatura ambiente. Previo a la inmunocitoquímica el formaldehído fue lavado de las células con agua por incubación durante 5 minutos y luego en PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. Para minimizar la señal de fondo en el revelado, se inactivaron peroxidasas endógenas por incubación de las células a temperatura ambiente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100vol) al 10% en PBS durante 30 minutos. La unión inespecífica fue bloqueada antes de la incubación con el primer anticuerpo con solución bloqueante (protein Block) por 20 minutos a temperatura ambiente. Las incubaciones con primer anticuerpo se realizaron en cámara húmeda a temperatura ambiente durante una hora, luego toda la noche a 4°C y finalmente una hora a temperatura ambiente. Como primer anticuerpo se utilizaron anti- α actina (1:100) y anti-BSA, a una dilución apropiada en PBS, como control se incubó con PBS. Las células se incubaron luego con un segundo anticuerpo, anti globulinas de conejo, acoplado a biotina (Multilink) por una hora a temperatura ambiente y con Avidina conjugada con Peroxidasa (1:20) también por una hora a temperatura ambiente. Después de cada paso las células fueron lavadas con PBS por 15 minutos. Los sitios inmunorreactivos fueron revelados con DAB preparado en el momento. La reacción se detuvo a los 5 minutos por agregado de agua destilada y se tiñeron los núcleos celulares con Hematoxilina.

***Immunofluorescencia de receptores.*** Se cultivaron células hepáticas sobre cubreobjetos con o sin dexametasona 100 $\mu$ M en el medio de crecimiento sin suero. Para fijarlas se las lavó dos veces con PBS<sup>++</sup> (0,9mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5mM MgCl<sub>2</sub> en PBS), por 5 minutos, y se las incubó con formaldehído 3,7% en PBS<sup>++</sup> por 10 minutos o 2% por 20 minutos, a temperatura ambiente. Después de algunos lavados con PBS<sup>++</sup>, se secaron las células bajo corriente de aire y se guardaron hasta su uso a -20°C. El día del experimento las células fijadas sobre el cubreobjetos se lavaron por 5 minutos con PBS<sup>++</sup> y sus sitios inespecíficos se bloquearon con 2mg/ml de BSA en PBS<sup>++</sup> por 15 minutos, a 4°C. Para marcar receptores  $\beta$ .adrenérgicos se incubó con CBB a diferentes concentraciones en el buffer de bloqueo, durante una hora a temperatura ambiente. Como control de especificidad se agregó 25mM de clenbuterol a incubaciones con CBB. También se incluyeron controles sin CBB. Luego de la incubación con el biotinilado las células se lavaron tres veces con buffer de bloqueo y se incubaron 30 minutos con Avidina-FITC (1:2000) en el mismo buffer a 4°C. Finalmente se lavaron y las células se montan sobre portaobjetos, con glicerol 90% en PBS. Se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia, Nikon Optiphot Epifluorescence.

***Perfil cromatográfico de metabolitos de clenbuterol por HPLC.*** El análisis por HPLC se realizó con un equipo Hewlett Packard 1050, de bomba cuaternaria con dos sistemas cromatográficos distintos, basados en la literatura. *Sistema A:* columna de C18 Vydac 150x4,5 mm 5 $\mu$ m con guardacolumna Hypersil ODS 5 $\mu$ m 20x4mm. La fase móvil consistió en 0,05 M fosfato de potasio pH 3,5, acetonitrilo y metanol, en el siguiente gradiente: (90:5:5) a (80:10:10) de 0 a 10min.; (80:10:10) a (20:40:40) de 10 a 20min.; (20:40:40) a (90:5:5) de 24 a 25min.; a un flujo constante de 1ml/min, a 40°C (Sauer et al, 1999). *Sistema B:* columna de C18 Vydac 250x4.5 mm 5 $\mu$ m con guardacolumna

Hypersil ODS 5 $\mu$ m 20x4mm. La fase móvil consistió en buffer acetato de amonio 10mM, pH 3,2 y acetonitrilo, en el siguiente gradiente: (95:5) de 0 a 4min.; (95:5) a (93,75:6,25) de 4 a 10min., (93,75:6,25) a (85:15) de 30 a 35min., (85:15) a (70:30) de 45 a 47min.; (70:30) hasta los 54min.; a un flujo constante de 1ml/min, a 40°C (Zalko et al 1998). La cromatografía fue constantemente monitoreada por detección U.V. a 254nm, y se colectaron fracciones de 1ml o de volúmenes menores según el experimento. La presencia de radioisótopos fue medida por adición de 0,5ml de cocktail centellante y analizadas en un contador de centelleo líquido Wallac 1414.

***Extracción de membranas de células de hígado bovino.*** Se pesó una porción de aproximadamente 2g de hígado bovino, se cortó finamente con tijeras y se trasvasó a un vaso de Politrón, conteniendo 3ml de 0,3M de sacarosa en NaHCO<sub>3</sub> 1mM pH= 7,5. Se procesó con émbolo de teflón, a velocidad intermedia en hielo, por 15 minutos con intervalos. Se filtró por malla knitex, ayudando con vacío y el filtrado se centrifugó a 10.000 g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se centrifugó a 105.000 g por 2 horas a 4°C y el precipitado se resuspendió en PBS 10mM MgCl<sub>2</sub>. Una dilución en NaCl 1M del extracto se utilizó para la cuantificación de proteínas, por el siguiente procedimiento: se colocaron 200 $\mu$ l de solución por posillo de una placa Polysorp, a la que se agregó 200 $\mu$ l de reactivo de Bradford. Se midió en un lector de ELISA a 590nm, y se comparó contra una curva de BSA en NaCl 1M.

***Especificidad de CBB en membrana de hepatocitos bovinos.*** Para las distintas pruebas de especificidad de los trazadores en las membranas de hepatocitos, se sembró 100 $\mu$ l de suspensión de membranas en PBS, por posillo de placas Polysorp. Se dejó incubar toda una noche y se lavó cinco veces con PBS<sup>++</sup>. Una de las tiras se reservó para medir

proteínas. Las otras se utilizaron en los ensayos, para lo cual se bloquearon sitios activos remanentes con 400µl por posillo de una solución 5% BSA en PBS<sup>++</sup>, durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavados con PBS<sup>++</sup>, se incubó el trazador con o sin clenbuterol en un volumen final de 100µl de PBS<sup>++</sup> con 0,1%BSA, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras tres lavados con PBS<sup>++</sup>, se incubó por 30 minutos con EFA (1:2000) en PBS<sup>++</sup> a temperatura ambiente y se reveló con pNPP. En al tira reservada para medir proteínas unidas a la fase sólida, se incubó 100µl de NaOH 1M por posillo a temperatura ambiente por no menos de 4 horas. Luego se neutralizó con 100µl de ClH 1M y se agregó 200µl de reactivo de Bradford y se midió la absorbancia a 590nm. Se comparó contra una curva de BSA en NaCl 1M.

## **5.4. Biotransformaciones en cultivo de hepatocitos bovinos.**

### **5.4.1 Cultivo de hepatocitos bovinos**

El hígado es responsable de muchas funciones metabólicas, sintéticas y de almacenamiento. También es responsable de la activación y detoxificación de metabolitos endógenos y sustancias exógenas. El cultivo primario de hepatocitos en monocapa, provee un eficiente sistema para el estudio de efectos hormonales sobre dichas funciones celulares. Sin embargo existen algunas limitaciones en estos cultivos, como la no homogeneidad de las poblaciones celulares. Por lo tanto, para entender el efecto de una hormona en el hígado es necesario analizarlo en sus distintos tipos celulares.

Las células parenquimáticas, comúnmente llamados hepatocitos, constituyen el 90% del volumen total del hígado, aunque representan el 65% del número relativo de células. Otras células hepáticas, las células de Ito o Stellate son una frecuente contaminación de los cultivos de células parenquimáticas. Son las responsables del 80-90% de la acumulación de vitamina A y sintetizan muchos componentes de la matriz extra celular hepática, como colágeno, laminina, fibronectina y glicosaminoglicanos (Berry y Fiend, 1969; Berry et al, 1991; Alston-Smith y Pertoft, 1995). Esta población celular colabora con la adhesión de los hepatocitos en cultivo y su separación, probablemente la reduzca. Por otro lado, las células de Ito, por su alta velocidad de proliferación, pueden representar, para el crecimiento de las células parenquimáticas, un importante factor competitivo en lo que respecta al consumo de nutrientes y espacio.

Los hepatocitos adultos en cultivo se encuentran arrestados en fase G<sub>0</sub>, y no se dividen. Algunos autores indican, que ha diferencia de las células de Ito, el crecimiento de los hepatocitos es dependiente de la densidad celular. A baja densidad, los hepatocitos proliferan, mientras a alta densidad no proliferan, pero se diferencian en fenotipos específicos del hígado, e inducen marcadores específicos como la producción de albúmina (Nakamura et al, 1983a; Nakamura et al, 1983b)

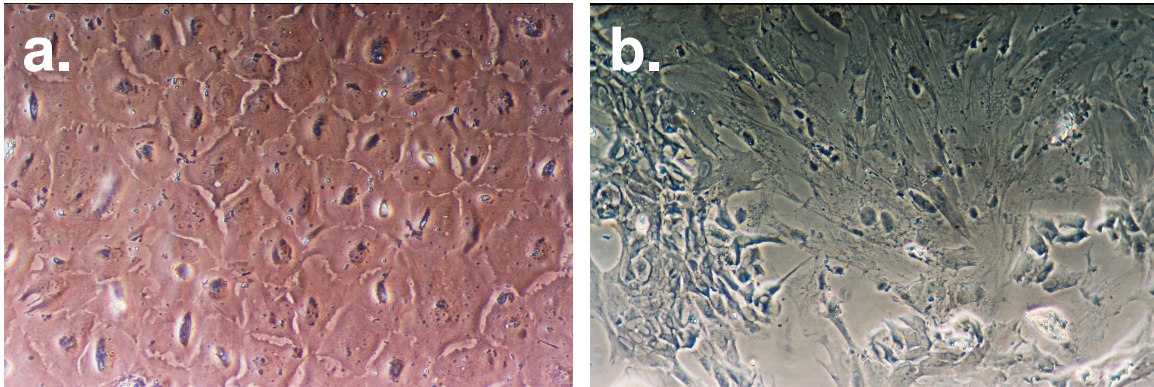
En general, los métodos de desagregación de células de un tejido para cultivo primario, incluyen un paso de perfusión con colagenasa (Donkin y Armentano, 1993; Forsell et al, 1985; Shull et al, 1986). Sin embargo, cuando se necesita utilizar muestras de mamíferos grandes, como bovinos, el paso de perfusión es tecnológicamente complicado. Otra desventaja es que el hígado debe mantenerse completamente fresco durante la perfusión, caso contrario pueden formarse coágulos que obstruyan el paso de los líquidos perfundidos (Alston-Smith y Pertoft, 1995; Fry et al, 1976).

Con la metodología de disgregación mecánica utilizada en este trabajo, se obtuvo un rendimiento promedio de células viables fue de  $(1.60 \pm 0.57) \times 10^8$  células por g de tejido. La población celular resultante fue heterogénea, y células fibroblásticas (de Ito) predominan. Estas células tienen una velocidad de multiplicación muy alta que permitió alcanzar confluencia en menos de dos semanas.

Cuando se agregó un paso de purificación de las células disgregadas por colchón de Percoll, se seleccionaron células de mayor tamaño con un rendimiento menor:  $(1.76 \pm 0.95) \times 10^7$  células por g de tejido. En este caso, luego de dos semanas de cultivo sólo se observaron colonias aisladas en la placa. En las semanas subsiguientes, aunque

no llegara a confluencia, las colonias ya fueron suficientemente grandes como para realizar reacciones inmunocitoquímicas de caracterización.

Se observaron los cultivos por microscopio de contraste de fase. En la figura 5.4.1.i.a. se presenta una fotografía de hepatocitos en el día 18 de cultivo. Las células exhiben membranas bien definidas, núcleo, nucleolo y citoplasma granular. Cuando no se realiza una separación de subpoblaciones, las células son más pequeñas, de morfología alargada y se distingue con más dificultad el núcleo (figura 5.4.1.i.b).

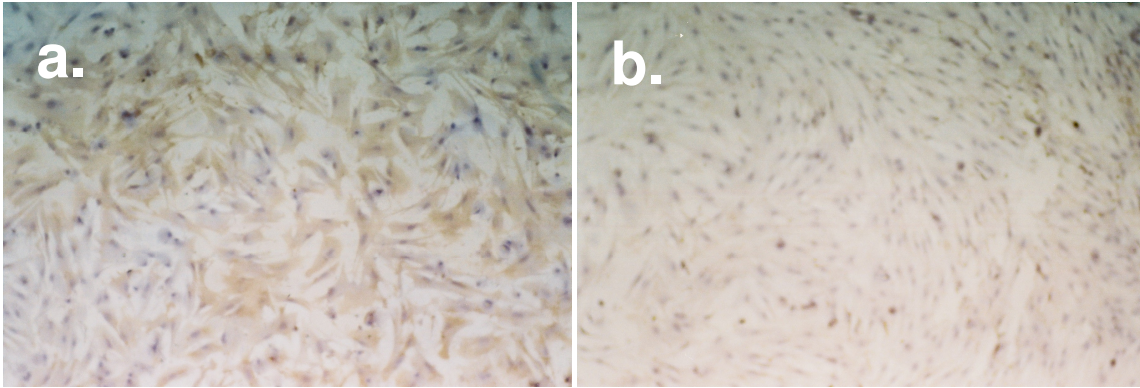


*Figura 5.4.1.i Células hepáticas bovinas en cultivo primario.* Fotografía microscópica por contraste de fase, de cultivo celular luego de una purificación por Percoll 15x (a), y sin el paso de purificación 50x (b). Los cultivos sin purificación muestran una población heterogénea de distintos tipos de células. Si se aíslan los tipos celulares se puede obtener una población homogénea de hepatocitos, de mayor tamaño y apariencia más definida.

Por reacción con Anti- BSA y Anti-  $\alpha$  actina, se caracterizaron los tipos celulares obtenidos en los cultivos.

Las actinas son proteínas constituyentes de microfilamentos del citoesqueleto, y son marcadores útiles de las células de Ito (Geerts et al, 1998). La mayoría de las células de

cultivos no purificados, poseen características fibroblásticas, y dieron reacción positiva a  $\alpha$ -actina (figura 5.4.1.ii).

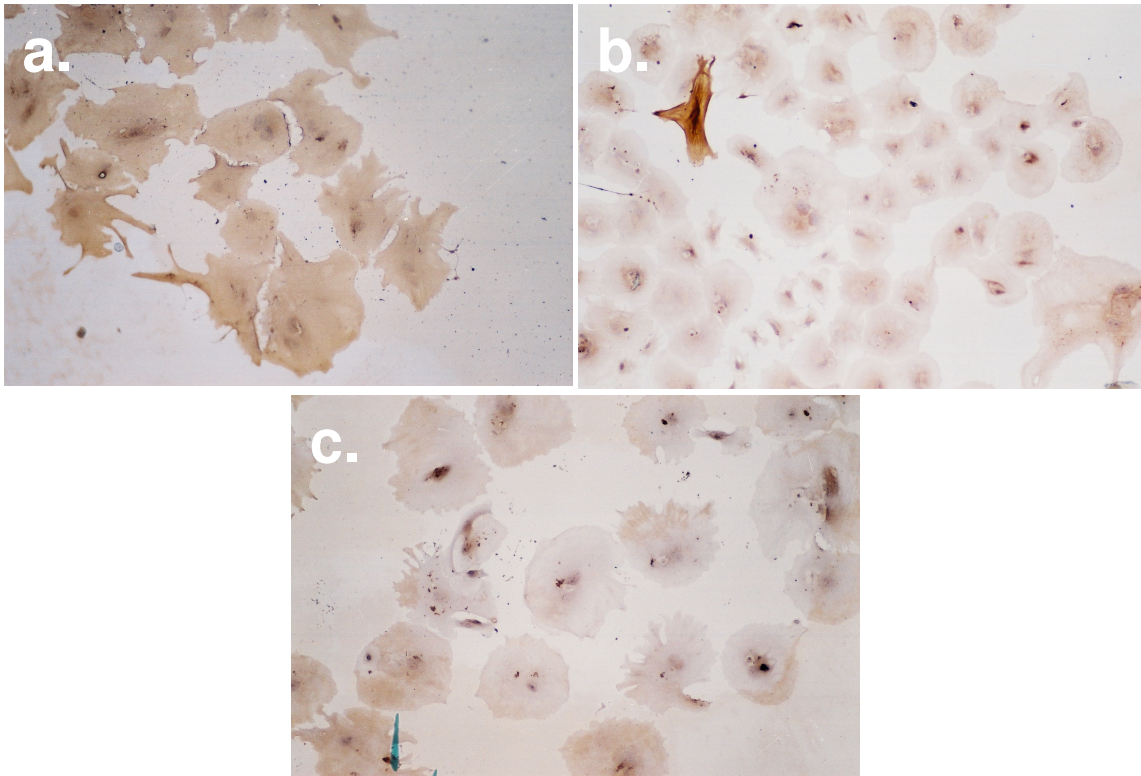


*Figura 5.4.1.ii Reacción inmunoquímica en cultivos no purificados. Fotografía microscópica 25x, de la reacción con un anticuerpo Anti- $\alpha$ -actina (a) y control (b).*

La mayor parte de la albúmina sérica es sintetizada en el hígado, y por inmunocitoquímica fue localizada en las células parenquimáticas, como sitio de síntesis (Berry et al, 1991; Funaki et al, 2002).

Luego del paso de separación por Percoll, se obtuvieron cultivos homogéneos de hepatocitos bovinos, que retienen sus características fenotípicas, como la producción de albúmina (figura 5.4.1.iii (a)). En estos cultivos purificados no se encontraron células con una distribución de  $\alpha$ -actina característica de las células de Ito (figura 5.4.1.iii (b)).





