



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EFFECTOS DE LA INGESTA DE HÍGADO CON O SIN
CLEMBUTEROL SOBRE LA ESPERMATOGÉNESIS DEL
RATÓN**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

RICARDO FARABUNDO MAGALLÓN JUAN-QUI

DIRECTOR DE TESIS:

DR. UBALDO QUIRÓZ LÓPEZ

ENERO 2024



Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Ubaldo Quiroz Lopez, por su guía, apoyo y orientación durante este largo y arduo proceso. Su paciencia, dedicación y conocimientos me han sido de gran valor.

También Agradezco a la Dra. Rosalina María de Lourdes Reyes Luna, por su tiempo y atención. Sus comentarios y sugerencias han sido muy valiosos para enriquecer este trabajo.

Agradecimiento a la Dra. Dolores Lopez Morales por su tiempo y consideración para finalizar este proceso de titulación.

También quiero agradecer a mis compañeros y compañeras de investigación Carolina González Avalos, Daniela González Castillo, Gitsel Irais Hernández López, Paulina Ortiz García, Danae Rojas Arellano y Rodrigo Sosa León por su amistad, apoyo y colaboración.

Agradezco a mi familia y amigos por su apoyo incondicional durante todo este tiempo. Su amor y comprensión han sido fundamentales para mí.

En especial agradezco a Martha por ser mi compañera de vida, mi apoyo incondicional y mi inspiración.

Por último, y no menos importante quiero agradecer a la Facultad de Ciencias Biológicas de la BUAP, por brindarme la oportunidad de formarme como Profesional.

ÍNDICE

Título.....	1
Agradecimientos.....	2
Resumen.....	4
1. Introducción.....	5
1.1. Testículos.....	5
1.2. Espermatogénesis.....	7
1.3. Inervación.....	9
1.4. Amígdala.....	11
1.5. Clembuterol.....	14
2. Antecedentes.....	16
3. Justificación.....	18
4. Hipótesis.....	19
5. Objetivos.....	20
5.1. Objetivo General.....	20
5.2. Objetivos particulares.....	20
6. Material y métodos.....	21
6.1. Obtención de muestras.....	21
6.2. Análisis microscópico de los espermatozoides.....	22
6.3. Análisis histológico	22
6.4. Análisis morfométrico de Túbulos Seminíferos.....	24
6.5. Análisis estadístico.....	25
7. Resultados.....	26
7.1. Análisis espermático.....	26
7.2. Análisis morfométrico de los túbulos seminíferos.....	29
8. Discusión.....	34
9. Conclusión.....	37
10. Bibliografía.....	38
11. Anexo.....	43
12. Perspectivas.....	44

RESUMEN

En el ámbito internacional el uso del clenbuterol se está incrementando para mejorar el rendimiento en canal de varias especies domésticas. El presente estudio fue planteado para evaluar los efectos de la ingesta de hígado contaminado o no con clenbuterol sobre la cantidad, motilidad y viabilidad espermática, así como una evaluación del efecto de este agonista β 2-adrenérgico en el área epitelial en ratones de la cepa CD1 de 21 días de edad, se manejaron tres grupos (Control, Hígado e Hígado + Clb) con 12 ratones macho. Al grupo Control se le alimentó únicamente con alimento Harlan 2018s para ratones; al grupo Hígado se le administró una mezcla 2:1 de Harlan 2018s e hígado de res libre de clenbuterol y el grupo Hígado + Clb fue alimentado con una mezcla 2:1 de alimento Harlan 2018s e hígado de res de animales tratados con clenbuterol. 90 días después de iniciado el tratamiento, fueron sacrificados y llevados al laboratorio donde se disecaron los epidídimos y se procedió a la obtención de los espermatozoides de la cola del epidídimo y conducto deferente. Se evaluó la motilidad del espermatozoide en progresiva rápida, lenta, in situ o inmóvil. Para los cortes histológicos se fijaron los testículos y se deshidrataron se procedió a la inclusión en parafina para pasar a los cortes de 10 μ m de acuerdo con el manual Erma Tokyo. Después se utilizó la técnica de tinción Hematoxilina-Eosina (H-E), por último, fueron cubiertos con resina sintética para su análisis por microscopía. Los resultados muestran una disminución significativa en el número de espermatozoides en el grupo de Hígado + Clb respecto a los otros grupos, la motilidad progresiva rápida se incrementó y disminuyeron los espermatozoides inmóviles en este mismo grupo con respecto a los otros grupos. En la parte histológica el Área Epitelial total de los túbulos seminíferos del grupo Hígado + Clb se disminuyó significativamente con respecto a los otros grupos. Nuestros resultados sugieren que en el ratón la ingesta de hígado contaminado por clenbuterol provoca una disminución de espermatozoides, incrementa la motilidad, disminuye los espermatozoides inmóviles y disminuye el área epitelial de los túbulos seminíferos.

