

# Efecto de la combinación

## levotiroxina-clenbuterol sobre la arteria aorta en ratas Sprague-Dowley

*The effect of combined levothyroxine-clenbuterol over aortic artery in Sprague-Dowley rats*

María Armas<sup>1</sup>, Claudia Guarino<sup>1</sup>, Manuel Moya<sup>2,3</sup>, Emilio Suniaga<sup>3</sup>, Abelardo Morales<sup>4</sup>, Aniceto Méndez<sup>1</sup>, Kimberly Brewer<sup>5</sup>, Thomas Tobin<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Facultad de Farmacia Universidad Santa María, Caracas-Venezuela.

<sup>2</sup>Instituto de Medicina Experimental Facultad de Medicina Universidad Central de Venezuela.

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Higiene Dr. Rafael Rangel. <sup>4</sup>Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Edificio de Sanidad Animal, Campus de Rabanales Ctra. de Madrid km 396, 14071, Córdoba Universidad de Córdoba, España. 51711 Lakefield North Court, Wellington, FL 33414 USA. <sup>6</sup>Maxwell H. Gluck Equine Research Center, University of Kentucky, Lexington USA.

Recibido: 20/10/2013

Aceptado: 21/11/2013

### Resumen

El objetivo describir el efecto de la medicación combinada Levotiroxina-clenbuterol sobre la aorta en ratas Sprague-Dowley. Se establecieron 4 grupos de tratamiento para ratas Sprague-Dowley. Los animales fueron medicados por 21 días con Clenbuterol; Levotiroxina; Clenbuterol + Levotiroxina vía oral. Fue practicada eutanasia y necropsia. Se realizó un estudio macroscópico, morfológico de la arteria aorta, fueron colectadas muestras de aorta para estudio histológico. Los resultados se presentan a continuación: el grupo control evidencio la aorta normal. El Grupo Clenbuterol: en la túnica media: cambios degenerativos con vacuolización intracitoplasmática (25%). Así como necrosis de coagulación focal (10%). Hipertrofia marcada de la intima con aumento en la producción de fibras de colágeno, en la túnica adventicia: cambios degenerativos focales moderados. En el Grupo Levotiroxina: en la túnica media: se observan cambios degenerativos con vacuolización intracitoplasmática (15%). Hipertrofia marcada de la intima con aumento en la producción de fibras de colágeno, en la túnica adventicia: cambios degenerativos focales leves. El Grupo Clenbuterol + Levotiroxina: en la túnica intima: no se observaron lesiones significativas, en la túnica media: se observan cambios degenerativos con vacuolización intracitoplasmática (10%). Hipertrofia marcada de la intima con aumento en la producción de fibras de colágeno, en la túnica adventicia: no se observaron lesiones significativas. En conclusión describimos los patrones morfológicos, macroscópicos e histológicos la aorta en la terapéutica con Clenbuterol, Levotiroxina, Clenbuterol-Levotiroxina en ratas Sprague/Dowley.

**Palabras claves:** aorta, clenbuterol, levotiroxina, ratas.

### Abstract

The aim of this study was to describe the effect of the combined drugs Levothyroxine-clenbuterol on the aorta in Sprague-Dowley rats. Four treatments to Sprague-Dowley rats were established. The animals were dosed for 21 days with Clenbuterol; levothyroxine; Clenbuterol + Levothyroxine orally. Were practiced euthanasia and necropsy. Macroscopic study, morphological aortic artery, aorta samples were collected for histological study was conducted. The results are as follows: Control group evidenced normal aorta. Clenbuterol Group: in the tunica media: degenerative changes with intracytoplasmic vacuolization (25%). Focal necrosis and bleeding (10%). Marked hypertrophy of the intima with increased production of collagen fibers, the adventitia with moderate focal degenerative changes. Levothyroxine In Group: in the tunica media: degenerative changes with intracytoplasmic vacuolization (15%) are observed. Marked hypertrophy of the intima with increased production of collagen fibers in the adventitia: mild focal degenerative changes. Clenbuterol + Levothyroxine Group: the intima: no significant lesions were observed in the tunica media: degenerative changes seen with intracytoplasmic vacuolization (10%). Marked hypertrophy of the intima with increased production of collagen fibers, in the adventitia no significant lesions. In conclusion we describe the morphological, macroscopic and histological patterns in the aorta with Clenbuterol therapy, levothyroxine, Levothyroxine Clenbuterol-in Sprague / Dawley rats.