*Figura 5.4.1.ii Reacción inmunoquímica en cultivos purificados.* Fotografía microscópica, de la reacción con un anticuerpo Anti-BSA 25x (a), con un anticuerpo Anti- $\alpha$ -actina 10x (b) y control 25x (c).

La 7-etoxicumarina es un sustrato capaz de sufrir oxidación (fase I) y conjugación (fase II) en preparaciones *in vitro*, por lo que se lo utiliza como marcador de actividad metabólica (Fry et al. 1976; Shull et al. 1986). Con el fin de determinar la funcionalidad metabólica de estos cultivos, se estudió el metabolismo de 7-etoxicumarina. En la tabla 5.4.1.i se presentan los resultados obtenidos luego de 96 horas de incubación, en cultivos de 1 día de edad o en el 80% de confluencia. Mientras los cultivos heterogéneos exhibieron un rendimiento mayor de células viables y alcanzan confluencia en menos tiempo, presentaron menor actividad metabólica, evaluada como metabolitos de 7-EC formados por célula por hora. Cerca de alcanzar la confluencia los

cultivos homogéneos de células parenquimáticas disminuyen su actividad enzimática respecto de los días iniciales, pero esta actividad es significativamente mayor que en cultivos heterogéneos.

Los distintos cultivos desarrollados en esta etapa fueron capaces de hidrolizar la 7-etoxicumarina a 7-hidroxycumarina, si bien el rendimiento por célula por hora fue menor en los cultivos no purificados. Cerca de la confluencia la reacción disminuye, posiblemente por la ausencia de algún cofactor como NADPH (Berry et al. 1991). Estos dos tipos de cultivos, homogéneos de células parenquimáticas o heterogéneos (parenquimáticas e Ito), fueron utilizados en experimentos posteriores para el análisis del perfil metabólico de clenbuterol y receptores  $\beta$ -agonistas.

Tabla 5.4.1.i *Metabolismo de 7-etoxicumarina.*

	Metabolitos formados (nmol/h/10 <sup>6</sup> células)	
	Cultivos homogéneos de células	Cultivos heterogéneos de células
	parenquimáticas.	parenquimáticas e Ito
a 1 día de la siembra	128,31 ± 4,29	24,97 ± 1,98
80% confluencia	32,33 ± 3,01 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,06 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> a 31 día de la siembra.

<sup>b</sup> a 23 días de la siembra.

#### **5.4.2 Perfiles metabólicos en cultivo de células. Interacción con corticosteroides.**

Una vez establecidos los sistemas *in vitro*, se estudió el metabolismo de clenbuterol por agregado de  $^{14}\text{C}$ -clenbuterol a los medios de cultivo (figura 5.3.i.). Los medios fueron luego analizados por cromatografía por HPLC, y a la salida de la columna se colectaron fracciones. A cada una de estas fracciones se les midió la radioactividad, con lo que se trazaron radio-cromatogramas, en busca de estructuras marcadas que resultaran ser metabolitos del clenbuterol agregado.

Algunas hormonas, como la dexametasona, pueden funcionar como inductores o inhibidores de las enzimas CYP (sistema citocromo P450), que intervienen en el metabolismo de los xenobióticos. Para analizar el efecto de los glucocorticoides en la producción de metabolitos, se agregó dexametasona a algunos cultivos y luego de un período de inducción, se agregó clenbuterol radiactivo. Se compararon los perfiles radioactivos de los cromatogramas. La producción de metabolitos de clenbuterol es extremadamente lenta, por lo que se requirieron de largos tiempos de incubación para acumular una cantidad detectable de metabolitos, también se realizaron cultivos en suspensión de células parenquimáticas con similares resultados que los cultivos en placa.

Se utilizaron dos sistemas cromatográficos descriptos en la literatura: *Sistema A* y *Sistema B*. Por comparación de los tiempos de retención (TR) de los metabolitos obtenidos, con los trabajos publicados, se intentó una aproximación a la identificación de las estructuras posibles de los metabolitos.

Se graficaron los radio-cromatogramas de los medios de cultivo, analizados por el Sistema A. En todos los casos el  $^{14}\text{C}$ -clembuterol sin metabolizar aparece como un pico principal, a un tiempo de retención promedio de 11,2 minutos (figuras 5.4.2.i, ii, iii y iv).

En cultivos heterogéneos aparecen además dos picos a 14,7 (M2) y a 15,2 (M3) minutos, sin embargo el primero de estos dos no aparece en medios de cultivo suplementados con dexametasona (figura 5.4.2.ii, tabla 5.4.2.i).

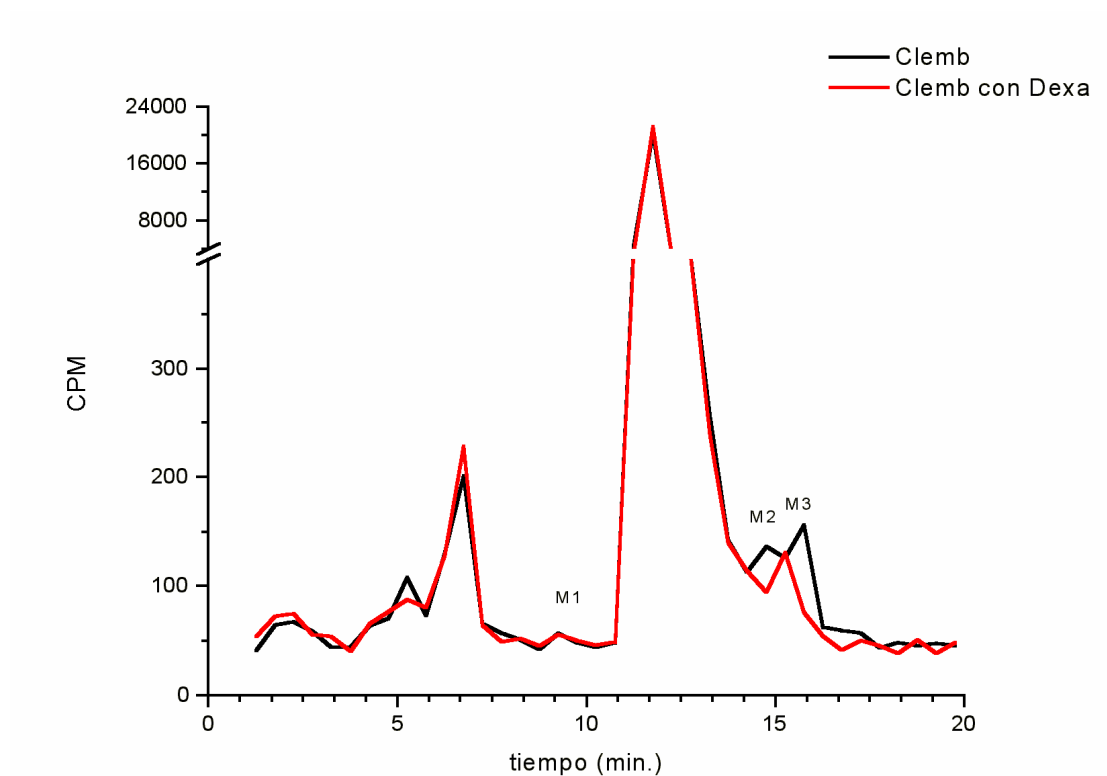


Figura 5.4.2.i Radiocromatograma Sistema A, de medio de cultivo heterogéneo de células. Cultivos heterogéneos se incubaron con  $^{14}\text{C}$ -clembuterol, con o sin dexametasona. Los medios fueron analizados por cromatografía y se recolectaron fracciones cada 0,5 minutos a las que se les midió la radioactividad. Los gráficos representan el promedio de 4 medios. El pico principal corresponde a clembuterol, se distinguen tres metabolitos M1, M2 y M3.

En la bibliografía, los posibles metabolitos identificados a tiempos de retención más bajos que clembuterol, tienen estructuras propuestas de características más polares, como N-hidroxiclembuterol o glucurónido de clembuterol (Sauer et al., 1999).

Se intentaron identificar posibles derivados glucurónidos o sulfatos por medio de una reacción enzimática con  $\beta$ -glucuronidasa-sulfatasa. Luego de la reacción enzimática, los medios fueron reanalizados por cromatografía (figuras 5.4.2.ii y iii).

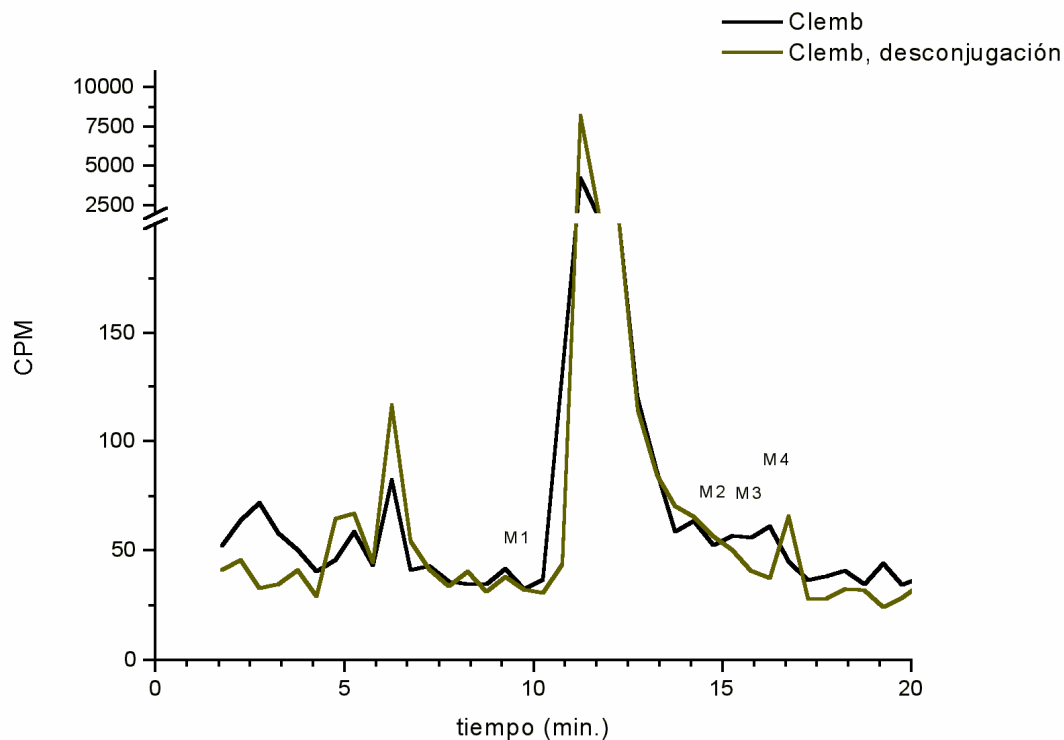
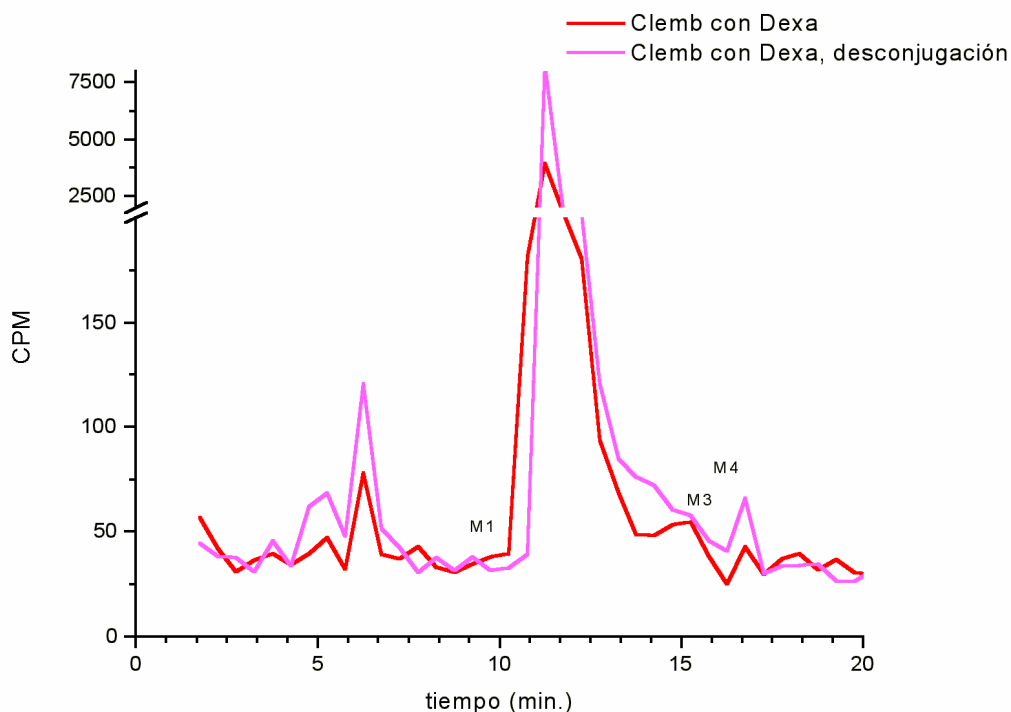


Figura 5.4.2.ii Radiocromatogramas de medios de cultivos sin dexametasona, antes y después de desconjugación enzimática. Cultivos heterogéneos se incubaron con  $^{14}\text{C}$ -clembuterol. Una alícuota de cada medio se incubó con enzima glucuronidasa sulfatasa. Los medios fueron analizados por cromatografía y se recolectaron fracciones cada 0,5 minutos a las que se les midió la radioactividad. Los gráficos representan el promedio de 2 medios. El pico principal corresponde a clembuterol, se distinguen metabolitos M1, M2, M3 y M4.



*Figura 5.4.2.iii Radiocromatogramas de medios de cultivos con dexametasona, antes y después de desconjugación enzimática.* Cultivos heterogéneos se incubaron con  $^{14}\text{C}$ -clembuterol y dexametasona. Una alícuota de cada medio se incubó con enzima glucuronidasa sulfatasa. Los medios se fueron analizados por cromatografía y se recolectaron fracciones cada 0,5 minutos a las que se les midió la radioactividad. Los gráficos representan el promedio de 2 medios. El pico principal corresponde a clembuterol, se distinguen metabolitos M1, M3 y M4.

A partir de este experimento se puede descartar una estructura conjugada para M1 ya que su pico no desapareció luego de la reacción enzimática.

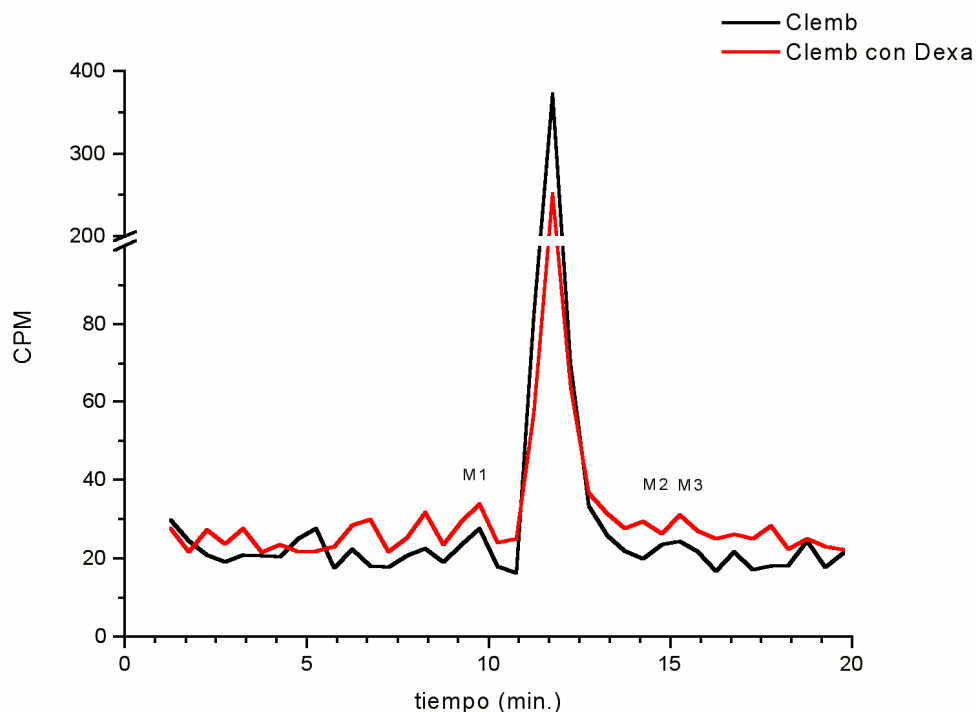
Por otro lado, el pico de 15,2 minutos (M3), disminuye o desaparece, mientras un nuevo pico a 16,7 minutos (M4) se puede visualizar aumentado en medios con y sin dexametasona (figura 5.4.2.ii y iii.). Este resultado sugeriría una estructura conjugada para M3 (TR= 15,2min), que luego de su desconjugación, aparece a un tiempo de retención mayor (TR= 16,7min), producto de haber perdido un grupo altamente polar: glucuronato o sulfato.

Respecto de M2 (TR= 14,7 min.), éste representa la primera diferencia en el metabolismo de clenbuterol en cultivo, por adición de dexametasona.

Los picos descritos representan fracciones menores al 1% de la radioactividad total en el cromatograma. Por lo que se intentó una mayor producción de metabolitos en empleando para esto un sistema homogéneo de células parenquimáticas.

Como se vio en la sección 5.4.1, aunque los cultivos homogéneos de células parenquimáticas poseen una capacidad de proliferación muy baja, expresan un rendimiento mayor de productos metabólicos.

Se repitieron las incubaciones en cultivos homogéneos de células parenquimáticas, con o sin dexametasona. Los radiocromatogramas obtenidos se observan en la figura 5.4.2.iv.