1. INTRODUCCION

Las vías de señalización hormonal y nerviosa intervienen en todos los procesos reproductivos de los mamíferos, tanto en hembras como en machos, también la diferenciación sexual, la producción de gametos y el control de la función gonadal por parte del hipotálamo y la hipófisis (Couse et al., 2006). El sistema reproductor masculino está conformado por los testículos, los conductos seminales, las glándulas sexuales accesorias y el pene (Setchell y Breed, 2006).

El clenbuterol es uno de los esteroides anabólicos más conocido en el área de producción de carne, tema de estudio del presente trabajo debido al alto grado residual que deja esta sustancia en los tejidos comestibles y sus posibles repercusiones en la salud pública (Domínguez-Vara et al., 2009). Promueve la disminución de grasa corporal y aumenta la cantidad de proteína muscular ya que inhibe la proteólisis y amplifica la lipólisis, pueden estimular cambios morfológicos, histológicos y bioquímicos en varios órganos de los animales expuestos. La exposición prolongada al clenbuterol induce un cambio en los niveles de estrógeno y la progesterona en el sistema reproductivo (Odore, R., et al., 2007)

1.1 Testículos

Los testículos son estructuras ovoides, que se encuentran adentro de las bolsas escrotales por fuera de la cavidad abdominal, están cubiertos por una cápsula blanca fibrosa llamada túnica albugínea, contienen varios túbulos muy retorcidos denominados túbulos seminíferos, donde ocurre la espermatogénesis. Estos túbulos se continúan a través de los conductos eferentes y la denominada red testicular (rete testis) con el epidídimo, un órgano con forma de coma localizado a lo largo del borde posterior testicular que tiene tres porciones. La cabeza, el cuerpo o porción central, y la cola (Tresguerres y Salazar, 2005). Las dos funciones primarias del testículo son la espermatogénesis y la esteroidogénesis (síntesis de andrógenos). Los andrógenos, sobre todo la testosterona, son indispensables para

la espermatogénesis, cumplen una función importante en el desarrollo del embrión para que el feto adquiriera el fenotipo masculino (Ross y Wojciech, 2009). Las células Leydig están localizadas en el compartimento intersticial entre los túbulos seminíferos del testículo, secretan andrógenos que inducen la diferenciación del conducto mesonéfrico (de Wolff) en el epidídimo y conducto deferente y algunas de las glándulas sexuales accesorias y los genitales externos como el pene y en la mayoría de los euterios, un escroto (Setchell y Breed, 2006). También son la fuente principal de testosterona en machos adultos (Gong, et al., 2009).

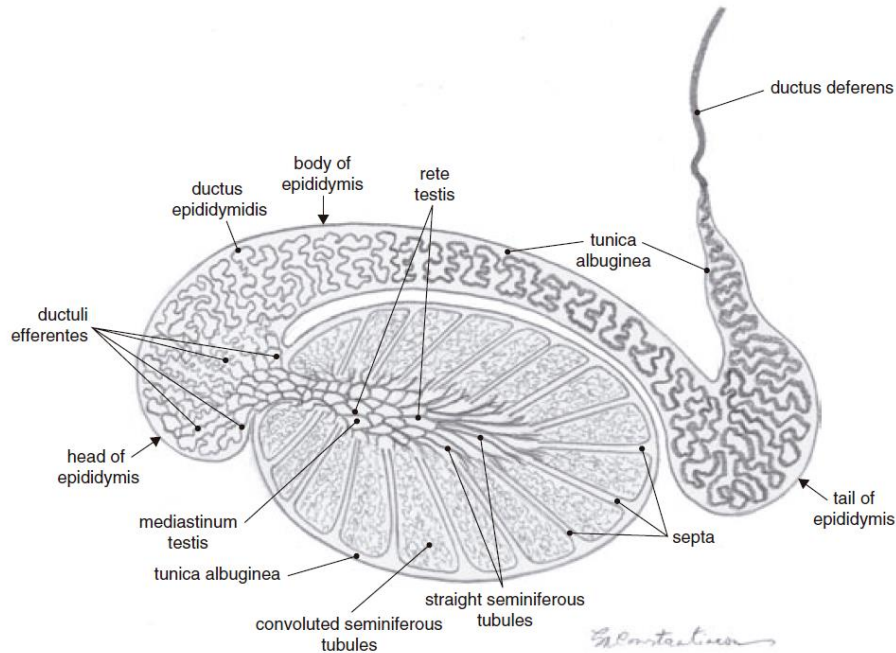


Figura 1. Organización interna del testículo y epidídimo. Modificado de Constantinescu, 2007.

Los túbulos seminíferos están revestidos por un epitelio estratificado altamente especializado, denominado epitelio germinativo o seminífero.

1.2 Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual las células germinales inmaduras sufren división, diferenciación y meiosis para dar lugar a espermátidas alargadas haploides y altamente especializadas (De Kretser, et al., 1988).