**Keywords:** aorta, clenbuterol, levothyroxine, rats.

## Introducción

El uso de Clenbuterol y Levotiroxina como suplemento en caballos en entrenamiento es común en muchos Hipódromos a nivel mundial, la muerte súbita de siete caballos en California USA, en los cuales fueron detectadas estas dos sustancias ha generado múltiples especulaciones en cuanto a su uso en caballos<sup>3</sup>. La levotiroxina (Thyro-L), es una hormona tiroidea (T4) que se utiliza para tratar el hipotiroidismo, con el propósito de restaurar la actividad metabólica normal. La levotiroxina tiene efectos similares a la adrenalina que incluyen aumento del ritmo cardíaco, palpitations, hipertensión, taquicardia, nerviosismo y aumento del riesgo de arritmias cardíacas<sup>4</sup>. Los riesgos de la sobre-medición de caballos con función tiroidea normal (eutiroideo) incluyen indicaciones claramente cardiovasculares adversos y síntomas de hipertiroidismo que puede ser mortal cuando se combina con otros medicamentos en particular, Clenbuterol y agonistas de receptores N-metil de aspartato (ketamina). Su uso en conjunto con el clenbuterol elimina de manera potente la grasa, mientras que la ketamina puede aumentar el riesgo de insuficiencia cardíaca. El Clenbuterol es un medicamento broncodilatador (agonista  $\beta$ -2-adrenergico), se emplea en la industria de las carreras para problemas respiratorios y como anabolizante<sup>4</sup>. El Clenbuterol aumenta el tamaño de las células del músculo del corazón debido a la mayor producción de colágeno, un material elástico que reduce la capacidad del corazón para bombear la sangre y puede potencialmente conducir a un paro cardíaco<sup>9</sup>. El colágeno también interfiere con las señales eléctricas enviadas a través de las células del músculo cardíaco para que siga bombeando con regularidad y pueden producir arritmias (latidos cardíacos irregulares). Existe un considerable interés en el uso potencial de las drogas (Levothyroxine, clenbuterol, ractopamina, hidrokloride) y suplementos (picolinato chromion, magnesio) en los programas de pérdida de peso para los caballos<sup>3</sup>, pero pocos de estos agentes han sido evaluados en estudios bien diseñados. Los estudios en caballos no obesos han demostrado que la administración crónica clenbuterol reduce la adiposidad<sup>3</sup>. Sin embargo, estos estudios también revelaron efectos adversos incluyen una disminución de la función cardíaca. Por lo tanto, el uso de clenbuterol no puede ser justificado para el manejo de la obesidad. Estudios recientes también han demostrado que la administración de levotiroxina de sodio puede aumentar la pérdida de peso en los caballos; su uso en el manejo de los caballos con síndrome metabólico equino es recomendado<sup>10</sup>. En algunos países específicamente en la Comunidad Europea es prohibido el uso de clenbuterol en animales, mientras que en otros países es permitido en caballos atletas solo durante entrenamiento pero es prohibido su uso en pruebas públicas (ARCI: Asociación Internacional Comisionada para las Carreras, Penalización Clase B)<sup>17,18</sup>. En virtud de esta importante área de estudio planteamos como objetivo describir el efecto de la medicación combinada Levotiroxina-clenbuterol sobre la aorta en ratas Sprague-Dowley.