*Figura 5.4.2.iv Radiocromatograma Sistema A, de medio de cultivo homogéneo de células parenquimáticas.* Cultivos homogéneos se incubaron con  $^{14}\text{C}$ -clembuterol, con o sin dexametasona. Los medios fueron analizados por cromatografía y se recolectaron fracciones cada 0,5 minutos a las que se les midió la radioactividad. Los gráficos representan el promedio de 2 medios. El pico principal corresponde a clembuterol, se distinguen tres metabolitos M1, M2 y M3. Obsérvese que en cultivos con dexametasona el pico correspondiente a M2 (TR: 14,7 min.) no aparece, mientras que en cultivos sin dexametasona éste aparece fundido con el pico de M3 (TR: 15,2).

En este sistema aparecieron los mismos metabolitos ya descritos, confirmando también la ausencia del pico M2 (TR: 14,7 min.) en cultivos con dexametasona. Por último, en los cultivos sin dexametasona se insinúa además el pico de M4 a 16,7min. Dado que el metabolito M3 (TR 15,5min.) es el conjugado de M4 (TR 16,7min.), se podría especular que en sistemas heterogéneos (células parenquimáticas y células de Ito), la conjugación, fase II del metabolismo, es más completa.



Tabla 5.4.2.i Metabolitos de <sup>14</sup>C-clembuterol en cultivo celular. Sistema A.

TR (min) picos cromatográficos observados					
Cultivos homogéneos de células parenquimáticas		Cultivos heterogéneos de células parenquimáticas e Ito		Estructura sugerida	
DEX		DEX			
9,2	9,2	9,2	9,2	M1	N-hidroxiclembuterol
11,2	11,2	11,2	11,2		clembuterol
14,7		14,7		M2	
15,2	15,2	15,2	15,2	M3	Gluc o Sulfato de M4
16,7	16,7			M4	

Gluc, glucurónido  
DEX, cultivos estimulados con dexametasona

Debido a la escasa concentración molar de estos metabolitos no fue posible realizar un análisis estructural por técnicas más descriptivas de la molécula como la espectroscopía de masas. Por ello se eligió un segundo sistema cromatográfico, el *Sistema B*, el cual podría agregar información a la descripción del perfil metabólico de clembuterol en cultivo.

En este sistema los cromatogramas de medios de cultivo, presentaron un pico a 41,5min correspondiente a <sup>14</sup>C-clembuterol (figuras 5.4.2.v, vi y vii). También se detectó un pico a 20,5min. (M1'). M1' se presentó en las incubaciones con o sin dexametasona, tanto en cultivos heterogéneos de células como en cultivos homogéneos de células parenquimáticas. Nuevamente su estructura más polar podría corresponder a N-

hidroxiclembuterol, (M1), que también fue el mayor metabolito encontrado en cultivos de microsomas y cortes de hígado bovino, con este sistema cromatográfico (Zalko et al, 1998).

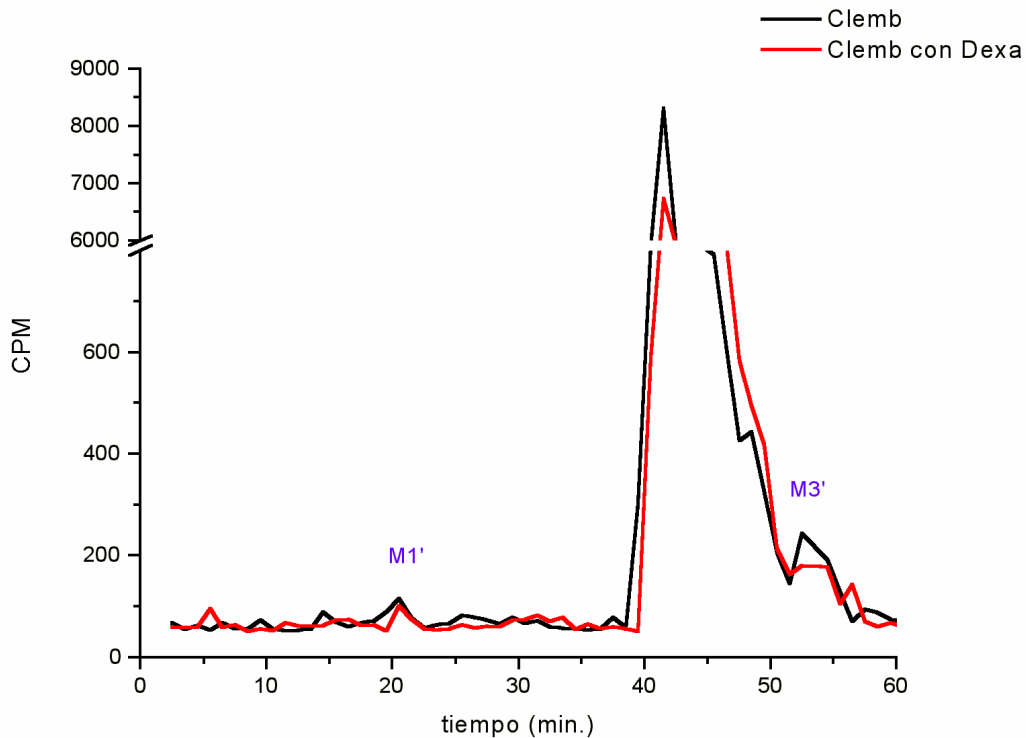
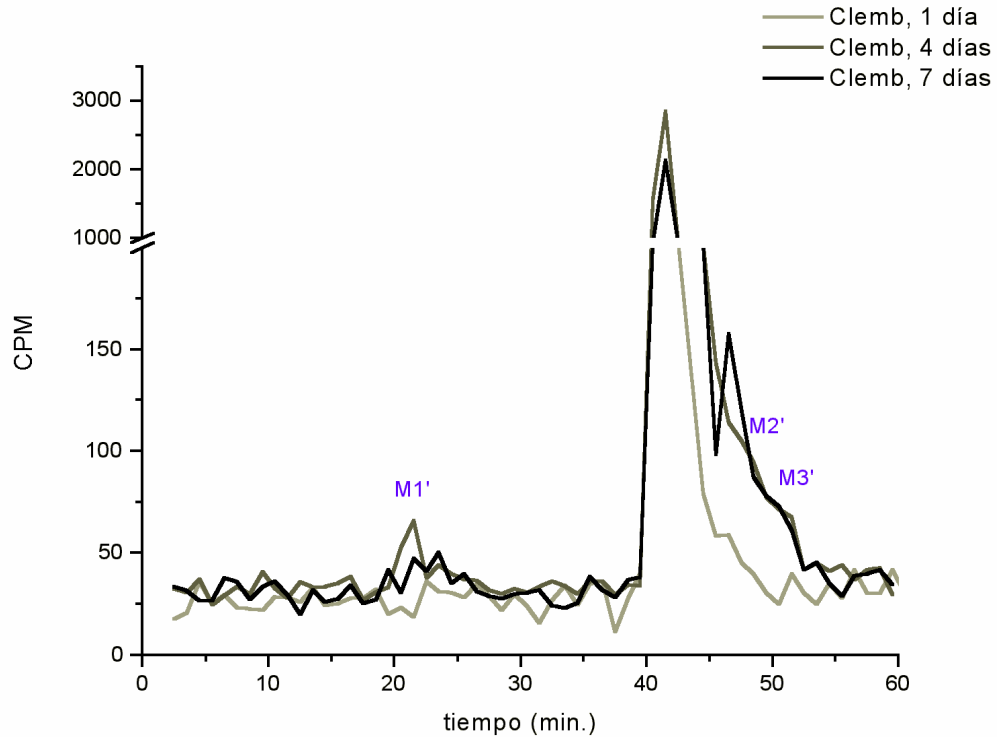


Figura 5.4.2.v Radiocromatograma Sistema B, de medio de cultivo heterogéneo de células. Cultivos heterogéneos se incubaron con  $^{14}\text{C}$ -clembuterol, con o sin dexametasona. Los medios se fueron analizados por cromatografía y se recolectaron fracciones cada 1 minuto a las que se les midió la radioactividad. Los gráficos representan el promedio de 3 medios. El pico principal corresponde a clembuterol, se distinguen los metabolitos M1' y M3'.

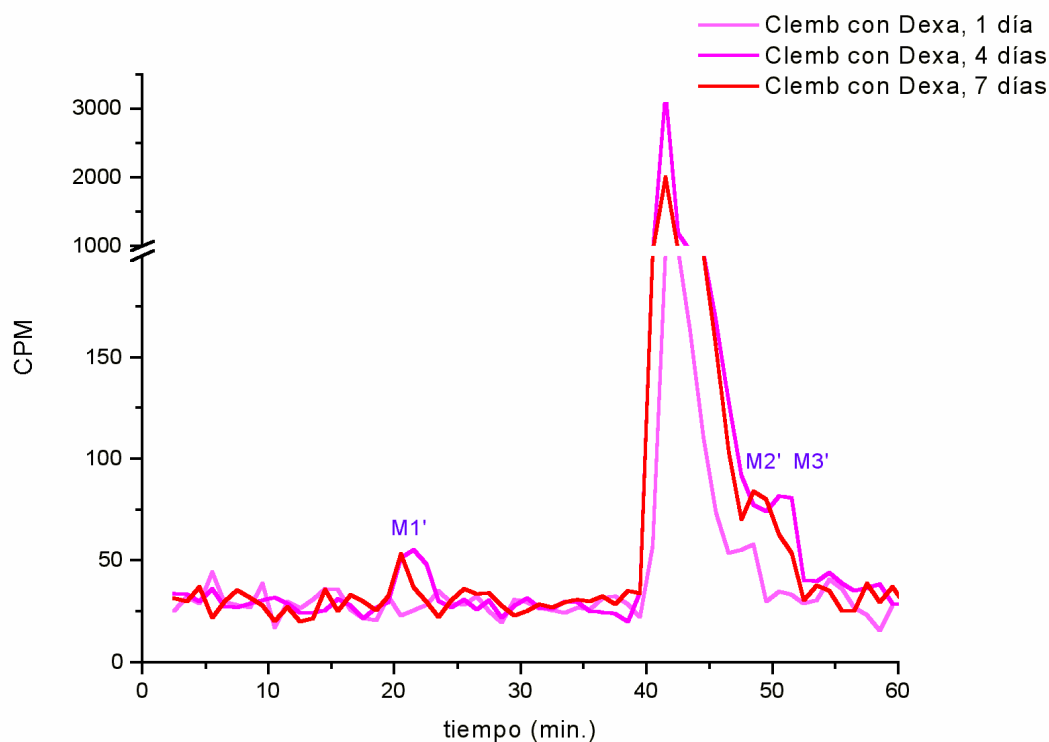
Un segundo metabolito M3', con características menos polares que el clembuterol, aparece como un pico ancho a TR: 52-53min. en presencia o ausencia de dexametasona.

Finalmente, a tiempos menores a 50 minutos el cambio de curvatura del pico de clembuterol podría indicar un tercer metabolito, un poco más definido en ausencia de dexametasona. La dexametasona además, parece reducir la altura de M3'.

Los radiocromatogramas obtenidos de incubaciones en cultivos homogéneos, se presentan en la figura vi y vii.



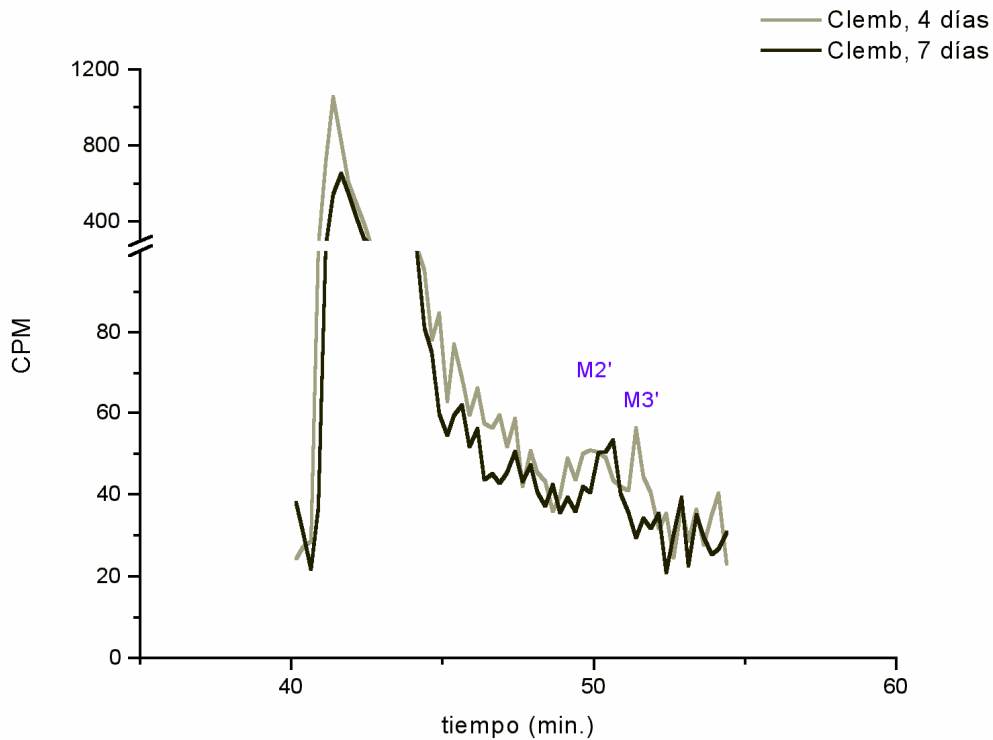
*Figura 5.4.2.vi Radiocromatograma Sistema B, de medio de cultivo homogéneo de células parenquimáticas. Cultivos heterogéneos se incubaron con  $^{14}\text{C}$ -clembuterol. Se tomaron los medios a distintos tiempos y fueron analizados por cromatografía. Se recolectaron fracciones cada 1 minuto a las que se les midió la radioactividad. Los gráficos representan el promedio de 3 medios. El pico principal corresponde a clembuterol, se distinguen los metabolitos M1', M2' y M3'.*



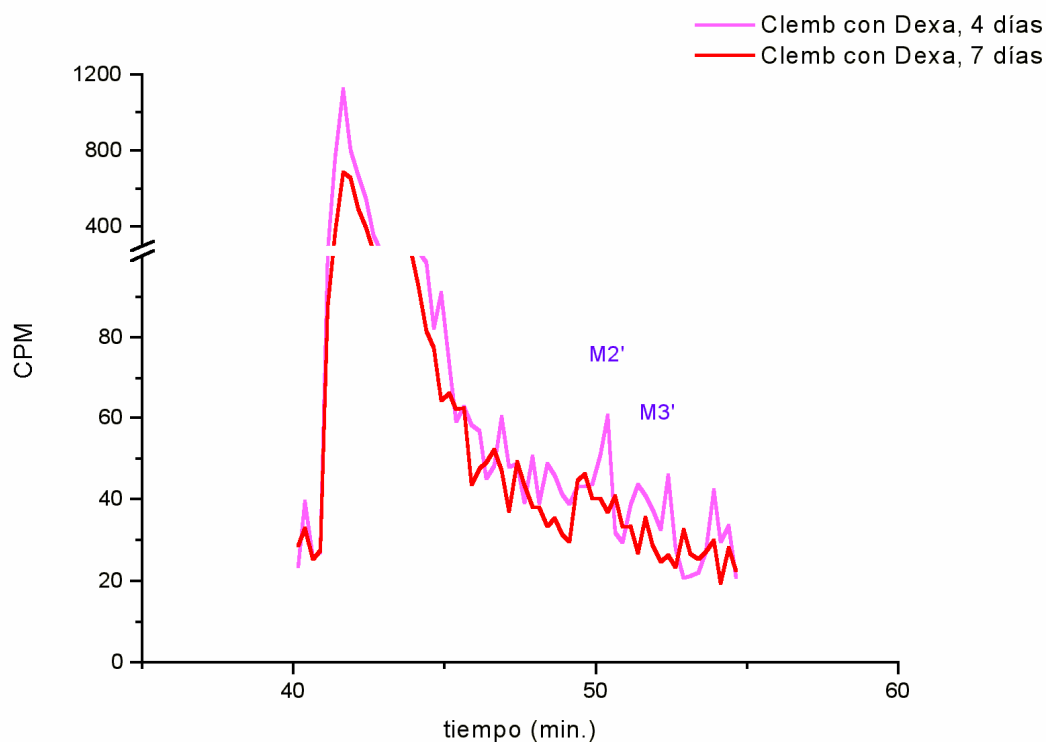
*Figura 5.4.2.vii Radiocromatograma Sistema B, de medio de cultivo homogéneo de células parenquimáticas.* Cultivos homogéneos se incubaron con  $^{14}\text{C}$ -clembuterol, con dexametasona. Se tomaron los medios a distintos tiempos y se fueron analizados por cromatografía. Se recolectaron fracciones cada 1 minuto a las que se les midió la radioactividad. Los gráficos representan el promedio de 3 medios. El pico principal corresponde a clembuterol, se distinguen los metabolitos M1', M2' y M3'.

Dependiendo del tiempo de incubación se aumenta la radiactividad correspondiente a metabolitos de clembuterol, resultando en picos más altos y definidos respecto del fondo. Fueron necesarios al menos cuatro días para acumular suficiente cantidad de metabolitos como para ser detectados. Este hecho hizo que resultara indistinto el agregado de dexametasona previo o simultáneamente al agregado de clembuterol al medio.

A tiempos de retención mayores a clembuterol se visualizan metabolitos M2' y M3', mucho más definidos en presencia de dexametasona. A más días de incubación el metabolito de menor tiempo de retención (M2') parece incrementarse respecto de M3'. Como éstos son de difícil análisis por estar enmascarados por el pico mayoritario de clembuterol, se tomaron fracciones de eluido cada 0,25 minutos, en esa región del cromatograma (figuras 5.4.2.viii y ix).