En el adulto, los túbulos seminíferos están compuestos por dos poblaciones celulares: una población no proliferativa de células de sostén, las células de Sertoli, que forman la membrana basal de los túbulos, y una población proliferativa de células germinativas, que migran continuamente desde la periferia del túbulo hacia la superficie luminal libre. Las Células germinales constituyen la mayor parte del túbulo seminífero y se distribuyen de forma ordenada desde la membrana basal a la luz tubular, de menos a más diferenciadas (Tresguerres y Salazar, 2005). Los elementos germinativos consisten en sucesivas generaciones de células dispuestas en el epitelio formando capas concéntricas bien definidas y comprenden, desde la periferia hacia el lumen, las espermatogonias, los espermatocitos y las espermátidas. El desarrollo de las células germinales está íntimamente asociado con las células de Sertoli (Geisinger, 2003).

Las células de Sertoli se dividen en el período fetal y neonatal temprano. Al final del período proliferativo sufren cambios morfológicos para asumir un estado terminalmente diferenciado capaz de apoyar el desarrollo de células germinales, la alteración puberal de factores que potencian su proliferación o interfieren con su maduración producen cambios en el tamaño testicular y en el potencial espermatogénico del adulto. Así pues, la duración del período proliferativo y el número de células de Sertoli producidas, junto con el período de maduración subsiguiente, determinan el potencial espermatogénico del testículo, con cada célula de Sertoli capaz de soportar un número finito de células germinales.

La regulación endocrina de la espermatogénesis se lleva a cabo a través de un lazo clásico de retroalimentación negativa (Figura 2), que implica interacciones entre el hipotálamo, la hipófisis y el testículo (eje hipotálamo-hipófisis-testicular). La producción de espermatozoides depende de la estimulación de las gonadotropinas hipofisarias, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH), que son secretadas en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropina hipotalámica (GnRH). LH estimula la síntesis de andrógenos por las células de Leydig del testículo, que actúa localmente para regular la producción de espermatozoides y

se alimenta de nuevo en el hipotálamo y la pituitaria para afectar la producción de GnRH y LH en un bucle autolimitado. La FSH estimula las células de Sertoli para secretar inhibina B que tiene un efecto de retroalimentación negativo en la pituitaria para limitar la síntesis de FSH (O'Donnell, et al.,2006).

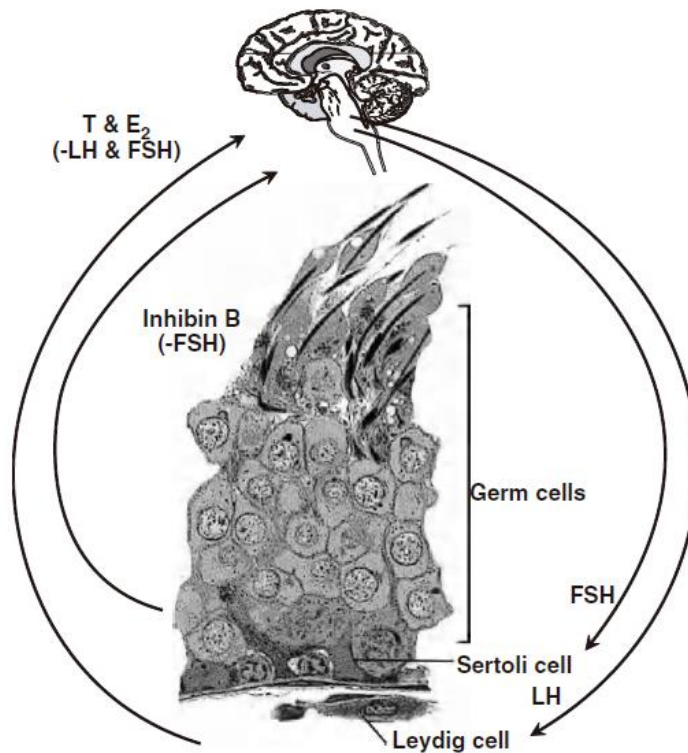


Figura 2. Retroalimentación negativa en el Control endocrino de la espermatogénesis. Tomado de O'Donnell, et al.,2006.

1.3 Inervación

En los mamíferos existen cuatro tipos de fibras en el sistema nervioso periférico: las fibras eferentes somáticas (motoras) y las fibras aferentes (sensoriales) que inervan el músculo estriado y la piel, y las fibras viscerales eferentes y aferentes que inervan los músculos lisos y las glándulas.