## Material y método

Se establecieron 4 grupos de tratamiento (comprendido por 4 animales cada uno), para ratas Sprague-Dowley, como se muestra en la tabla N°1. Los animales fueron medicados por 21 días de la siguiente manera:

Grupo 1.- Clenbuterol: vía oral 5mg/kg<sup>4</sup>.

Grupo 2.- Levotiroxina: vía oral 0.2mg/kg.

Grupo 3.- Clenbuterol + Levotiroxina: vía oral (5mg/kg-0.2mg/kg).

Grupo 4.- Control: se le administro solución fisiológica: vía oral.

Tabla N°1.- Grupos de tratamiento de ratas.

Animales	Clenbuterol	Levotiroxina	Clen+Levo	Control	Total
Ratas Sprague-Dowley	4	4	4	4	16

Fue practicada eutanasia de acuerdo al protocolo internacional y posteriormente se le realizo la técnica de necropsia<sup>1,2</sup>. Se realizo un estudio macroscópico, morfológico de la aorta, en los cuales se tomaron las medidas de acuerdo a los protocolos descritos en la literatura<sup>5,6</sup>. Fueron colectadas muestras de aorta, las cuales se fijaron en formol por 24 horas y procesadas por los métodos convencionales de procesamiento histológico<sup>2</sup>. Se realizo un análisis estadístico (estadística descriptiva) y ANOVA.

## Resultados

Los resultados morfológicos se presentan a continuación:

Tabla N°2.- Presentación de resultados morfológicos de la aorta en ratas Sprague Dowley medicadas con clenbuterol y Levotiroxina.

GRUPOS RATAS SPRAGUE DOWLEY /promedio	MORFOMETRIA (micras)
CLENBUTEROL (5mg/kg) 21días	3658,25
LEVOTIROXINA (2mg/kg) 21días	3665,96
CLENBUTEROL/LEVOTIROXINA (5mg/kg + 2mg/kg) 21días	4198,29
CONTROL 21días	2934,00
	Media: 3614,13 Desviación Estándar 519,12

La comparación de grupos fue la siguiente (ANOVA):  
COMPARACION DE GRUPOS (ANOVA):

SS	df	MS	F	p	
<b>Between:</b>	<b>3,233,810.583</b>	<b>3</b>	<b>1,077,936.861</b>	<b>4.000</b>	<b>0.035</b>
<b>Within:</b>	<b>3,233,826.893</b>	<b>12</b>	<b>269,485.574</b>		
<b>Total:</b>	<b>6,467,637.476</b>	<b>15</b>			

Los resultados macroscópicos e histológicos en ratas Sprague-Dowley, se presentan a continuación en la tabla N°3.

**Tabla N°3.- Presentación de resultados macroscópicos e histológicos de la aorta de ratas Sprague Dowley medicadas con clenbuterol y Levotiroxina.**

Grupos ratas sprague dowley	Macroscopia	Histopatología
CLENBUTEROL (5mg/kg) 21días	No se observaron lesiones significativas.	<u>TUNICA INTIMA</u> : No se observaron lesiones significativas. <u>TUNICA MEDIA</u> : se observan cambios degenerativos con vacuolización intracitoplasmática (25%). Así como necrosis de coagulación focal (10%). Hipertrofia marcada de la intima con aumento en la producción de fibras de colágeno (Colágeno tipo III y IV). <u>TUNICA ADVENTICIA</u> : cambios degenerativos focales.
LEVOTIROXINA (2mg/kg) 21días	No se observaron lesiones significativas.	<u>TUNICA INTIMA</u> : No se observaron lesiones significativas. <u>TUNICA MEDIA</u> : se observan cambios degenerativos con vacuolización intracitoplasmática (15%). Hipertrofia marcada de la intima con aumento en la producción de fibras de colágeno (Colágeno tipo III y IV). <u>TUNICA ADVENTICIA</u> : cambios degenerativos focales.
CLENBUTEROL/ LEVOTIROXINA (5mg/kg + 2mg/kg) 21días	No se observaron lesiones significativas.	<u>TUNICA INTIMA</u> : No se observaron lesiones significativas. <u>TUNICA MEDIA</u> : se observan cambios degenerativos con vacuolización intracitoplasmática (10%). Hipertrofia marcada de la intima con aumento en la producción de fibras de colágeno (Colágeno tipo III y IV). <u>TUNICA ADVENTICIA</u> : No se observaron lesiones significativas.
CONTROL 21días	No se observaron lesiones significativas.	<u>TUNICA INTIMA</u> : No se observaron lesiones significativas. <u>TUNICA MEDIA</u> : No se observaron lesiones significativas. <u>TUNICA ADVENTICIA</u> : No se observaron lesiones significativas.