*Figura 5.4.2.viii Radiocromatograma Sistema B, de medio de cultivo homogéneo de células parenquimáticas. Cultivos homogéneos se incubaron con <sup>14</sup>C-clembuterol. Se tomaron los medios a distintos tiempos y fueron analizados por cromatografía. Se recolectaron fracciones cada 1 minuto a las que se les midió la radioactividad. Los gráficos representan el promedio de 3 medios. El pico principal corresponde a clembuterol, se distinguen los metabolitos M2' y M3'.*



*Figura 5.4.2.ix Radiocromatograma Sistema B, de medio de cultivo homogéneo de células parenquimáticas. Cultivos homogéneos se incubaron con  $^{14}\text{C}$ -clembuterol, con dexametasona. Se tomaron los medios a distintos tiempos y fueron analizados por cromatografía. Se recolectaron fracciones cada 1 minuto a las que se les midió la radioactividad. Los gráficos representan el promedio de 3 medios. El pico principal corresponde a clembuterol, se distinguen los metabolitos M2' y M3'.*

A cuatro días de incubación, con o sin dexametasona, se encontraron los dos metabolitos: M2' a 50,0 min. y M3' a 51,8 min., y a siete días de incubación sólo se detectó M2', también en ambas condiciones.

En la tabla 5.4.2.ii se resumen estos resultados.

Tabla 5.4.2.ii *Metabolitos de <sup>14</sup>C-clembuterol en cultivo celular. Sistema B.*

TR (min) picos cromatográficos observados					
Cultivos homogéneos de células parenquimáticas		Cultivos heterogéneos de células parenquimáticas e Ito		Estructura sugerida	
DEX		DEX			
20,5	20,5	20,5	20,5	M1'	N-hidroxiclembuterol
41,5	41,5	41,5	41,5		Clembuterol
50,0*	50,0*			M2'	NO-Clembuterol ¿?
51,8*	51,8*	52,5	52,5	M3'	NO <sub>2</sub> -Clembuterol ¿?

Gluc, glucurónido

DEX, dexametasona

ADBA, ácido 4-amino-3,5-diclorobenzoico

\*tiempos de retención promediados de los cromatogramas de las figuras 5.4.2.viii y ix.

Finalmente, la presencia de dexametasona en los cultivos homogéneos analizados por el sistema cromatográfico B, no parece influir significativamente en la producción de metabolitos.

### 5.5. Receptores $\beta$ adrenérgicos en hepatocitos bovinos.

Como consecuencia de la prohibición total del uso de anabólicos en producción animal, muchas de estas drogas se continúan usando de manera ilegal. Las sustancias más comúnmente utilizadas de esta manera como promotores del crecimiento incluyen  $\beta$ -agonistas y hormonas esteroides. La acción farmacológica y anabolizante de los  $\beta$  agonistas, es mediada por la interacción con receptores  $\beta$  adrenérgicos de membrana. Sin embargo largos tiempos de exposición a  $\beta$  agonistas causa desensibilización, y por lo tanto, estímulos posteriores no producen la misma respuesta biológica. La desensibilización es un fenómeno que ha sido atribuido a diferentes procesos celulares: desacoplamiento funcional del receptor, internalización y regulación negativa del número total de los receptores (aumento del reciclado y decrecimiento de la expresión) (Re et al. 1995, Ligget, 2002). Consecuentemente la respuesta celular a ligandos naturales o sintéticos merma rápidamente luego de estimulación repetida con  $\beta$  agonistas (Hausdorff et al, 1990).

Por otro lado, los glucocorticoides interactúan con receptores específicos proteicos, pero intracelulares, regulando la expresión de genes específicos y el nivel de expresión de ciertas proteínas en los tejidos blancos (Adcock, 2000). Si bien se ha comprobado que grandes dosis de glucocorticoides sintéticos reducen la velocidad de crecimiento y llevan a la atrofia muscular, la dexametasona y otros corticosteroides sintéticos son usados con frecuencia como promotores del crecimiento en producción animal (Courtheyn et al. 2002). En particular, son administrados siempre en combinación con  $\beta$  agonistas o anabólicos esteroideos (Antignac, 2001). Si bien no se ha elucidado su



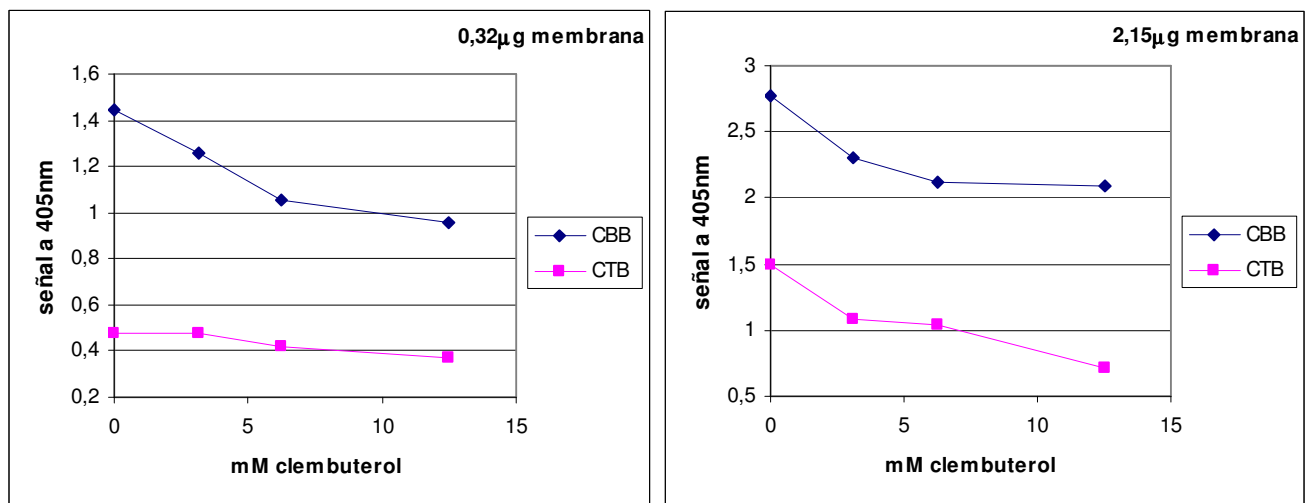
mecanismo de acción, se ha sugerido que los glucocorticoides aumentan el efecto anabolizante de los  $\beta$  agonistas. Se piensa además, que los glucocorticoides revertirían la regulación negativa de los receptores  $\beta$  adrenérgicos y la expresión de su ARNm. (Mak et al, 1995; Odore et al, 2006). Luego, el aumento de receptores  $\beta$  permitiría utilizar menores cantidades de clenbuterol, para lograr el mismo efecto anabolizante. Consecuentemente, la acumulación de residuos sería menor, dificultando su detección.

La presencia de dexametasona produjo diferencias en el perfil metabólico de clenbuterol en cultivo de hepatocitos (sección 5.4.2). Se buscó establecer entonces, el efecto sobre los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de dichas células. Para esto se utilizó el trazador biotinilado: Clemb-BSA-Biotina (CBB), ya descrito en para enzoinmunoensayos (sección 3.5.3.), y avidina unida a fluoresceína para ensayar su unión específica a receptores de membrana, en células enteras. Para visualizar cambios en la densidad de receptores se ensayó esta técnica sobre células cultivadas con y sin dexametasona por varios días.

### **5.5.1 Señal específica en membranas de hepatocitos.**

En la determinación de receptores de membrana se utilizaron trazadores desarrollado en el capítulo 3. Para verificar la unión específica a receptores  $\beta$  adrenérgicos, y como un intento de cuantificación por una técnica de enzimoensayo inmovilizado, se realizaron los siguientes experimentos. Se extrajeron membranas de hígado bovino, que fueron fijadas a una placa de poliestireno. Las membranas inmovilizadas se incubaron luego con el trazador. Para verificar la captación del trazador por los receptores de las membranas unidas a la placa, se incubó con EFA, el cual se uniría a los residuos de

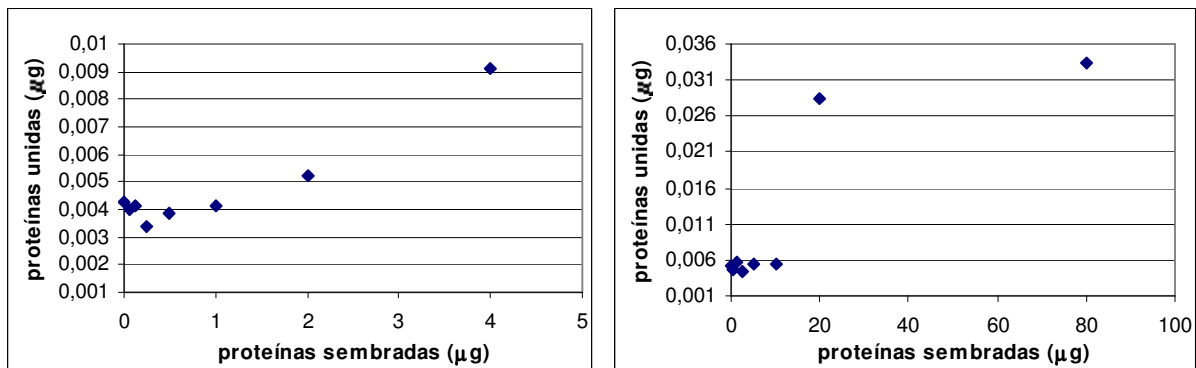
biotina del trazador, y un revelador de fosfatasa determinaría el grado de unión. Como comprobación de la especificidad del receptor, se interfirió la incubación con clenbuterol. Se utilizaron en estos experimentos los dos trazadores obtenidos, clenbuterol-BSA-Biotina (CBB) y clenbuterol-Tiramina-Biotina (CTB). Los mejores resultados de una serie de experimentos se muestran en los gráficos siguientes (figuras 5.5.1.i). La concentración de proteínas de membrana unidas a la placa, fue estimada por el método Bradford, posterior a una incubación en medio alcalino fuerte para hidrolizarlas del poliestireno.



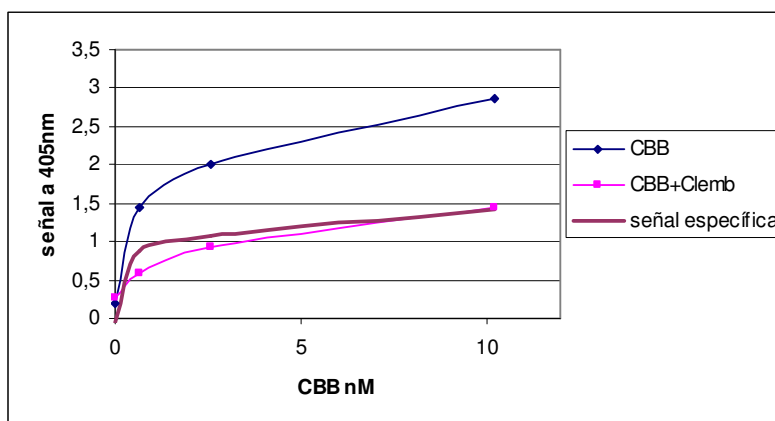
*Figura 5.5.1.i Unión específica de CBB y CTB a receptores de membrana de hepatocitos.* En placas sembradas con 2,15 o 0,32 µg de extracto de membranas de hepatocitos bovinos, y bloqueadas con BSA, se incubó CBB a concentración 8,25nM o CTB a concentración 4300nM y distintas concentraciones de clenbuterol (12,5-6,25-3,125-0 mM), por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavados se incubó con EFA (1:2000) y se reveló con pNPP. Las curvas se realizaron por duplicado. La concentración de proteína de membrana en la placa se determinó luego de una incubación con NaOH 1N, por Bradford.

En placas con mayor contenido de membranas se obtiene mayor señal, con ambos trazadores. Los experimentos con el trazador CBB producen mayor señal aún a concentraciones mucho menores que CTB, justificado esto por la presencia de más residuos de biotina por molécula en CBB, mientras en CTB la relación clembuterol:biotina es (1:1). A menos concentración de membrana, este factor de amplificación es crítico, no detectándose desplazamiento específico con CTB en todo el rango probado.

Una limitación importante a estos experimentos es que la concentración de proteína de membranas que se pueden unir a la placa llega a un límite de no más de unos pocos centésimos de microgramos por posillo de reacción (figura 5.5.1.ii), por lo que la concentración de receptores  $\beta$  disponibles es muy poca para permitir una cuantificación por curvas de Scatchard de números de receptores o evaluación de constantes de afinidad (figura 5.5.1.iv).



*Figura 5.5.1.ii Curvas de saturación con proteína de membrana en placa.* Se sembraron placas Polysorp con 100µl de distintas concentraciones de extracto de membranas de hepatocitos bovinos. Luego de lavados se secaron al aire y se incubaron con 100µl de NaOH 1M a temperatura ambiente, por no menos de 5 horas. Se neutralizó con 100µl HCl 1M y se agregó reactivo de Bradford para cuantificar la proteína unida a la placa. Entre 1 y 5 µg de proteína sembrada la unión a la placa resulta lineal, donde aproximadamente se une el 20%. La saturación se alcanza por encima de los 20µg.



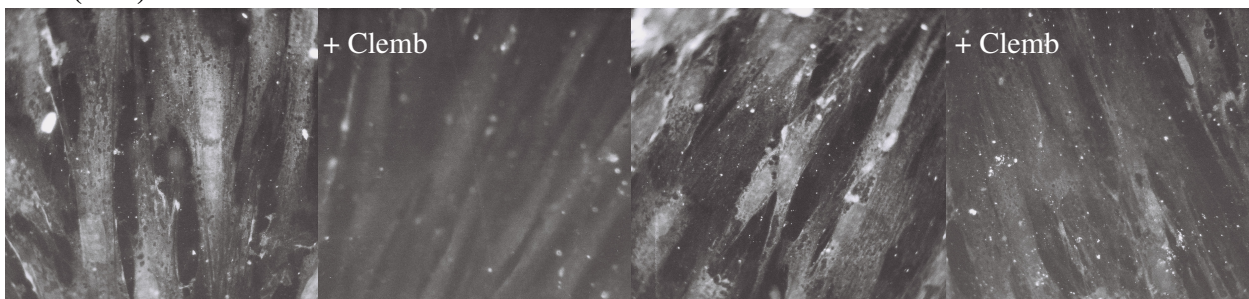
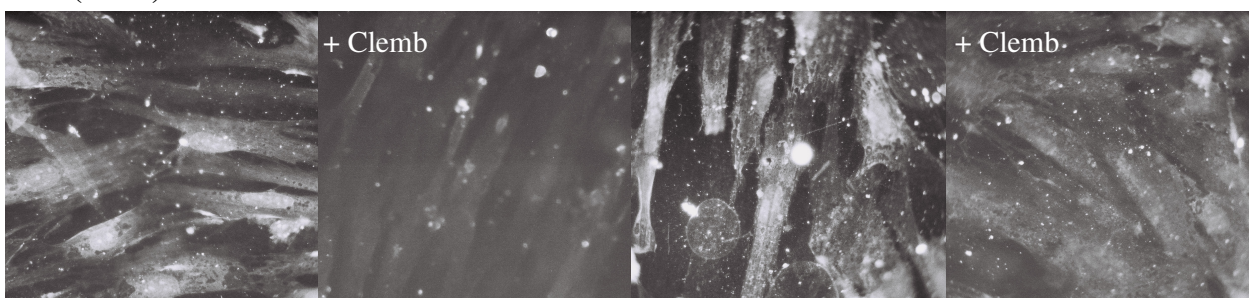
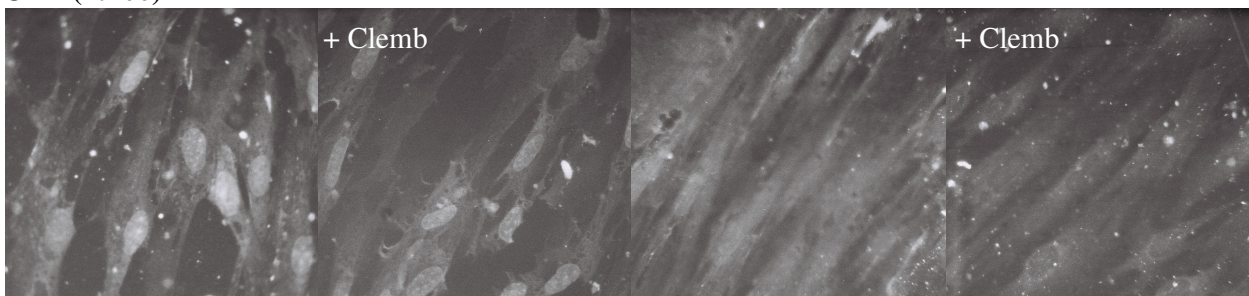
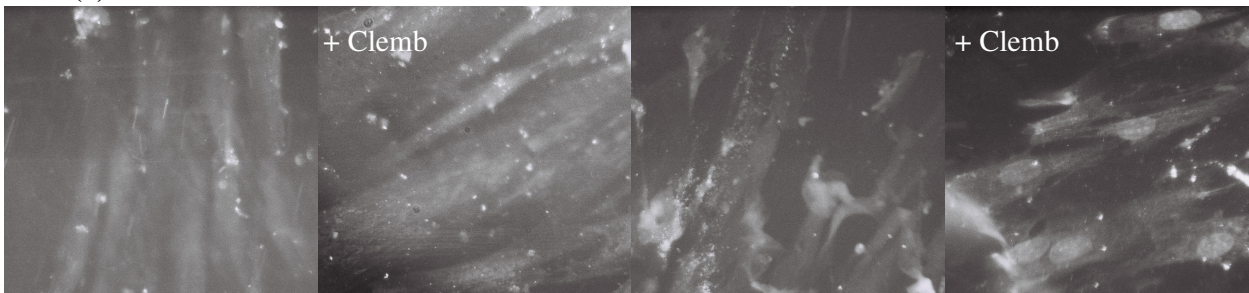
*Figura 5.5.1.i Curvas de CBB. Unión específica a receptores de membrana.* En placas sembradas con 0,26  $\mu\text{g}$  de extracto de membranas de hepatocitos bovinos, y bloqueadas con BSA, se incubó CBB a concentraciones 10,2-2,5-0,6-0 nM y se interfirió o no la unión al receptor con clenbuterol 0,1 mM, por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavados se incubó con EFA (1:2000) y se reveló con pNPP. Las curvas se realizaron por duplicado. La concentración de proteína de membrana en la placa se determinó luego de una incubación con NaOH 1N, por Bradford.