La función gonadal está gobernada por el eje hipotalámico-hipofisario y en menor medida por acciones locales autocrinas y paracrinas. Recientes estudios han

demostrado la existencia de una vía neural multisimpática entre el cerebro y las gónadas. Los nervios autónomos que inervan las gónadas juegan un papel fisiológico en el control hormonal del órgano reproductivo y ejercen una acción reguladora sobre el control vasomotor de los testículos, que están inervados por la fibra nerviosa eferente simpática y parasimpática, pertenecientes al sistema nervioso autónomo (SNA). Estos nervios también poseen fibras aferentes (viscerales sensoriales) que llevan la información hacia el sistema nervioso central (SNC). Además de los neurotransmisores clásicos del sistema nervioso autónomo como la noradrenalina, adrenalina y acetilcolina, las fibras nerviosas contienen varios otros neurotransmisores y neuropéptidos que incluyen serotonina, polipéptido intestinal vasoactivo, sustancia P, péptido relacionado con el gen de la calcitonina y galanina (Setchell, et al., 1994; Tsafiri y Adashi, 1994) (Gerendai, et al., 2005).

Los órganos del tracto reproductivo masculino reciben un suministro de nervios aferentes y eferentes viscerales, que se derivan de un grupo de ganglios cerca de la médula espinal, celiaca, aórtica, caudal mesentérica, hipogástrica y ganglios pélvicos. El escroto y el músculo externo cremáster también reciben una inervación somática (Hodson, 1970).

El nervio eferente del testículo se origina de las neuronas simpáticas del ganglio espermático y en menor medida de los ganglios paraaórticos contiguos que reciben entrada a través de la médula espinal toracolumbar. El nervio espermático superior (SSN) se yuxtapone a la arteria testicular y es la fuente primaria de fibras eferentes que inervan los testículos, la mayoría de los nervios en el testículo surgen del plexo pélvico (ganglio prostato-vesiculo-deferencial) y llegan al testículo con la arteria deferente. Las fibras nerviosas adrenérgicas y colinérgicas alimentan los testículos y otras partes del aparato reproductor masculino, incluyendo la arteria testicular, sus ramas superficiales y la túnica albugínea (Rauchenwald, et al., 1995).

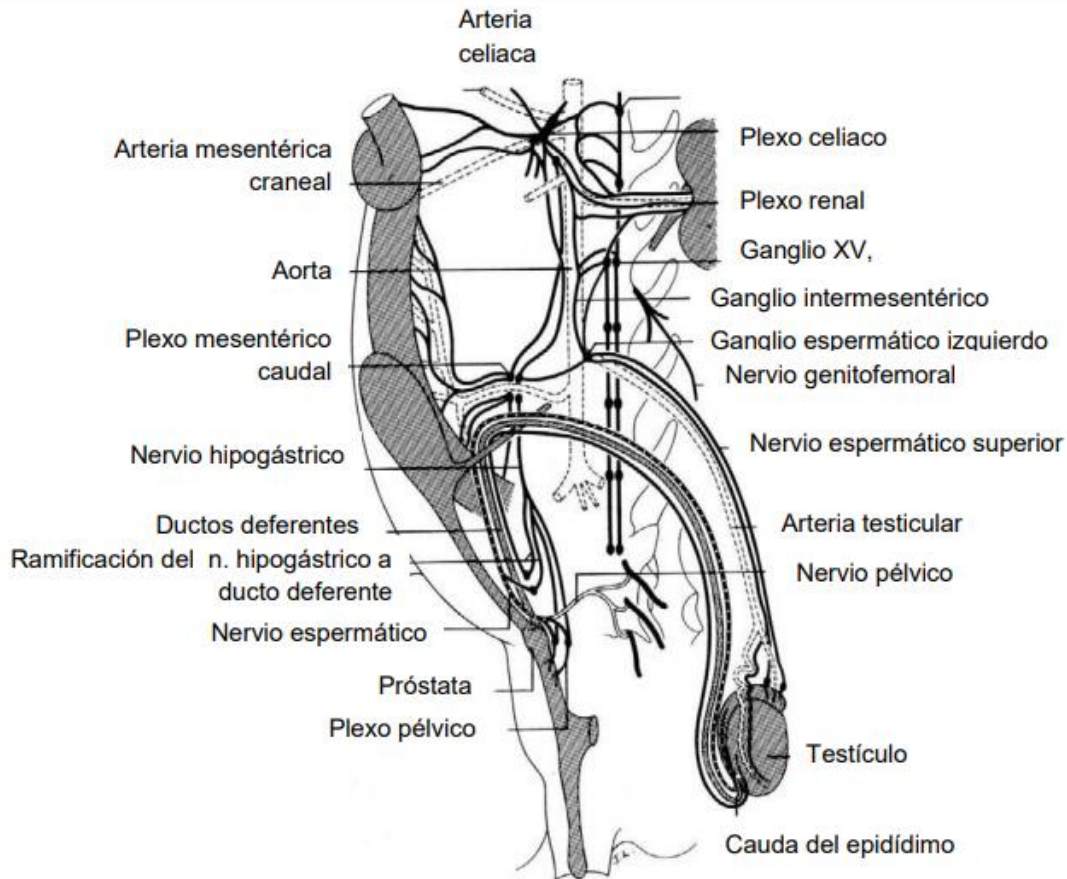


Figura 3. Esquema que muestra la inervación de los testículos y el epidídimo de mamífero (gato). Modificado de Setchell & Breed, 2006.)