A continuación se presentan imágenes de los cortes histológicos de la aorta representativos de cada grupo de tratamiento en ratas.

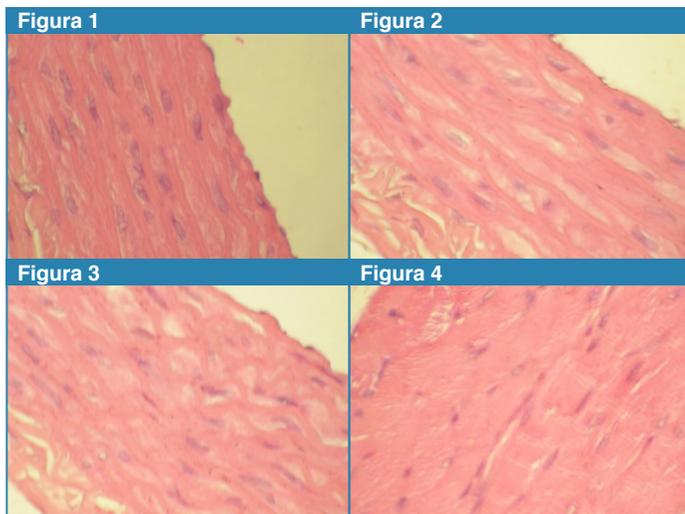


Figura 1.- Grupo Control: Histopatología de la arteria aorta (H&E 40X), en la cual se evidencia la Túnica intima, la Túnica media y la Túnica adventicia normal. Figura 2.- Grupo Clenbuterol: Histopatología de la arteria aorta (H&E 40X), en la cual se evidencia en la Túnica intima: No se observaron lesiones significativas, Túnica media: se observan cambios degenerativos con vacuolización intracitoplasmática (25%). Así como necrosis de coagulación focal (10%). Hipertrofia marcada de la intima con aumento en la producción de fibras de colágeno (Colágeno tipo III y IV). Túnica adventicia: cambios degenerativos focales moderados. Figura 3.- Grupo Levotiroxina: Histopatología de la arteria aorta (H&E 40X), en la cual se evidencia en la Túnica intima: No se observaron lesiones significativas, Túnica media: se observan cambios degenerativos con vacuolización intracitoplasmática (15%). Hipertrofia marcada de la intima con aumento en la producción de fibras de colágeno (Colágeno tipo III y IV). Túnica adventicia: cambios degenerativos focales leves. Figura 4.- Grupo Clenbuterol + Levotiroxina: Histopatología de la arteria aorta (H&E 40X), en la cual se evidencia en la Túnica intima: No se observaron lesiones significativas, Túnica media: se observan cambios degenerativos con vacuolización intracitoplasmática (10%). Hipertrofia marcada de la intima con aumento en la producción de fibras de colágeno (Colágeno tipo III y IV), Túnica adventicia: No se observaron lesiones significativas.