### 5.5.2 Interacción de los corticosteroides sobre los receptores celulares.

Para visualizar receptores  $\beta$ -adrenérgicos en células hepáticas, se realizaron marcaciones fluorescentes en cultivos con y sin dexametasona de células en placa. Se utilizó para esto el trazador de clenbuterol biotinilado CBB, a distintas diluciones, y un marcador de biotina: avidina-FITC, que aporta la marca fluorescente. Luego se observaron las células por microscopio de fluorescencia y se fotografiaron.

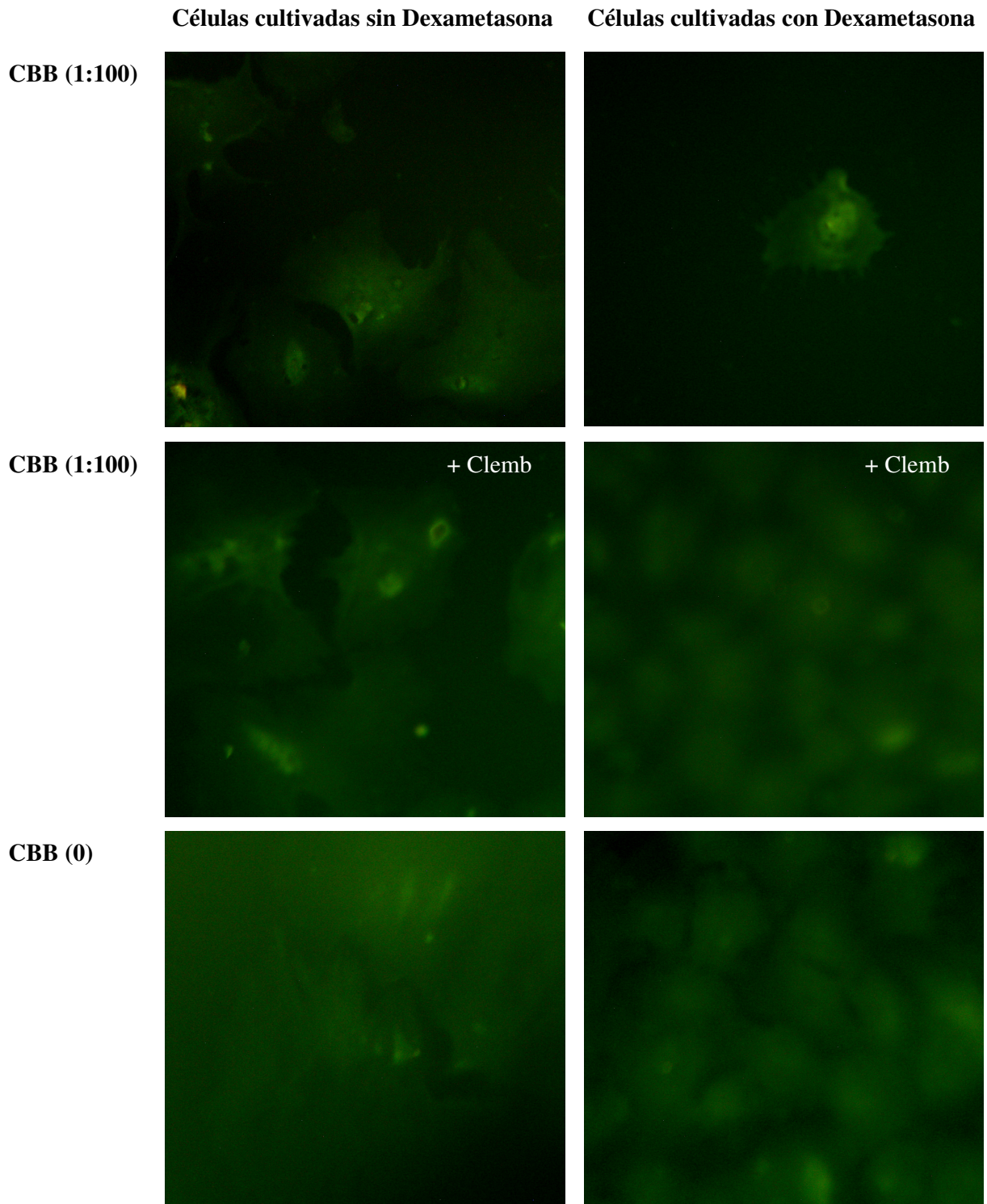
En cultivos heterogéneos de hepatocitos, incubados sin trazador biotinilado, la mayoría de las células presentaron morfología elongada tipo fibroblasto, con un núcleo marcado fluorescente (figura 5.5.2.i). Cuando la reacción fue realizada en presencia del trazador,

la marca fluorescente aumenta en toda la superficie de la célula, y se intensifica con el aumento de la concentración de CBB. En presencia de clenbuterol, la marca fluorescente es similar a los controles, lo que corresponde con una unión específica del agonista a la superficie celular. Las células cultivadas en presencia de dexametasona ( $50\mu\text{M}$ ), al grado de resolución que permite esta técnica, no mostraron diferencia en la intensidad o distribución de la fluorescencia. Se seleccionó la dilución (1:100) del trazador para los siguientes experimentos.

**Células cultivadas sin Dexametasona****Células cultivadas con Dexametasona****CBB (1:50)****CBB (1:100)****CBB (1:200)****CBB (0)**

*Figura 5.5.2.i Marcación fluorescente de receptores  $\beta$  adrenérgicos en cultivos heterogéneos de células. Células de Ito y parenquimáticas cultivadas con o sin dexametasona fijadas con formaldehído, se incubaron con distintas concentraciones de CBB, en presencia o ausencia de clenbuterol en el medio de reacción. Luego de lavados se incubaron con Avidina-FITC, y se visualizaron por microscopio Nikon Optiphot Epifluorescence. Fotografías en película 400 ISO, 10 segundos exposición, blanco y negro, a magnificación x125, escaneado del negativo.*

En cultivos homogéneos de hepatocitos (células parenquimáticas) (figura 5.5.2.ii), tanto en cultivos con o sin dexametasona, las células no difieren significativamente por su fluorescencia respecto de los preparados control (sin CBB), o los interferidos con clenbuterol. Esto podría ser indicación de diferentes fenómenos: ausencia de receptores  $\beta$  en células parenquimáticas o presencia a niveles no detectables por esta técnica.



*Figura 5.5.2.ii. Marcación fluorescente de receptores  $\beta$  adrenérgicos en cultivos homogéneos de células.* Cultivos homogéneos de células parenquimáticas cultivadas con o sin dexametasona fijadas con formaldehído, se incubaron con (1:100) de CBB, en presencia o ausencia de clenbuterol en el medio de reacción. Luego de lavados se incubaron con Avidina-FITC, y se visualizaron por microscopio Nikon Eclipse JS100. Fotografías digitales tomadas con cámara Nikon CoolPix S4, ISO 200, f:3,5, zoom óptico 380mm distancia focal, 2 segundos de exposición, a magnificación x200.



## 5.6. Discusión del capítulo 5.

El propósito de esta etapa del trabajo fue establecer el efecto de los corticosteroides sobre el metabolismo del clenbuterol y los receptores  $\beta$  adrenérgicos en bovinos. La aproximación clásica para el estudio de metabolismo es determinar sus productos en el animal intacto, tanto en excretas como en distintos tejidos. Este tipo de estudios es necesario, pero posee aún grandes limitaciones. El análisis de tejidos y fluidos puede no detectar ciertos metabolitos y muchas veces es difícil extraer residuos que permanecen unidos a los tejidos. Además, debido sus efectos tóxicos, la dosis que se puede administrar a un animal es limitada, por lo cual la cantidad de metabolitos producida puede ser indetectable. Finalmente, dichos experimentos suelen ser costosos y complicados por tratarse de grandes animales. Los estudios *in vitro* en cambio, proveen valiosa información sobre pasos metabólicos, indispensables para el análisis de residuos.

Se logró un método de aislamiento y cultivo de hepatocitos bovinos que es simple y fácil de aplicar, particularmente en situaciones en que las muestras de tejido tienen que ser trasladadas hasta el laboratorio y la perfusión no es posible. Con esta técnica, se lograron cultivos en los que predominan células no parenquimáticas tipo fibroblastos (células de Ito, cultivos heterogéneos). Al agregar un paso de separación de subpoblaciones celulares se obtuvieron cultivos que retuvieron características fenotípicas propias de células parenquimáticas como la producción de albúmina (cultivos homogéneos). Ambos tipos de cultivos, homogéneos (células parenquimáticas) o heterogéneos (células parenquimáticas y fibroblásticas), metabolizaron 7-etoxicumarina a 7-hidroxycumarina, que es un marcador de aptitud metabólica en

sistemas *in vitro*. Si bien los cultivos heterogéneos exhibieron menor actividad metabólica que los homogéneos, ambos sistemas se utilizaron en los estudios posteriores, sin mayores diferencias en los metabolitos encontrados.

En todos los casos los metabolitos de  $^{14}\text{C}$ -Clembuterol encontrados no superan el 1% de la radioactividad total. Ante esa baja tasa de metabolismo resultó imposible realizar estudios de estructura por técnicas como la espectroscopía de masas. Sin embargo, se sugirieron algunas estructuras por comparación de los radiocromatogramas obtenidos con los ya descritos. Así se propuso la estructura N-hidroxiclembuterol para los metabolitos principales M1 y M1' (figura 5.6.i). Si la hidroxilación resulta el camino metabólico principal en este sistema en cultivo, sería posible la presencia de nitro-derivados de clembuterol como NO- o NO<sub>2</sub>-clembuterol (figura 6.5.i). Estas estructuras han sido encontradas como metabolitos de clembuterol en sistemas *in vitro*, microsomas y cortes de tejido de hígado bovino, y exhiben tiempos de retención mayores que el clembuterol en el sistema cromatográfico B (Zalko et al, 1998). Serían entonces buenos candidatos para la identificación de M2' y M3' respectivamente; sin embargo, la reducción de M3' con el tiempo de incubación no sería un fenómeno fácil de explicar (figuras 5.4.2.viii y ix). Otra estructura posible, con tiempo de retención asimilable a M2' o M3' es el ácido 4-amino-3,5-diclorobenzoico (ADBA), que implica un camino metabólico de N-desalquilación (Zalko et al, 1998) (figura 5.6.i). En todos estos casos la presencia de nitro-derivados o metabolitos menos polares que el clembuterol podría ser indicio de un paso metabólico hacia compuestos más difíciles de eliminar por el organismo, y por lo tanto de mayor compromiso toxicológico. El camino de la N-oxidación de arilaminas está involucrado en varios mecanismos toxicológicos, que

resultan de la unión de metabolitos reactivos a ADN, hemoglobina y otras proteínas (Zalko et al 1997).

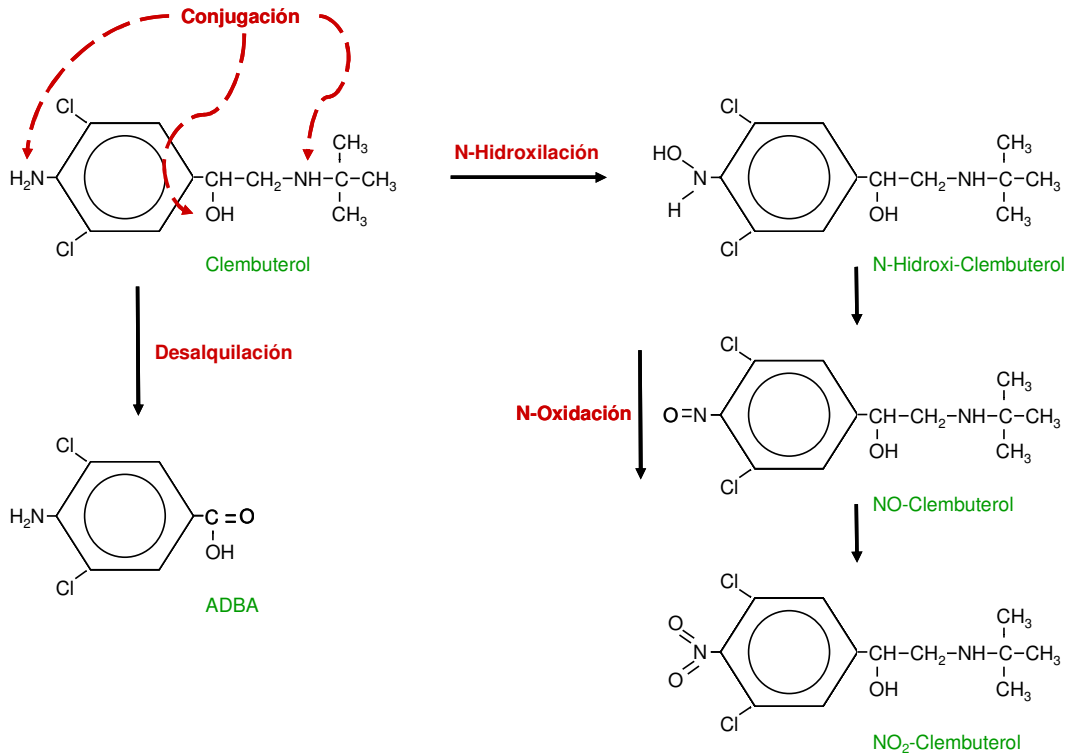


Figura 5.6.i. Caminos metabólicos del clenbuterol en hepatocitos bovinos. La conjugación con un grupo glucurónido o sulfato podría producirse a posteriori de los pasos de N-hidroxilación, N-oxidación y desalquilación propuestos.

Para el metabolito M3, se propuso una estructura conjugada (glucurónido o sulfato), propio de la fase II del metabolismo. El metabolito M4, producto intermediario de M3, sugiere también una estructura menos polar, más hidrofóbica y por lo tanto menos eliminable por vía de la orina.

La presencia de dexametasona en los cultivos cambió el perfil metabólico. El metabolito M2 dejó de ser detectable, correspondiendo esto a una inhibición de dicho paso metabólico. Se requerirán más estudios para determinar los resultados finales de dicha

interacción, y su mecanismo. La regulación de enzimas hepáticas y expresión del citocromo P450, por hormonas esteroideas especialmente glucocorticoides, puede incrementar la expresión de una enzima resultando en la reducción o la amplificación del efecto de la droga. También pueden incrementar los efectos tóxicos colaterales, no propios de la droga sino de sus metabolitos (Prough et al, 1996). En este sentido se sostiene que la dexametasona actúa sobre el metabolismo del clenbuterol, sin poder presuponer su efecto toxicológico final.

Otra interacción posible de la dexametasona con el clenbuterol es a través de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. El grado de ocupación de receptores disponibles y la afinidad del receptor por el agonista influirían en la magnitud de la respuesta en un dado tejido.

El trazador Clemb-BSA-Biotina, desarrollado en el capítulo 3, mostró reacción específica con receptores  $\beta$ -adrenérgicos en membranas de células hepáticas. Esta afinidad permitió marcar la presencia de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la superficie celular. El agregado de dexametasona en el medio de cultivo no produjo cambios en la densidad de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en células fibroblásticas. En células parenquimáticas no se registró unión específica del trazador, al grado de sensibilidad de la técnica. Esto podría indicar diferentes fenómenos: ausencia de receptores  $\beta$  en células parenquimáticas o presencia a niveles no detectables por la técnica utilizada.

Las drogas que actúan como  $\beta$ -agonistas, tienen el potencial de mejorar la eficiencia de la producción animal incrementando el crecimiento muscular y disminuyendo la deposición de grasa. Sin embargo, el efecto se produce por un período corto, posiblemente porque el número de  $\beta$  adrenoreceptores disminuye. Intentamos

visualizar un posible aumento del número de receptores  $\beta$  en células hepáticas por tratamiento con un corticosteroide, que se conoce, tiene este tipo de efectos en sistemas *in vivo* y en otros tejidos (Abraham et al, 2004; Odore et al, 2004). Sin embargo no se observó un aumento evidente de la intensidad de la fluorescencia por esta técnica no cuantitativa. La técnica de cultivo podría impedir una correcta expresión de receptores en un tipo celular.

## **6. Conclusiones y perspectivas.**

Se ha desarrollado un enzimoimmunoensayo altamente específico, sensible y robusto. Estas características se lograron gracias a la obtención de un trazador biotinilado que amplifica la señal, un antisuero con buena especificidad y un diseño de ensayo adecuado que minimiza las interferencias.

En el desarrollo del trabajo se obtuvieron tres trazadores con capacidad de unión al anticuerpo y directa o indirectamente a una enzima de revelado: clenbuterol unido a fosfatasa alcalina (clenb-FA) y clenbuterol unido a biotina por una molécula “puente”: Tiramina (CTB) o BSA (CBB). Los trazadores CTB y CBB, tienen acoplado el clenbuterol y la biotina, lo que permite utilizar el sistema avidina-biotina, para acoplarse a una enzima y un reactivo de color, o a un reactivo fluorescente.

La técnica de acoplamiento de clenbuterol a una proteína, ya ha sido descrita, pero por primera vez se la utiliza para la síntesis de un “trazador”. El derivado CBB así obtenido, resultó excelente en muchos aspectos: demostró reacción específica con el anticuerpo anticlenbuterol, es fácil de sintetizar y purificar, y es sumamente estable a distintas condiciones de almacenamiento. Más importante aún, es posible optimizar el nivel de amplificación de la señal controlando la cantidad de moléculas de biotina incorporadas por molécula de BSA.

En este trabajo se mostró que el trazador clembuterol-molécula “puente”-biotina puede usarse no sólo en enzimoimmunoensayos sino también, en otras reacciones de afinidad a proteínas, como las de unión al receptor. Los ensayos en extractos de membranas o en células en cultivo, señalaron unión específica al trazador. Si analizamos la estereoquímica de la unión ligando-receptor es interesante destacar que el acoplamiento del trazador se produce aún con el clembuterol unido a un grupo voluminoso como la BSA. Es probable que el clembuterol se asocie a residuos tirosina de polipéptidos externos de la estructura de la BSA, de tal manera de permitir, no sólo el reconocimiento por la inmunoglobulina en el EIA, sino también por las moléculas del receptor celular.