El testículo es suministrado por los nervios espermáticos superiores e inferiores. El nervio espermático superior se deriva principalmente del ganglio mesentérico caudal con alguna contribución de los plexos celiaco y aórtico, y directamente de los nervios espláncnicos lumbares. El nervio espermático superior forma un plexo alrededor de la arteria testicular. Las fibras del nervio espermático superior entran en el testículo con los vasos sanguíneos a través del mesorquio. El nervio espermático inferior (ISN) deriva del plexo pélvico y puede contener fibras simpáticas y parasimpáticas. Se extiende a lo largo del conducto deferente hasta la cauda epidídica, desde donde los nervios alcanzan el testículo a través de la conexión ligamentosa entre la cola del epidídimo y la extremidad caudal del testículo (Figura 3). (Setchell y Breed, 2006)

1.4 Amígdala

La amígdala, una estructura en forma de almendra situada en cada lóbulo temporal, este complejo es un conjunto de núcleos situado en la región subcortical del lóbulo temporal del cerebro, en su parte anteromedial, profundo al uncus. Queda inmediatamente anterior a la formación hipocámpica y al extremo anterior de la asta temporal del ventrículo lateral. Es muy heterogéneo desde el punto de vista morfológico y no se considera una unidad funcional. Está recubierto de corteza rudimentaria y, posteriormente, se continúa con al uncus del giro parahipocámpico (Ledo-Varela, et al., 2007).

Al considerar las conexiones y funciones de "la amígdala", es importante diferenciar entre los diferentes núcleos amigdaloides. De hecho, existe controversia sobre si la amígdala debe considerarse una entidad en absoluto, en lugar de un conglomerado de áreas disímiles relacionadas con el aprendizaje, la motivación y el miedo (núcleo central y división basolateral) o a estímulos quimiosensoriales y comportamiento social (división corticomedia) (figura 4).