## Discusión

En cuanto a la medicación establecida clenbuterol, levotiroxina y su combinación (Clenbuterol-Levotiroxina), en general se observaron mayores cambios significativos en la aorta de las ratas medicadas con clenbuterol. Se evidenciaron cambios degenerativos e severos en comparación con los otros grupos de tratamiento y el grupo control, lo cual coincide con los reportes en la literatura e inclusive estudios en miocitos del corazón de ratas en dosis terapéuticas<sup>4</sup>. Los cambios histológicos fueron menos evidentes en el grupo de levotiroxina en comparación con el grupo Clenbuterol y el grupo Clenbuterol + Levotiroxina. En todos los grupos de tratamiento se observó hipertrofia de la media excepto el grupo control. La cual es una importante evidencia del efecto del clenbuterol a largo plazo como un riesgo potencial circulatorio cardiovascular ya que puede disminuir la capacidad contráctil de la arteria aorta e incrementar la resistencia periférica vascular así como el efecto de estenosis vascular, que se puede evidenciar durante el ejercicio o bajo situaciones de estrés. En este estudio no se consideraron las variables estrés y ejercicio en las ratas pero ha sido propuesto para un experimento futuro en conjunto con los niveles de cortisol. Un estudio en caballos de raza Standardbred medicados con clenbuterol a dosis terapéutica de manera crónica mostró un aumento considerable de las dimensiones de la raíz de la aorta 29,9 +/- 6.1%; 24.0 +/- 1,7%), lo que sugiere un mayor riesgo de rotura de la aorta<sup>7</sup>, esto parece coincidir con los resultados obtenidos en este estudio. Estudios de la pared de la aorta bajo disfunción de las hormonas tiroideas sugieren cambios significativos en la pared de la intima y media de la aorta bajo condiciones de hipotiroidismo. El espesor de la túnica media

aumentó en los grupos de hipertiroidismo y hipotiroideos en un 75% y 35%<sup>10</sup>. Además, el área relativa de colágeno aumentó en los grupos mencionados anteriormente por 142% y 120%, respectivamente<sup>10</sup>. Estos resultados relacionados al incremento del colágeno son similares a los observados el grupo medicado con Levotiroxina. En conclusión describimos los patrones morfológicos, macroscópicos e histológicos la aorta en la terapéutica con Clenbuterol, Levotiroxina, Clenbuterol-Levotiroxina en ratas Sprague/Dowley.

## Referencias

1. Aluja A, Constantino C. 2002. Técnicas de necropsia en animales domésticos. 2da edición. Manual Moderno. México, México. 2002. Pág. 103.
2. Banks W. Histología Veterinaria Aplicada. Segunda Edición Manual Moderno México. 1996. 487-492.
3. En: <http://tuesdayshorse.wordpress.com/2014/01/08/deadly-to-horses-the-baffert-effect-part-2/>
4. Goodman Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica (10ª ed.) (2 vols.) Mcgraw-Hill / interamericana de Mexico, 2003.
5. Jubb KVF, Kennedy Peter C, Palmer Nigel, Maxie M. Grant: Jubb, Kennedy and Palmer's. 2007. Pathology of domestic animals. 3 volúmenes. Ed M. Grant Maxie. Saunders-Elsevier.
6. Saija M. Savolainen, Julie F. Foley and Susan A. Elmore Histology atlas of the developing mouse heart with emphasis on E11.5 TO E18.5 2008. NIEHS, Cellular and Molecular Pathology Branch, Research Triangle Park, North Carolina, 27709, USA
7. Sleeper MM1, Kearns CF, McKeever KH. Chronic clenbuterol administration negatively alters cardiac function. Med Sci Sports Exerc. 2002 Apr;34(4):643-50.
8. Tobin; K. Brewer; K. Stirling. World rules for equine drug testing and therapeutic medication regulation. First edition. Wind publications. Chapter 14.- Thoroughbred Racing Regulation for Therapeutic drugs in Central and South America and the Caribbean. 2012. 217-.225.
9. Thompson, J. 2009. Effects of clenbuterol on skeletal and cardiac muscle in horses. A Thesis Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. USA.
10. Zaki SM1, Youssef MF. Thyroid hormone dysfunctions affect the structure of rat thoracic aorta: a histological and morphometric study. Folia Morphol (Warsz). 2013 Nov;72(4):333-9.