Se realizaron pruebas con otro “trazador” sintetizado, clembuterol unido a biotina por Tiramina (CTB), que dieron buenos resultados, sin embargo los obtenidos con el trazador de clembuterol unido a biotina por BSA (CBB) son aún mejores. Un ejemplo de esto es la marcación fluorescente de receptores específicos en células, que sólo puede detectarse gracias a la amplificación que provee el trazador CBB, al asociar numerosas moléculas de biotina por molécula de clembuterol unida a un receptor. En el caso del trazador CTB, esta relación es (1:1), una molécula de biotina por molécula activa de clembuterol, con una baja tasa de amplificación de la señal. En marcación fluorescente de receptores en células este factor es crítico, y como consecuencia de la baja amplificación, la señal inespecífica endógena de fluorescencia enmascara la señal específica de CTB, pero no de CBB. Por otro lado, aparentemente no existe un impedimento

estérico para la unión de múltiples moléculas de EFA y de Avidina –FITC, a la molécula de BSA-Biotina. Esto se comprueba por el incremento de la señal en trazadores con mayor cantidad de residuos de biotina.

El antisuero producido resultó eficiente para enzimoimmunoensayos, mostró una alta afinidad por el clenbuterol, por la molécula derivada Clemb-BSA y por los trazadores Clemb-BSA-Biotina (CBB) y Clemb-Tiramina-Biotina (CTB), tanto en solución como fijado a una fase estacionaria. El anticuerpo presenta una baja reacción cruzada con la mayoría de los compuestos probados, y en particular con la epinefrina (el agonista endógeno), lo que permitirá el análisis de agonistas en muestras biológicas sin mayores purificaciones previas de la muestra. Gracias a las características mencionadas no fue necesaria una purificación ulterior antígeno-específica del antisuero. Sin embargo no se descarta esta posibilidad para el caso de utilización del anticuerpo en otras aplicaciones, que así lo requieran, como matrices de cromatografía por inmunoafinidad.

Los distintos trazadores y el anticuerpo permitieron diseñar distintos sistemas de enzimoimmunoensayos, cada uno con cualidades propias que permiten distintos usos. Todos permitieron la cuantificación de cantidades pequeñas de clenbuterol con una sensibilidad adecuada para su empleo en la detección y cuantificación de residuos en tejidos. En particular el diseño competitivo y el complejo final detectado: fase estacionaria-anticlenbuterol-CBB-EFA, cumple con características de sensibilidad, selectividad, precisión y robustez que lo hacen



sumamente apto para el análisis de residuos, y con él se detectó clenbuterol en pelo y suero de animales inyectados. Pero en otras aplicaciones, como por ejemplo: la cuantificación de moléculas de clenbuterol acopladas por molécula de fosfatasa alcalina (sección 3.5.1), se utilizó con éxito el diseño por titulación de anticuerpos, con Clemb-BSA inmovilizado en la fase sólida. En este caso, la reacción se produce con el anticuerpo en forma soluble, lo que facilita la aproximación al antígeno por varios lados, y así una múltiple captura de anticuerpos por los epítopes accesibles de la molécula clemb-FA.

El análisis en pelo brinda la posibilidad de realizarlo en animales en pie. Esta capacidad la comparte con el análisis en orina, pero la gran ventaja a favor del uso del pelo como matriz de análisis, proviene de la alta afinidad del clenbuterol por la melanina, que evita la eliminación metabólica y permite su detección aún a 30 días posteriores a la deprivación de la droga. El corto tiempo de vida media del clenbuterol en suero, no permitió detectarlo en dicha matriz, a 24 horas posteriores a su aplicación, y puede estar señalando una rápida absorción por los tejidos. Como conclusión, este experimento demostró que a través del análisis de residuos, se distingue obviamente, el uso del clenbuterol como anabólico de cuando es requerido con fines terapéuticos.

Los residuos de una droga pueden representar una dosis farmacológicamente activa en tejidos comestibles. Sin embargo, existen dificultades en el desarrollo de estrategias analíticas para la detección de residuos, y esto incluye el

conocimiento de su metabolismo en especies de producción animal. En este trabajo se utilizó un sistema *in vitro* para evaluar los metabolitos útiles en la vigilancia de residuos.

Para realizar estudios metabólicos *in vitro* es muchas veces difícil establecer un cultivo primario de hepatocitos. En este trabajo se logró un método de aislamiento de hepatocitos bovinos para cultivo, que es simple y fácil de aplicar, particularmente en situaciones en que las muestras de tejido tienen que ser trasladadas.

Los resultados obtenidos en estos sistemas *in vitro*, mostraron que el metabolismo del clenbuterol es muy escaso, aproximadamente del 1%. Esto señala a la droga madre, el clenbuterol como tal, como preferida de para control de residuos. Esta característica coincide además con una larga vida media, que hace del clenbuterol un agonista de acción prolongada, y condice con el largo período post aplicación en que aún se pueden detectar residuos en tejidos animales.

Los numerosos sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo de xenobióticos, han sido clasificados en: fase I (oxigenasas, reductasas, hidrolasas) y fase II (enzimas de conjugación). Las enzimas de la familia P450, las más importantes de la fase I, activan químicamente a las moléculas, inclusive hacia posibles carcinógenos o toxinas. La fase II del metabolismo facilita la

eliminación de las drogas y la inactivación de las moléculas. (Maurel, 1996; Gonzalez y Yu, 2006). En nuestro caso se detectaron productos de fases I y II del metabolismo del clenbuterol. En particular, se encontró un metabolito conjugado de una especie mucho más hidrofóbica que el clenbuterol. Esto parecería indicar la formación de compuestos intermediarios reactivos, productos de la fase I del metabolismo, más difíciles de eliminar por el organismo, y potencialmente tóxicos. Finalmente, de acuerdo a las estructuras sugeridas de metabolitos, la N-hidroxilación del clenbuterol parece ser el camino metabólico principal, en este sistema en cultivo, y posiblemente la oxidación posterior de arilaminas.

La presencia de dexametasona en los cultivos alteró el perfil metabólico. Este efecto, que sólo se observó en relación a un metabolito, es un interesante punto de partida para estudios más completos, tendientes a elucidar el mecanismo de inhibición de este paso metabólico. Posibles caminos de investigación para la elucidación de estructuras N-oxidadas del clenbuterol implicarían la preparación de estos derivados por oxidación química y su comparación cromatográfica con los metabolitos encontrados.

El anticuerpo obtenido reconoce moléculas de clenbuterol acopladas a proteínas, que tienen comprometido el grupo amino aromático en esta unión. Esto hace suponer que metabolitos N-oxidados del clenbuterol, tendrán reacción cruzada con este anticuerpo, y por lo tanto serán detectados en el EIA. Así mismo, en este trabajo se ha comprobado que los receptores  $\beta$  adrenérgicos se acoplan a los

trazadores CBB y CTB, por lo cual los productos metabólicos de la N-oxidación del clenbuterol podrían también ocupar el sitio en el receptor. Esto los haría potencialmente activos aunque quedaría por comprobar si desencadenan algún tipo de respuesta adrenérgica en la célula.

El trazador CBB marcó la presencia de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la superficie de células de hígado bovino. En células de Ito (fibroblásticas) se identificó una marca específica, no así en células parenquimáticas. Esto podría indicar diferentes fenómenos: ausencia de receptores  $\beta$  adrenérgicos en células parenquimáticas o presencia a niveles no detectables por la técnica utilizada. La densidad de estos receptores no se vio afectada apreciablemente por agregado de dexametasona en los cultivos. Quedaría por confirmar estos resultados por un análisis cuantitativo, aplicado a células en suspensión como la citometría de flujo por fluorescencia.

Suponemos que la marcación de receptores se produce en la superficie de la membrana celular, pues esa es la localización de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de migración del “trazador”, tras la permeabilización de la membrana durante el proceso de fijación con formaldehído. Esto abriría la posibilidad, de sintetizar nuevos trazadores para hormonas de receptores intracelulares, con la ventaja de la amplificación de la señal que proviene del número de biotinas por molécula de BSA.

Un paso indispensable en la producción de anticuerpos dirigidos contra epitopes pequeños, como el clenbuterol u hormonas no proteicas, es el acoplamiento de éstas a proteínas, lo que le provee de inmunogenicidad. Dado que la biotinylación de proteínas es un paso muy sencillo de síntesis, la obtención de este tipo de “trazadores” es una herramienta muy potente para el desarrollo de enzimoimmunoensayos de una gran variedad de moléculas.

Para el clenbuterol, obtuvimos un trazador que es reconocido además por receptores celulares, y puede utilizarse en ensayos cualitativos. Sin embargo, se presenta una limitación en ensayos de cuantificación de sitios de unión (gráfica de Scatchard), puesto que es difícil asignar una “actividad específica” al trazador. En otras palabras, aunque podamos conocer la relación exacta entre moléculas de biotina y clenbuterol en la molécula de trazador, no es posible medir con exactitud la cantidad de sitios de unión al receptor por una dada señal de color que producirán las fosfatasa acopladas. Sin embargo se podrían diseñar procedimientos para aproximar ese valor, que darán medidas de constantes de afinidad y cantidad de sitios con cierto error.

En resumen, se ha desarrollado un enzimoimmunoensayo para clenbuterol que facilitará la vigilancia del uso de estas drogas. El empleo de este ensayo en pelo bovino permite su detección de clenbuterol a largos plazos posteriores a su aplicación. Para el ensayo se obtuvo una molécula “trazador”, con capacidad, de ser reconocida por el anticuerpo, pero también por receptores celulares del

agonista endógeno. Estudios metabólicos *in vitro* confirman que el clenbuterol, como tal, es la molécula preferida para análisis de residuos. Queda abierta la posibilidad de la síntesis de “trazadores” similares para otras moléculas, para el desarrollo de enzimoimmunoensayos u otros usos como la marcación de estructuras celulares.

## 7. Bibliografía

Abraham G., Gottschalk, J., Ungemach F.R. 2004. Possible role of dexamethasone in sensitizing the beta-2-adrenergic receptor system in vivo in calves during concomitant treatment with clenbuterol. *Pharmacology*. 72:196–204.

Adam A., Gervais N., Panoyan A., Ong H., Beliveau L., Ayotte C., Delahaut P. 1994. Detection of clenbuterol residues in hair. *Analyst*. 119:2663-2666.

Adcock I.M., Maneechotesuwan K., Usmani O. 2002. Molecular interactions between glucocorticoids and long-acting  $\beta$ 2-agonists. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 110:S261–S268.

Adeola O., McBride B.W., Young L.G. 1992a. Metabolic responses induced by isoproterenol in ractopamine-fed pigs. *J. Nutr.* 122:1280-1286.

Adeola O., Ball R.O., Young L.G. 1992b. Porcine skeletal muscle myofibrillar protein synthesis is stimulated by ractopamine. *J. Nutr.* 122:488-495.

Alston-Smith J., Pertoft H. 1995. Isolation of liver cells: a system for obtaining pure cells in monolayer cultures from a single rat liver. In: Doyle A, Griffiths JB, Newell DG (eds) *Cell and tissue culture*. pp.12B:14.1-14.9. Laboratory Procedures, John Wiley & Sons, New York, USA.

Allen P., Quirke J.F., Tarrant P.V. 1987. Effects of cimaterol on the growth, food efficiency and carcass quality of Friesian cattle. In: J. P. Hanrahan (Ed.) *Beta-Agonists and their effects on animal growth and carcass quality*. p 83. Elsevier Applied Science Publishers, Barking, U.K.

Anderson D.B., Veenhuizen E.L., Jones D.J., Schroeder A.L., D.L. Hancock. 1991. The use of phenethanolamines to reduce fat and increase carcass leanness in meat animals. In: C. Haberstroh and C. E. Morris (Ed) *Fat and cholesterol reduced foods: technologies and strategies*. (Vol. 12). pp 43. Adv. Appl. Biotechnol. Ser.

Andersson L.I., Mosbach K. 1990. Enantiomeric resolution on molecularly imprinted polymers prepared with only non-covalent and non-ionic interactions. *Journal of Chromatography A*. 516 (2):313-322.

Ansell R.J., Ramström O., Mosbach K. 1996. Towards artificial antibodies prepared by molecular imprinting. *Clin. Chem*. 42:1506–1512.

Antignac J.P. 2001. Dosage et étude du métabolisme des corticostéroïdes dans l'espèce bovine par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. PhD Thesis, Nantes University, France.

Arch J.R.S., Kaumann A.J. 1993.  $\beta$ 3 and atypical  $\beta$ -adrenoceptors. *Med. Res. Rev.* 13:663-729.

- Baker P.K., Dalrymple R.H., Ingle D.L., Ricks C.A. 1984. Use of a  $\beta$  adrenergic antagonist to alter muscle and fat deposition in lambs. *J. Anim. Sci.* 59:1256.
- Bardsley R.G., Allcock S.M.J., Dawson J.M., Dumelow N.W., Higgins J.A., Lasslett Y.V., Lockley A.K., Parr T., Buttery P.J. 1992. Effect of  $\beta$ -agonists on expression of calpain and calpastatin activity in skeletal muscle. *Biochimie* 74:267-273.
- Beermann D.H. 1989. Status of current strategies for growth regulation. In: D. R. Campion, G. J. Hausman, and R. J. Martin (Ed.) *Animal Growth Regulation*. pp 377-400. Plenum Publishing Corp., New York.
- Beermann D.H., Butler W.R., Hogue D.E., Fishell V.K., Dalrymple R.H., Ricks C.A., Scanes C.G. 1987. Cimaterol induced muscle hypertrophy and altered endocrine status in lambs. *J. Anim. Sci.* 65:1514-1524.
- Beermann D.H., Campion D.R., Dalrymple R.H. 1985. Mechanisms responsible for partitioning tissue growth in meat animals. *Recip. Meat Conf. Proc.* 38:105.
- Beermann D.H., Hogue D.E., Fishell V.K., Dalrymple R.H., Ricks C.A. 1986. Effects of cimaterol and fishmeal on performance, carcass characteristics and skeletal muscle growth in lambs. *J. Anim. Sci.* 62:370.
- Beermann D.H., Wang S.Y., Armbruster G., Dickson H.W., Rickes E.L., Larson J.G. 1989. Influences of beta-agonist L- 655,871 and electrical stimulation on post-mortem muscle metabolism and tenderness in lambs. *Recip. Meat Conf. Proc.* 42:54.
- Belfrage P. 1985. Hormonal control of lipid degradation. In: A. Cryier and R. L. R. Van (Ed.) *New Perspectives in Adipose Tissue: Structure, Function and Development*. Pp. 121. Butterworths, London.
- Berge P., Culioli J., Renerre M., Lacourt A., Renou J.P., Ouali A., Fournier R., Dominguez B., Berry M. 1990. Utilisation dun  $\beta$ -agoniste (clenbuterol) pour la production de veau deboucherie. 11: Influence sur la qualiti. de la viande. *Viandes Prod. Carnes* 11:235.
- Bergen W.G., Johnson S.E., Skjaerlund D.M., Babiker A.S., Ames N.K., Merkel R.A., Anderson D.B. 1989. Muscle protein metabolism in finishing pigs fed ractopamine. *J. Anim. Sci.* 67:2255-2262.
- Bergen W.G. y Merkel R.A. 1991. Body composition of animals treated with partitioning agents: Implications for human health. *FASEB J.* 5:2951-2957.
- Berry M.N. y Friend D.S. 1969. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* 43:506-520.
- Berry M.N., Edwards A.M., Barritt G.J. 1991. Isolated Hepatocytes preparation, properties and applications. In: Burdon R.H. and van Knippenbergr P.H. (eds.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.