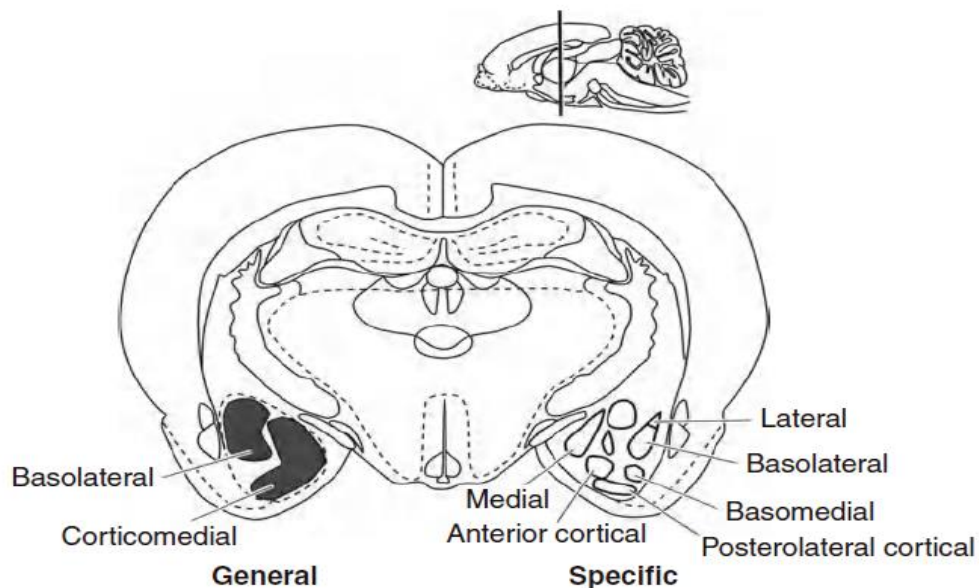


Figura 4. Estructura del complejo amigdalino. Tomado de Hull et al., 2005

Los estudios en roedores destacan la importancia de la amígdala corticomedial en la actividad sexual masculina. La amígdala corticomedial es un punto nodal clave para la integración de los estímulos quimiosensorial, somatosensorial y hormonal. En particular, la amígdala medial (Me), transmite estímulos quimiosensores desde los bulbos olfativos hasta los núcleos de la línea media del área preóptica y el hipotálamo. Durante el apareamiento, la amígdala recibe estímulos quimiosensoriales, somatosensoriales y hormonales a través de los bulbos olfatorios principales y accesorios, el núcleo faláceo subparascicular y los receptores de esteroides, respectivamente. Las señales quimiosensoriales son transmitidas por las proyecciones de las células mitrales y tufetas en los bulbos olfatorios a través del tracto olfatorio lateral, terminando en los núcleos amígdalos medial y cortical (anterior, posterolateral y posteromedial). En particular, las proyecciones eferentes del bulbo olfatorio accesorio apuntan a los núcleos medial y posteromedial, mientras que los bulbos olfatorios principales se proyectan ampliamente a los núcleos cortical anterior y posterolateral y a las áreas de procesamiento olfativo en el allocortex ventral. Las lesiones que interfieren con la transmisión de señales quimiosensibles interrumpen la actividad sexual masculina de acuerdo con los requerimientos quimiosensoriales específicos para apareamiento en esa especie. Además, la Me recibe señales somatosensoriales ascendentes del pene y la región perineal retransmitidas a través del núcleo subparafascicular. Sin embargo, las proyecciones del núcleo subparafascicular no se limitan a la amígdala: las señales somatosensoriales son transportadas directamente al área preóptica medial (MPOA). Los núcleos corticales medial y posteromedial también tienen receptores abundantes para andrógenos y estrógenos. La testosterona promueve la actividad sexual masculina, al menos en parte, a través de la unión a receptores de andrógenos (AR) amigdaloides o a receptores de estrógenos (ER) después de la aromatización local. Sin embargo, los receptores de esteroides no se limitan a la amígdala, sino que también se concentran en los núcleos de la línea media del área preóptica y el hipotálamo, incluyendo MPOA. Dentro del Me, ARs y ERs se localizan en el subnucleo posterior,

mientras que los eferentes olfatorios del bulbo terminan en el subnucleo anterior (Hull et al., 2006)

La amígdala está muy involucrada en la respuesta a las hormonas sexuales. La amígdala contiene receptores tanto para estrógenos como andrógenos y responde a fluctuaciones en los niveles hormonales mediante cambios en su morfología. La amígdala es mayor en varones adultos tanto en humanos como en muchos roedores y las hormonas parecen ser capaces de alterar muchas características de la amígdala, incluidas el número de neuronas y la expresión de sus neurotransmisores (Cahill et al., 2001).

1.5 Clembuterol

El clembuterol (Cib) es un potente β 2-adrenérgico-agonista-sintético. Utilizado como un broncodilatador pulmonar en animales domésticos y humanos, sin embargo, se utiliza actualmente como un anabólico, aumentando la masa corporal a través de un mecanismo de glucogenólisis, glicolisis, degrada la acumulación de grasa y nitrógeno para formar aminoácidos (Caicedo et al., 2011).

La administración de clembuterol a dosis promotoras del crecimiento podría causar efectos tóxicos agudos incluyendo temblores musculares, taquicardia, palpitations y nerviosismo (Ma y Zhu, 2010), e inducir cambios morfológicos, histológicos y bioquímicos en varios órganos de los animales expuestos (Odore, R., et al., 2007) incluyendo los testículos.

Pertenece al grupo de las fenetanolaminas, tiene un anillo aromático con un grupo hidroxilo en la Posición β del grupo alifático. La presencia del grupo nitrogenado y la sustitución de R por un grupo voluminoso, a menudo cíclico, no alifático, hace más específica a la molécula por los receptores β -adrenérgicos (Figura 5). Como todos los agonistas β adrenérgicos muestra importantes

diferencias en las actividades intrínseca (capacidad de un complejo fármaco-receptor de producir una respuesta funcional), ello se debe a las características de los grupos sustituyentes. Asimismo, las diferentes sustituciones propician distintas características farmacocinéticas; a su vez, las diferentes capacidades de distribución y permanencia en el organismo determinan la magnitud del efecto del agonista β adrenérgico y la persistencia de residuos en los tejidos, posee un halógeno en su estructura química el cual es el ion cloro, por ello, su efecto es mucho más prolongado que otros agonistas β 2-A y su excreción total también es más retardada (Martin 1971, Ruffolo, 1991, Waldeck y Widmark, 1995) (Valladares *et al.*, 2013; Zalco *et al.*, 1998).

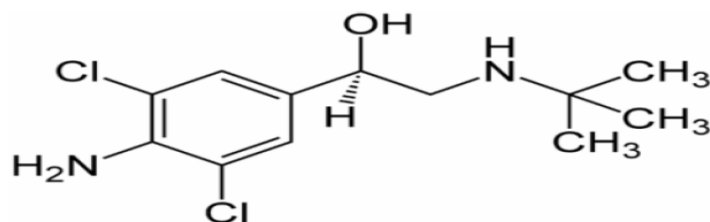


Figura 5. 4 Amino alfa T butilamino metil 3, 5 diclorobenzil alcohol. Tomado de Valladares *et al.*, 2013.

Los sitios de absorción y el efecto del clenbuterol están en relación con la ubicación de los β -adrenoreceptores. El clenbuterol trabaja de manera similar a la de los transmisores adrenérgicos adrenalina-noradrenalina con propiedades selectivas a los receptores β 2 estimulantes y con un mínimo efecto a los β 1 y α , actuando sobre los terminales posganglionares del sistema nervioso simpático (Soria y Arias, 1997; Mersmann, 2002).

El tiempo de absorción del clenbuterol depende de la vía de administración, por vía oral, la absorción alcanza los niveles máximos plasmáticos entre la 2da y 3er hora, sin embargo, por vía subcutánea o intramuscular, es aún más rápida, alcanzándose las máximas concentraciones dentro de los 15-30 minutos después de la aplicación (Morgan, 1990; Moore, *et al.*, 1994).

2. ANTECEDENTES

Es bien conocida la sensibilidad del epitelio seminífero a todo tipo de influencia adversa, y a una variedad de disturbios, físicos, químicos, endocrinos, patológicos, etc. Los efectos de estos disturbios y de su deterioro se reflejan en la pérdida del epitelio germinal lo que trae como consecuencia una disminución en la producción espermática. El método de determinación del Grado de Pérdida del Epitelio Germinal (GPEG) provee una de las mejores estimaciones de la función espermatogénica de los testículos (Urdaneta, et al., 1998). Según un estudio realizado en cerdos en 2002a por Blanco et al., se menciona que el clenbuterol ejerce un claro efecto sobre la estructura testicular, aumentando la población de células intersticiales y disminuyendo el epitelio de los túbulos seminíferos, así como un menor peso y volumen testicular.

Varios estudios han informado ampliamente los muchos efectos secundarios de los tratamientos con clenbuterol, Biolatti et al. en 1994 informo que la administración a largo plazo de clenbuterol causa alteraciones severas en los ovarios de cerdos hembra, así como trastornos hormonales ováricos. Groot et al. (1998) observo un desarrollo deteriorado de los testículos y un aumento en el estroma testicular en terneros. Otro estudio señala que la administración de clenbuterol, a dosis anabolizante, causa una alteración de la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal-gonadal-hepático y tiene un marcado efecto en la producción y maduración de los espermatozoides a nivel de los túbulos seminíferos, que contribuye al deterioro de la capacidad reproductiva en bovinos (Paz-Calderón et al., 2011).

En 2001 Toyama et al., encontraron que el β -estradiol 3-benzoate (un estrógeno sintético) administrado en ratones produce cambios morfológicos en los testículos, así como desprendimiento de células espermatogénicas del epitelio seminífero y la aparición de células germinales apoptóticas que afectan a la espermiogénesis y finalmente provoca espermatozoides anormales.

Varias líneas de evidencia han apoyado el papel de las catecolaminas periféricas en el control de la función gonadal masculina, inhiben la secreción de insulina, aumentan el glucagón y estimulan la liberación de hormona adrenocorticotropa (ACTH), somatotropa (STH) y gonadotropinas como: FSH y LH (Beermann et al., 1987). Se ha demostrado que los receptores adrenérgicos $\beta 1$ y $\beta 2$ tienen una alta expresión en los testículos. Los receptores adrenérgicos $\beta 1$ se han encontrado sobre todo en células de Sertoli mientras que los receptores $\beta 2$ -adrenérgicos se han correlacionado con el papel esencial posiblemente desempeñado por las catecolaminas en la producción de testosterona de las células de Leydig (Anakwe, 1984; Heindel, et al., 1981). Resultados estereológicos y morfométricos en cerdos adultos alimentados con clenbuterol, sugieren que tiene un efecto estimulante en la síntesis y producción de testosterona, se observó un aumento en la fracción volumétrica nuclear y la densidad superficial nuclear dando como resultado una hiperplasia prominente de las células de Leydig de las células intersticiales (Blanco, et al., 2001).

Un estudio en ovejas adultas ovariectomizadas inmunizadas contra GnRH, la secreción pulsátil de LH se suprimió completamente, mientras que la secreción de FSH se redujo parcialmente. La administración posterior de un análogo de GnRH restauró los pulsos de LH, pero no las concentraciones de FSH, y dependiendo de la frecuencia de estimulación aumentó la concentración de FSH, lo cual reafirma el concepto de la regulación diferencial de la LH y FSH basada en la frecuencia de estimulación (Recabarren et. al., 2006).

También se sabe por medio de los trabajos de Singh y Handelsman en 1996 que en ratones hipogonádicos deficientes de gonadotropinas, la administración de FSH por si sola en ausencia de testosterona puede estimular la producción de células germinales inmaduras casi a niveles normales e inclusive aumentar el tamaño tubular seminífero.

3. JUSTIFICACIÓN

Esta ampliamente documentado los efectos adversos que ejercen los Agonistas Beta Adrenérgicos como el clenbuterol, tanto en humanos como en mamíferos, en especial en especies domesticas usadas para la producción de carne. Sin embargo, no se ha estudiado mucho el efecto que ejerce esta sustancia en los túbulos seminíferos y que impacto tiene sobre el desarrollo espermático y la producción de gonadotropinas implicadas en el correcto funcionamiento de la espermatogénesis.