- Bhatia S.N., Balis U.J., Yarmush M.L., Toner M. 1998. Microfabrication of hepatocyte/fibroblast co-cultures: role of homotypic cell interactions. *Biotechnol. Prog.* 14:378-387.
- Blum J. W. y Flueckiger N. 1988. Early metabolic and endocrine effects of perorally administered  $\beta$ -adrenoceptor agonists in calves. *Eur. J. Pharmacol.* 151:177-187.
- Boenisch B. y Quirke J.F. 1992. Safety assessment of  $\beta$  agonists. In: H. A. Kuiper and L.A.P. Hoogenboom (Ed.) *In vitro toxicological studies and real time analysis of residues in food, FLAIR-Concerted Action No. 8. Proceedings of the Workshop held in Ghent, May 22-24, 1992, and Thessaloniki, October 30-31, 1992.* pp 102-124. RIKILT-DLO, Wageningen, The Netherlands.
- Bohorov O., Buttery P.J., Correia J.H.R.D., Soar J.B. 1987. The effect of the  $\beta$ -adrenergic agonist clenbuterol on implantation with estradiol plus trembelone acetate on protein metabolism in wether lambs. *Br. J. Nutr.* 57:99.
- Bowen W.P., Flint D.J., Vernon R.G. 1992. Regional and interspecific differences in the ligand binding properties of  $\beta$  adrenergic receptors of individual white adipose tissue depots in the sheep and rat. *Biochem. Pharmacol.* 44:681-686.
- Buttery P.J. y Dawson J.M. 1987. The mode of action of beta agonists as manipulators of carcass composition. In: J. P. Hanrahan (Ed.) *Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality.* pp 2943. Elsevier Applied Science, New York.
- Calvarese S., Rubini P., Urbani G., Ferri N., Ramazza V., Zucchi M. 1994. Experimental administration of 19-Nortestosterone and Dexametasone in cattle: elimination of the two drugs in different biological matrices. *Analyst.* 119, 2611-2615.
- Cardoso L.A. y Stock M.J. 1998. Effect of clenbuterol on endocrine status and nitrogen and energy balance in food-restricted rats. *J. Anim. Sci.* 76:1012-1018.
- Carlström D., Bergin R., Falkenberg G. 1973. Molecular characteristics of biogenic monoamines and their analogs. *Q. Rev. Biophys.* 6:257-310.
- Claeys M.C., Mulvaney D.R., McCarthy F.D., Gore M.T., Marple D.N., Sartin J.L. Skeletal muscle protein synthesis and growth hormone secretion in young lambs treated with clenbuterol. *J Anim Sci* 67: 2245-2254.
- Courtheyn D., Le Bizec B., Brambilla G., De Brabander H.F., Cobbaert E., Van de Wiele M., Vercammen J., De Wash K. 2002. Recent developments in the use and abuse of growth promoters. *Analytica Chimica Acta*, 473:71-82.
- Courtheyn D., Verheye N., Bakeroot V., Dal V., Schilt R., Hooijerink H., Van Bennekom E.O., Haasnoot W., Stouten P., Huf F.A. 1993. Detection of corticosteroids in animal feed and premixes: a new category of growth promoters. pp 251-256. *Proceedings of the EuroResidue II Conference.*

- Cunningham H.M. 1965. Effect of epinephrine and nicotine on protein and fat metabolism of pigs. In: K. L. Blaxter (Ed.) *Energy Metabolism*. pp 29-36. Academic Press, New York.
- Dalrymple R.H., Baker P.K., Gengher P.K., Ingle D.L., Pensack J.M., Ricks C.A. 1984. A repartitioning agent to improve performance and carcass composition in broilers. *Poult Sci* 63: 2376–2383.
- Dazzi, G., Madarena G., Campesato E., Campanini G., Chizzolini R. 1991. Beta-agonist treatment of heavy pigs. Effects on growth, carcass and meat quality parameters. *Fleischwirtsch.* 71:179.
- Degand G., Bernes-Duyckaerts A., Maghuin-Rogister G. 1992 Determination of clenbuterol in bovine tissues and urine by enzyme immunoassay. *J. Agric. Food Chem.* 40:70-75.
- Donkin S.S. y Armentano L.E. 1993. Preparation of extended in vitro cultures of bovine hepatocytes that are hormonally responsive. *J. Anim. Sci.* 71:2218-2227.
- Dursch I. y Meyer H.H.D. 1993. In vitro investigation of pagonist accumulation in the eye. *Analytica Chimica Acta* 275:189.
- Dursch I., Meyer H.H.D, Karg H.1995. Accumulation of the  $\beta$ -agonist clenbuterol by pigmented tissues in rat eye and hair of veal calves. *J.Chrom. Sci.* 73:2050-2053.
- Easson, L. H. y Stedman E. 1933. CLXX. Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action. V. Molecular dissymmetry and physiological activity. *Biochem. J.* 27:1257-1266.
- Eisemann, J.H., Huntington G.B., Ferrell C.L. 1988. Effects of dietary clenbuterol on metabolism of the hindquarters in steers. *J. Anim. Sci.* 66:342-353.
- Elliot C.T., McCaughey W.J., Shortt H.D. 1993. Residues of the beta-agonist clenbuterol in tissue of medicated farm animals. *Food Additives and Contaminants.* 10:231-244.
- Elliott C.T., Crooks S.R.H., McEvoy J.D.V., McCaughey W.J., Hewitt S.A., Patterson D., Kilpatrick D. 1993. Observations on the effects of long-term withdrawal on carcass composition and residue concentrations in clenbuterol-medicated cattle. *Veterinary Research Communications* 17:459-468.
- Elliott C.T., McCagughey W.J., Crooks S.R.H., McEvoy J.D.G., Kennedy D.G. 1995. Residues of Clenbuterol in cattle receiving therapeutic doses: Implications for differentiating between legal and illegal use. *Veterinary Quaterly*, 17:100-102.
- Emery P.W., Rothwell N.J., Stock M.J., Winter D.D. 1984. Chronic effects of -adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Biosci. Rep.* 4:83.

- Fabry J., Deroanne C., Buts B., Demeyer D., Sommer M. 1990. Effect of cimaterol on carcass and meat characteristics in cull cows. *J. Anim. Sci.* 68(Suppl. 1):332 (Abstr.).
- Festoff B.W., Oliver K.L., Reddy N.B. 1987. In vitro studies of skeletal muscle membranes: adenylate cyclase of fast and slow twitch muscle and the effects of denervation. *J. Membr. Biol.* 32:331.
- Feve B., Emorine L.J., Lasnier E., Blin N., Baude B., Nahmias C., Strosberg A.D., Pairault J. 1991. Atypical  $\beta$ -adrenergic receptor in 3T3-F442A adipocytes: pharmacological and molecular relationship with the human  $\beta$ 3-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 266:20329-20336.
- Fiems L.O. 1987. Effect of beta adrenergic agonists in animal production and their mode of action. *Ann. Zootech.*, 36(3):271-290.
- Fiems L.O., Buts B., Boucqué C.V., Demeyer D. I., Cottyn B.G. 1990. Effect of a  $\beta$ -agonist on meat quality and myofibrillar protein fragmentation in bulls. *Meat Sci.* 27:29.
- Fink-Gremmels J. y van Miert A.S.J.P.A.M. 1994. Veterinary drugs: disposition, biotransformation and risk evaluation. *Analyst* 119:2521 – 2528.
- Forsell J.H., Jesse B.W., Shull L.R. 1985. A technique for isolation of bovine hepatocytes. *J. Anim. Sci.* 60:1597-1609.
- Fry J.R., Jones C.A., Wiebkin P., Bellemann P., Bridges J.W. 1976. The enzymic isolation of adult rat hepatocytes in functional and viable state. *Anal. Biochem.* 71:341-350.
- Funaki N., Tanaka J., Sugiyama T., Ohshio G., Nonaka A., Yotsumoto F., Sugie T., Imamura M. 2002. Successive cultures of mature hepatocyte autotransplantation to assist liver function after liver resection for cancer. *Oncol. Reports* 9:713-721.
- Geerts A., Niki T., Hellemans K., den Craemer D., Van Den Berg K., Lazou J.M., Stange G., Van Den Winkel M., De Bleser P. 1998. Purification of rat hepatic stellate cells by side scatter-activated cell sorting. *Hepatology* 27(2):590-598.
- Geesink G. H., Smulders F.J.M., van Laack H.L.J.M., van der Kolkt J. H., Wensing Th., Breukink H. J. 1993. Effects on meat quality of the use of clenbuterol in veal calves. *J. Anim. Sci.* 71:1161-1170
- Groot M., Schilt R., Haasnoot W., Berende P.L.M., Ramazza V., Courtheyn D., Vercammen J., Logghe M. 1996. Veal calves treated with a low dosage of prednisolone. Histological and analytical data. pp 440-445. Proceedings of the Euro Residue III Conference.
- Guyer C.G. y Miller M.A. 1994. Human food safety evaluation of repartitioning agents. In: H. D. Hafs and R. G. Zimbelman (Ed.) *Low-Fat Meats: Design Strategies and Human Implications*. pp 53-63. Academic Press, San Diego, CA.

- Haasnoot W., Stouten P., Schilt R., Hooijerink D. 1998. A fast immunoassay for the screening of  $\beta$ -agonist in hair. *Analyst* 123:2707-2710.
- Hanrahan J.P. (Ed.). 1987. Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality. Elsevier Applied Science, London.
- Hanrahan J.P., Fitzsimons J.M., McEwan J.C., Allen P., Quirke J.F. 1987. Effects of the beta-agonist cimaterol on growth, food efficiency and carcass quality in sheep. In: J. P. Hanrahan (Ed.) Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality. pp 106. Elsevier Applied Science Publishers, Barking, U.K.
- Harlow E. y Lane D. 1988. Antibodies. A Laboratory Manual. Ed. Cold Spring. Harbor Laboratory.
- Hausdorff W.P., Caron M.G., Lefkowitz R.J. 1990. Turning off the signal: desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptor function. *The FASEB Journal* 4:2881-2889.
- Heel R.C., Brogden R.N., Speight T.M., Avery G.S. 1978. Fenoterol: A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in asthma. *Drugs* 15:3-32.
- Hieble J.P., Bondinell W.E., Ruffolo R.R. 1995.  $\alpha$ - and  $\beta$ - Adrenoceptors: from the gene to the clinic. 1. Molecular biology and adrenoceptor subclassification. *J. Med. Chem.* 38:3415-3444.
- Hoey A.J., Reich M.M., Davis G., Shorthose R., Sillence M.N. 1995.  $\beta$ 2-adrenoceptor densities do not correlate with growth, carcass quality, or meat quality in cattle. *J. Anim. Sci.* 73:3281-3286.
- Hoffman B.B. y Lefkowitz R.J. 1990. Catecholamines and sympathomimetic drugs. In: A. G. Gilman, T. W. Rall, A. S. Nies, and P. Taylor (Ed.) Goodman and Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. pp 187-220. Pergamon Press, New York.
- Horiba M., Murai T., Nomura K., Yuge T., Sanai K., Osada E. 1984. Pharmacokinetic studies of mabuterol, a new selective  $\beta$ 2-stimulant. II: Urinary metabolites of mabuterol in rats and their pharmacological effects. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 34: 1668-1679.
- Houseknecht K.L., Bauman D.E., Carey G.B., Mersmann H.J. 1995. Effect of bovine somatotropin and food deprivation on  $\beta$ -adrenergic and A1 adenosine receptor binding in adipose tissue of lactating cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 12:325-336.
- Howe R. 1993.  $\beta$ 3-Adrenergic agonists. *Drugs Future* 18:529-549.
- Howells L., Godfrey M., Sauer M.J. 1994. Melanin as an adsorbent for drug residues. *Analyst.* 119:2691.
- Hu C.Y., Novakofski J., Mersmann H.J. 1988. Clenbuterol stimulated increase of plasma free fatty acids in reserpinized pigs. *Comp. Biochem. Physiol.* 91C:619-622.

- Illera J.C., Silván G., Blass A., Martinez M.M., Illera M. 1998. The effect of clenbuterol on adrenal function in rats. *Analyst* 123:2521-2524.
- Jakoby W.B. 1980. *Enzymatic Basis of Detoxication. Volumes I and II.* Academic Press, New York.
- Jones R.W., Easter R.A., McKeith F.K., Dalrymple R.H., Maddock H.M., Bechtel P.J. 1985. Effect of the  $\beta$ -adrenergic agonist cimaterol (CL 263,780) on the growth and carcass characteristics of finishing swine. *J. Anim. Sci.* 61:905.
- Kearns C.F., McKeever K.H., Malinowski K., Struck M.B., Abe T. 2001. Chronic administration of therapeutic levels of clenbuterol acts as a repartitioning agent. *J Appl Physiol* 91:2064-2070.
- Kim Y.S., Sainz R.D., Summers R.J., Molenaar P. 1992. Cimaterol reduces  $\beta$ -adrenergic receptor density in rat skeletal muscles. *J. Anim. Sci.* 70:115-122.
- Kobilka B.K., Matsui H., Kobilka T.S., Yang-Feng T.L., Francke U., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Regan J.W. 1987. Cloning, sequencing and expression of the gene coding for the human platelet  $\alpha_2$ -adrenergic receptor. *Science* 238:650-656.
- Koohmaraie M. y Shackelford S.D. 1991. Effect of calcium chloride infusion on the tenderness of lambs fed a  $\beta$ -adrenergic agonist. *J. Anim. Sci.* 69:2463.
- Koohmaraie M., Shackelford S.D., Muggli-Cockett N.E., Stone R.T. 1991. Effect of the  $\beta$ -adrenergic agonist L644,969 on muscle growth, endogenous proteinase activities, and postmortem proteolysis in wether lambs. *J. Anim. Sci.* 69:4823-4835.
- Kretchmar D.H., Hathaway M.R., Epley R.J., Dayton W.R. 1990. Alterations in postmortem degradation of myofibrillar proteins in muscle of lambs fed a  $\beta$ -adrenergic agonist. *J. Anim. Sci.* 68:1760-1772.
- Kuiper H.A., Noordam M.Y., van Dooren-Flipsen M.M.H. 1996. Illegal use of  $\beta$ -adrenergic agonists: International. *J. Anim. Sci.* 74(Suppl. 1):207 (Abstr.).
- Kunos G. 1981. *Adrenoceptors and Catecholamine Action vol I part A*, Ed. McGill University.
- Landsberg L. y J. B. Young. 1992. Catecholamines and the adrenal medulla. In: J. D. Wilson and D. W. Foster (Ed.) *Williams Textbook of Endocrinology*. pp 621-705. W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
- Ligget S.B. 2002. Update on current concepts of the molecular basis of  $\beta_2$ -adrenergic receptor signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 11:S223-S228.
- Liggett S.B. y Raymond J.R. 1993. Pharmacology and molecular biology of adrenergic receptors. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 7:279-305.

- Liu C.-C., Yen J.-Y., Ou B.-R., Forsberg N.E. 1994. Actions of a beta-adrenergic agonist on muscle protein metabolism in intact, adrenalectomized, and dexamethasone-supplemented adrenalectomized rats. *J. Nutr. Biochem.* 5:4349.
- Lövgren U., Kronkvist K., Johansson G., Edholm L.E. 1994. Enzyme amplified immunoassay for steroids in biosamples at low picomolar concentrations. *Anal. Chim. Acta*, 288:227-235.
- MacLennan P.A. y Edwards R.H.T. 1989. Effects of clenbuterol and propranolol on muscle mass. *Biochem. J.* 264:573–579.
- Mak J.C., Nishikawa M., Shirasaki H., Miyayasu K., Barnes P.J. 1995. Protective effects of a glucocorticoid on down-regulation of pulmonary  $\beta_2$ -adrenergic receptors in vivo. *The Journal of Clinical Investigation.* 96:99–106.
- Maltin C.A., Delday M.I., Hay S.M. 1990. The effect of clenbuterol administration in utero and throughout lactation on pre- and post-natal muscle development in the rat. *Growth Dev. Aging* 54:143.
- Maltin C.A., Delday M.I., Hay S.M., Smith F.G., Loble G.E., Reeds P.J. 1987. The effect of the anabolic agent, clenbuterol, on overloaded rat skeletal muscle. *Biosci. Rep.* 7:143.
- Maltin C.A., Delday M.I., Reeds P.J. 1987. The effect of the  $\beta_2$ -adrenergic drug clenbuterol on fiber type distribution in the hind leg muscles of young rats. *Biosci. Rep.* 6:293.
- Maltin C.A., Hay S.M., Delday M.I., Loble G.E., Reeds P.J. 1989. The action of  $\beta$ -agonist clenbuterol on protein metabolism in innervated and denervated phasic muscle. *Biochem J* 261: 965– 971.
- Maltin C.A., Hay S.M., Delday M.I., Reeds P.J., Palmeir R.M. 1989. Evidence that the hypertrophic action of clenbuterol on denervated rat muscle is not propranolol sensitive. *Br. J. Pharmacol.* 96:817.
- Malucelli K., Ellendorff F., Meyer H.H.D. 1994. Tissue distribution and residues of Clenbuterol, Salbutamol, and Terbutaline in tissues of treated broiler chickens. *J. of Anim. Sci.* 72:1555-1560.
- Martinez F., Hernandez G., Quiros J.R., Margolles M., Miguel C. 1992. Epidemiological surveillance pertaining to the 1990-1992 epidemic arising from illicit use of  $\beta$ -agonist in Spain. *Proc. of 3rd World Congr. of Foodborne Infections and Intoxications.* 2:724.
- Martinez-Navarro J.F. 1990. Food poisoning related to consumption of illicit  $\beta$ -agonist in liver. *Lancet* 336:1311.

- Maurel P. 1996. The use of adult human hepatocytes in primary culture and other in vitro systems to investigate drug metabolism in man. *Advanced Drug Delivery Reviews* 22:105-132.
- McKeith F.K., Lan Y.H., Beermann D.H. 1994. In: H. D. Hafs, and R. G. Zimbelman (Ed.) *Low-Fat Meats: Design Strategies and Human Implications*. pp 233-252. Academic Press, San Diego, CA.
- McMillan D.N., Noble B.S., Delday M.I., Maltin C.A. 1990. Nerve extract and clenbuterol stimulate differentiation in myogenic cultures. *J. Neurol. Sci.* 8(Suppl.):183 (Abstr.).
- McMillan D.N., Noble B.S., Maltin C.A.. 1992. The Effect of the  $\beta$ -adrenergic agonist clenbuterol on growth and protein metabolism in rat muscle cell cultures. *J. Anim. Sci.* 70:3014-3023.
- McNeel R.L. y Mersmann H.J. 1995.  $\beta$ -adrenergic receptor subtype transcripts in porcine adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 73:1962-1971.
- Merkel R.A. 1988. Is meat quality affected by the use of repartitioning agents? *Recip. Meat Conf. Proc.* 41:101.
- Mersmann H.J. 1986. Postnatal expression of adipose tissue metabolic activity associated with a porcine genetic obesity. *J. Anim. Sci.* 63:741-746.
- Mersmann H.J. 1987. Acute metabolic effects of adrenergic agents in swine. *Am. J. Physiol.* 252:E85-E95.
- Mersmann H.J. 1989a. Acute changes in blood flow in pigs infused with  $\beta$ -adrenergic agonists. *J. Anim. Sci.* 67:2913-2920.
- Mersmann H.J. 1989b. Influence of infused  $\beta$ -adrenergic agonists on porcine blood metabolites and catecholamines. *J. Anim. Sci.* 67:2633-2645.
- Mersmann H.J. 1989c. Potential mechanisms for repartitioning of growth by  $\beta$ -adrenergic agonists. In: D. R. Campion, G. H. Hausman, and R. J. Martin (Ed.) *Animal Growth Regulation*. pp 337-357. Plenum Publishing Corp., New York.
- Mersmann H.J. 1990. Metabolic and endocrine control of adipose tissue accretion. In: J. D. Wood and A. V. Fisher (Ed.) *Reducing Fat in Meat Animals*. pp 1011-44. Elsevier Applied Science, New York.
- Mersmann H.J. 1995. Species variation in mechanisms for modulation of growth by beta-adrenergic receptors. *J. Nutr.* 125:1777S-1782S.
- Mersmann H.J. 1998. Overview of the effects of  $\beta$ -adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action, *J. Anim. Sci.* 76:160-172.

- Mersmann H.J. y Hu C.Y. 1987. Factors affecting measurements of glucose metabolism and lipolytic rates in porcine adipose tissue slices in vitro. *J. Anim. Sci.* 64:148-164.
- Meyer H.H.D. y Rinke L.M. 1991. The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *J. Anim. Sci.* 69:4538-4544.
- Miller M.F., Garcia D.K., Coleman M.E., Ekeren P.A., Lunt D.K., Wagner K.A., Procknor N., Welsh T.H. Jr, Smith S.B. 1988. Adipose tissue, longissimus muscle and anterior pituitary growth and function in clenbuterol-fed heifers. *J. Anim. Sci.* 66:12.
- Mills S. y Mersmann H.J. 1995. Beta-adrenergic agonists, their receptors, and growth: special reference to the peculiarities in pigs. In: S. B. Smith and D. R. Smith (Ed.) *The Biology of Fat in Meat Animals: Current Advances*. pp 1-34. American Society of Animal Science, Champaign, IL.
- Mitchell G.A. 1996. Illegal use of  $\beta$ -adrenergic agonists: Domestic. *J. Anim. Sci.* 74(Suppl. 1):207 (Abstr.).
- Moloney A., Allen P., Joseph R., Tarrant V. 1991. Influence of beta-adrenergic agonists and similar compounds on growth. In: A. M. Pearson, and T. R. Dutson (Ed.) *Growth Regulation in Farm Animals. Advances in Meat Research (Vol. 7)*. pp 455-513. Elsevier Applied Science, New York.
- Morgan D.J. 1990. Clinical pharmacokinetics of b-agonists. *Clin. Pharmacokinet.* 18:270-294.
- Morgan J.B., Calkins C.R., Jones S.J. 1988. Cimaterol-fed broiler chickens: Changes in tenderness, cathepsin B activity and composition. *J. Anim. Sci.* 66(Suppl. 1):278 (Abstr.).
- Muir L.A. 1988. Effects of beta-adrenergic agonists on growth and carcass characteristics of animals. In: *Designing Foods: Animal Production Options in the Marketplace*. p 184. National Academy Press, Washington, DC.
- Nakamura T., Tomita Y., Ichihara A. 1983a Density-dependent growth control of adult rat hepatocytes in primary culture. *J. Biochemistry* 94:1029-1035.
- Nakamura T., Yoshimoto K., Nacayama Y., Tomita Y., Ichihara A. 1983b Reciprocal modulation of growth and differentiated functions of mature hepatocytes in primary culture by cell-cell contact and cell membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:7229-7233.
- Nazzal, C.A. 1985. The clinical pharmacology of clenbuterol. *Southwest. Vet.* 36:121-125.
- Nelson D.R., Kamataki T., Waxman D.J., Guengerich F.P., Estabrook R.W., Feyereisen R., González F.J., Coon M.J., Gunsalus I.C., Gotoh. O., Okuda K., Nebert D. 1993. The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers. Early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 12:1-51.



- NRC. 1994. Effect of metabolic modifiers on nutrient requirements of growing ruminants. In: *Metabolic Modifiers: Effects on the Nutrient Requirements of Food-Producing Animals*. pp 30-37. National Academy Press, Washington, DC.
- Odore R., Badino P., Pagliasso S., Nebbia C., Cuniberti B., Barbero R., Re G. 2006. Changes in lymphocyte glucocorticoid and  $\beta$ -adrenergic receptors in veal calves treated with clenbuterol and steroid hormones for growth-promoting purposes. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 29:91–97.
- Odore R., D'Angelo A., Badino P., Bellino C., Pagliasso S., Re G. 2004. Road transportation induces modification of blood hormone levels and lymphocyte glucocorticoid and  $\beta$ -adrenergic receptor concentrations in veal calves. *The Veterinary Journal*, 168:297–303.
- Ordway G.A., O'Donnell J.M., Frazer A. 1987. Effects of clenbuterol on central beta-1 and beta-2 adrenergic receptors of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241:187-195.
- Ostrowski J.M., Kjelsberg A., Caron M.G., Lefkowitz R.J. 1992. Mutagenesis of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor: How structure elucidates function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:167-183.
- PDR. 1995. Monograph on Brethineâ (terbutaline sulfate). *Physicians Desk Reference (49th Ed.)*. p 1060. Medical Economics and Data Production Co., Montvale, NJ.
- Pietri-Rouxel F. y Strosberg A.D. 1995. Pharmacological characteristics and species-related variations of  $\beta_3$ -adrenergic receptors. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 9:211-218.
- Plan CREHA, 2007. Plan Nacional de Control de Residuos e Higiene en Alimentos, SENASA.
- Pollettini A., Segura J., Gonzalez G., de la Torre X., Montagna M. 1995. Clenbuterol and  $\beta$ -adrenergic drugs detected in hair of treated animals by ELISA. *Clinical chemistry.* 41:945-946.
- Prather I.D., Brown D.E., North P., Wilson J.R. 1995. Clenbuterol: a substitute for anabolic steroids? *Med Sci Sports Exerc* 27:1118–1121.
- Price A.H. y Clissold S.P. 1989. Salbutamol in the 1980's: A reappraisal of its clinical efficacy. *Drugs* 38:77-122.
- Prough R.A., Under M.W., Pinaire J.A., Mao G.-H., Falkner K.C. 1996. Hormonal regulation of hepatic enzymes involved in foreign compound metabolism. *FASEB J.* 10:1369-1377.
- Pulce C., Lamaison D., Keck G., Bostvironnois C., Nicolas J., Descotes J. 1991. Collective human food poisonings by clenbuterol residues in veal liver. *Vet. Hum. Toxicol.* 33:480.

Re G., Badino P., Novelli A., Girardi C. 1995. Down-regulation of b-adrenergic receptors and up-regulation of estrogen and progesterone receptors induced in the reproductive system of female veal calves by dietary clenbuterol. *American Journal of Veterinary Research*, 56, 1493–1497.

Resolución N°609, 2007, SENASA.

Resolución N° 447, 2004, SENASA.

Ricks C. A., Baker P.K., Dalrymple R.H. 1984. Use of repartitioning agents to improve performance and body composition of meat animals. *Reciprocal Meat Conf. Proc.* 37:5-11.

Ricks C.A., Baker P.K., Dalrymple R.H., Doscher M.E., Ingle D.L., Pankavish J. 1984. Use of clenbuterol to alter muscle and fat accretion in swine. *Fed. Proc.* 43:851.

Ricks C.A., Dalrymple R.H., Baker P.K., Ingle D.L. 1994. Use of a  $\beta$ -agonist to alter fat and muscle deposition in steers. *J Anim Sci* 59:1247–1255.

Rikhardsson G., Johnson K.A., Johnson D.E. 1991. Effects of cimaterol on energetics and carcass characteristics of Suffolk ewe lambs. *J. Anim. Sci.* 69:396-404.

Rogers K.L. y Fazen J.M. 1991. Effect of Beta-agonist on protein turn over isolated chic skeletal and atrial muscle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 197:482.

Rothwell N.J. y Stock M.J. 1987. Effect of the selective  $\beta_2$ - adrenergic (clenbuterol) on energy balance and body composition in normal and protein deficient rats. *Biosci. Rep.* 7:933.

Rothwell N.J. y Stock M.J. 1988. Increased bodyweight gain and body protein in castrated and adrenalectomised rats treated with clenbuterol. *Br. J. Nutr.* 80:355.

Ruffolo R.R., Spradlin T.A., Pollock G.D., Waddell J.E., Murphy P.J. 1981. Alpha and beta adrenergic effects of the stereoisomers of dobutamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219: 447-452.

Sainz R.D., Kim Y.S., Dunshea F.R., Campbell R.G. 1993. Effects of ractopamine in pig muscles: Histology, calpains and b-adrenergic receptors. *Aust. J. Agric. Res.* 44:1441-1448.

Salleras L., Domínguez A., Mata E., Taberner J.L., Moro I., Salvá P. 1995. Epidemiologic study of an outbreak of clenbuterol poisoning in Catalonia, Spain. *Public Health Rep.* 110:338-342.

Sasse H.H. y Hajer R. 1978. NAB 365, a  $\beta_2$  receptor sympathomimetic agent: clinical experience in horses with lung disease. *J Vet Pharmacol Ther* 1: 241–243.

- Sauer M.J., Pickett R.J.H., Mac Kenzie A.L. 1993. Determination of clenbuterol residues in bovine liver, urine and eye by enzyme immunoassay. *Anal. Chim. Acta*, 275: 195-203.
- Sauer M.J. y Anderson S.P.L. 1994. In vitro and In vivo studies of drug residue accumulation in pigmented tissues. *Analyst*. 119:2553.
- Sauer M.J., Dave M., Lake B.G., Manchee G.R., Hopocillos L.C., Coldham N.G. 1999. *Xenobiotica* 29(5):483-497.
- SENASA. 2001. Resultados de las investigaciones de Residuos. Plan CREHA.
- Sensky P.L., Parr T., Bardsley R.G., Buttery P.J. 1996. The relationship between plasma epinephrine concentration and the activity of the calpain enzyme system in porcine longissimus muscle. *J. Anim. Sci.* 74:380-387.
- Shull L., Kirsch D.G., Lohse C.L., Carlson G.P., Doody L.A., Wisniewski J.A. 1986. Xenobiotic metabolism in suspension and primary cultures of isolated hepatocytes prepared from caudate process of bovine liver. *Am. J. Vet. Res.* 49(9):2043-2052.
- Sillence M.N. y Matthews M.L. 1994. Classical and atypical binding sites for  $\beta$ -adrenoceptor ligands and activation of adenylyl cyclase in bovine skeletal muscle and adipose tissue membranes. *Br. J. Pharmacol.* 111:866-872.
- Smith D.J. 1998a. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of  $\beta$ -adrenergic agonists in livestock. *J. Anim. Sci.* 76:173-194.
- Smith D.J. 1998b. Total radioactive residues and clenbuterol residues in edible tissues, and the stereochemical composition of clenbuterol in livers of broilers after exposure to three levels of dietary [ $^{14}\text{C}$ ]clenbuterol HCl and three preslaughter withdrawal periods. *J. Anim. Sci.* 76:3043-3053.
- Smith D.J. y Paulson G.D. 1997. Distribution, elimination, and residues of [ $^{14}\text{C}$ ]Clenbuterol HCl in holstein calves. *J. Anim. Sci.* 75:454-461.
- Smith D.J., Ehrenfried K.M., Dalidowicz J.D., Turberg M.P. 2002. Binding of ractopamine HCl to ocular tissues of cattle and turkeys in vivo and to melanin in vitro. *J. Anim. Sci.* 80:2931-2941.
- Smith S.B., Garcia D.K., Anderson D.B. 1989. Elevation of a specific mRNA in longissimus muscle of steers fed ractopamine. *J. Anim. Sci.* 67:3495-3502.
- Spurlock M.E., Cusumano J.C., Mills S.E. 1993. The affinity of ractopamine, clenbuterol, and L-644,969 for the  $\beta$ -adrenergic receptor population in porcine adipose tissue and skeletal muscle membrane. *J. Anim. Sci.* 71:2061-2065.
- Spurlock M.E., Cusumano J.C., Ji S.Q., Anderson D.B., Smith C.K., Hancock D.L., Mills S.E. 1994. The effect of ractopamine on  $\beta$ -adrenoceptor density and affinity in porcine adipose and skeletal muscle tissue. *J. Anim. Sci.* 72:75-80.

- Steele N.C., Boyd R.D., Campbell R.G. 1994. Growth, metabolic modifiers, and nutrient considerations. In: H. D. Hafs and R. G. Zimbelman (Ed.) *Low-Fat Meats: Design Strategies and Human Implications*. pp 167-189. Academic Press, San Diego, CA.
- Stoffel B. y Meyer H.H.D. 1993. Effects of the  $\beta$ -adrenergic agonist clenbuterol in cows: lipid metabolism, milk production, pharmacokinetics, and residues. *J. Anim. Sci.* 71:1875-1881.
- Strosberg A.D. 1992. Biotechnology of b-adrenergic receptors. *Mol. Neurobiol.* 4:211-250.
- Strosberg A.D. 1993. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors *Protein Science* 2:1198-1209.
- Strosberg A.D. y Marullo S. 1992. Functional expression of G protein-coupled receptors in microorganisms. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 95-98.
- Strosberg A.D., Camoin L., Blin N., Maigret B. 1993. In receptors coupled to GTP-binding proteins, ligand binding and G-protein activation is a multistep dynamic process. *Drug Design Discovery* 9:199-211.
- Thiel L.F., Beermann D.H., Fishell V.K., Crooker B.A. 1987. Effects of cimaterol on growth of hypophysectomized rats. *FASEB J.* 46:1176A.
- Van Liefde I., Van Ermen A., van Witzenburg A., Fraeyman N., Vauquelin G. 1994. Species and strain-related differences in the expression and functionality of  $\beta$ -adrenoceptor subtypes in adipose tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 327:69-86.
- Vlatakis G., Andersson L., Muller R., Mosbach K. 1993. Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature* 361: 645-7.
- Walsh J.S., Patanella J.E., Halm K.A., Facchine K.L. 1995 Ann improve HPLC assay for the assesement of liver slice metabolic viability using 7-ethoxycoumarin. *Drug Metab. Dispos.* 23(8):869-874.
- Wallis C.J. 1993. Salbutamol, salmeterol. A chemist's perspective. *Actual. Chim. Ther.* 20:265-291.
- Wang S.-Y. y Beermann D.H. 1988. Reduced calcium-dependent proteinase activity in cimaterol-induced muscle hypertrophy in lambs. *J. Anim. Sci.* 66:2545-2550.
- Warriss P.D., Nute G.R., Rolph T.P., Brown S.N., Kestin S.C. 1991. Eating quality of meat from pigs given the betaadrenesc agonist salbutamol. *Meat Sci.* 30:75.
- Watt P.W., Madon R.J., Flint D.J., Vernon R.G. 1990. Effects of growth hormone on the beta-adrenergic receptor number of rat adipocyte membranes. *Biochem. Soc. Trans.* 18:486.

- Weber N.E. 1992. Use of xenobiotics in food-producing animals in the United States. In: D. H. Hutson, D. R. Hawkins, G. D. Paulson, and C. D. Struble (Ed.) *Xenobiotics and Food-Producing Animals*. p 19. American Chemical Society, Washington, DC.
- Weiner N. 1980. Norepinephrine, epinephrine, and the sympathomimetic amines. In: A. Goodman-Gilman, L. S. Goodman, A. Gilman, S. E. Mayer, and K. L. Melmon (Ed.) *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (6th Ed.). pp 138-173. Macmillan Publishing Co., New York.
- William R. S., Caron M.G., Daniel K. 1984. Skeletal muscle  $\beta_2$ -adrenergic receptors: Variations due to fiber type and training. *Am. J. Physiol.* 246:E160.
- Williams L.T. y Lefkowitz R.J. 1978. *Receptor Binding Studies in Adrenergic Pharmacology*. Raven Press, New York.
- Witkamp R.F. 1996. Pharmacological and toxicological properties of  $\beta$ -adrenergic agonists. In: G. Enne, H. A. Kuiper, and A. Valentini (Ed.) *Residues of Veterinary Drugs and Mycotoxins in Animal Products: New Methods for Risk Assessment and Quality Control*. pp 113-123. Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands.
- Witkamp R.F. y van Miert A. 1992. Pharmacology and therapeutic use of  $\beta_2$ -agonists. In: H. A. Kuiper and L. Hoogenboom (Ed.) *In Vitro Toxicological Studies and Real Time Analysis of Residues in Food, FLAIR-Concerted Action No. 8. Proceedings of the Workshop held in Ghent, May 22-24, 1992, and Thessaloniki, October 30-31, 1992*. pp 75-88. RIKILT-DLO, Wageningen, The Netherlands.
- Woodward K.N. 1992. Use and regulation of veterinary drugs. In: D. H. Hutson, D. R. Hawkins, G. D. Paulson, and C. D. Struble (Ed.) *Xenobiotics and Food-Producing Animals*. p 2. American Chemical Society, Washington, DC.
- Yamamoto I. e Iwata K. 1982. Enzyme immunoassay for clenbuterol, and  $\beta_2$ -adrenergic stimulants. *J Immunoassay*, 3:155-171.
- Yang Y.T. y McElligott M.A. 1989. Multiple actions of  $\beta$ -adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. *Biochem. J.* 261:1-10.
- Yen J.T., Nienaber J.A., Klindt J., Crouse J.D. 1991. Effect of ractopamine on growth, carcass traits, and fasting heat production of U.S. contemporary crossbred and Chinese Meishan pure- and crossbred pigs. *J. Anim. Sci.* 69:4810-4822.
- Zalko D., Perdu Durand E., Debrauwer L., Bec Ferte M.P., Tulliez J. 1998. Comparative metabolism of clenbuterol by rat and bovine liver microsomes and slices. *Drug Metab.Dispos.* 26(1):28-35.
- Zalko D., Debrauwer L., Bories G., Tuilliez J. 1997. Evidence for a new and major metabolic pathway of clenbuterol involving in vivo formation of an N-hydroxyarylamine. *Chem. Res. Toxicol.* 10:197-204.

Zeman R.J., Ludemann R., Etlinger J.D. 1987. Clenbuterol, a  $\beta_2$ -agonist, retards atrophy in denervated muscles. *Am. J. Physiol.* 252:E152.

Zhang D., Li S., Huang J., Luo G. 2006. Selective adsorption and steric recognition by Molecularly Imprinted Polymers: a study on molecular self-assembly and its effect on selectivity. *High Performance Polymers.* 18: 949–960

Zimmerli U.V. y Blum J.W. 1990. Acute and longterm metabolic, endocrine, respiratory, cardiac and skeletal muscle activity changes in response to perorally administered  $\beta$ -adrenoceptor agonists in calves. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 63:157-172.