Es importante comprender el papel que juegan los agonistas beta 2 adrenérgicos sobre el eje hipotálamo-hipofisario para así poder dilucidar una probable solución a los efectos adversos que estos generan sobre el desarrollo testicular y espermático.

Esto se puede lograr mediante estudios donde se examinen los procesos reproductivos implicados en la producción espermática, maduración de gametos, motilidad espermática, vitalidad espermática, producción hormonal y desarrollo histológico de los órganos reproductivos.

4. HIPÓTESIS

La administración de clenbuterol en ratones macho de laboratorio provoca un desarrollo diferencial del epitelio germinal en los túbulos seminíferos de testículos respecto a ratones macho a los que no se les administro clenbuterol.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Analizar el papel que juega el clembuterol sobre la espermatogénesis de ratones de laboratorio.

5.2 Objetivos particulares

Evaluar la motilidad progresiva rápida, progresiva lenta, in situ e inmóvil de los espermatozoides en ratones de laboratorio sacrificados 90 días después de iniciada la administración de clembuterol.

Cuantificar el número total de espermatozoides de ratones adultos de laboratorio sacrificados 90 días después de iniciada la administración de clembuterol.

Analizar la viabilidad de los espermatozoides en ratones de laboratorio sacrificados 90 días después de iniciado el experimento y que fueron tratados con clembuterol.

Realizar análisis morfométrico de los túbulos seminíferos (área de epitelio germinal) en ratones de laboratorio sacrificados 90 días después de iniciado el experimento y que fueron tratados con clembuterol.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo el estudio se utilizaron ratones de la cepa CD-1 de juveniles de 3 semanas de edad al inicio del tratamiento, estos fueron proporcionados por el Bioterio Claude Bernard de la BUAP, los ratones fueron almacenados en un sitio con las características optimas que se requieren para la experimentación en animales, con un ciclo de 12 hrs de luz y 12 hrs de oscuridad.

Se manejaron tres grupos (Control, Hígado e Hígado + Clb) con 12 ratones macho de la cepa CD-1 de 21 días de edad cada uno. Al grupo Control se le alimentó únicamente con alimento Harlan 2018s para ratones; al grupo Hígado se le administró una mezcla 2:1 de Harlan 2018s e hígado de res libre de clenbuterol y el grupo Hígado + Clb fue alimentado con una mezcla 2:1 de alimento Harlan 2018s e hígado de res de animales tratados con clenbuterol. Los ratones tuvieron libre acceso al agua y alimento. Las concentraciones de clenbuterol en los hígados de res utilizados son desconocidas pero sabemos que la FAO/OMS a través de estudios realizados sobre el índice de ingesta diaria admisible (IDA) recomendó como límites máximos de residuos (LMR) para tejidos del ganado bovino y equino las siguientes concentraciones: 0.2 ng/ml en músculo y grasa, 0.6 µg/kg en hígado y riñones, aunque en muchos casos las concentraciones exceden los límites permitidos (Fernández et al., 2012) por ejemplo rastros municipales del estado de Puebla, con una concentración promedio de 16.6 ng/ml, mientras que, para el siguiente año seis de siete rastros muestreados de Puebla, presentaron concentraciones superiores a 40 ng/ml en tejidos como retina y orina de animales (Moreno, 2011).

6.1 Obtención de muestras

Transcurridos 90 días de vida todos ratones fueron llevados al laboratorio de Histofisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la BUAP, ahí se seleccionaron 4 ratones de cada uno de los tres tratamientos para el estudio morfométrico de los túbulos seminíferos, los 8 ratones restantes se usaron para el

análisis espermático. Los animales se pesaron y sacrificaron por decapitación. Una vez sacrificados se disecaron los testículos derecho e izquierdo de cada animal. Los órganos fueron pesados en balanza analítica (Explorer Pro, Ep64C) y fijados en Bouin para tratamiento histológico.

6.2 Análisis microscópico de los espermatozoides

Comprende la valoración de la motilidad, vitalidad y concentración espermática. Se procedió a obtener los espermatozoides de la cola del epidídimo y del conducto deferente, mediante una perfusión con 3 ml de solución TALP (preparación modificada del Live/Dead® Sperm Viability Kit). Se evaluó la motilidad del espermatozoide en progresiva rápida, lenta, *in situ* e inmóvil en una preparación con 20 µl de la muestra que se observó en un microscopio óptico (Zeiss, Primo Star) a 10x, se contabilizó un aproximado de 200 células por epidídimo (izquierdo y derecho) para obtener los porcentajes de cada una de las muestras. Se determinó la viabilidad espermática (número de espermatozoides vivos, expresado en porcentaje) por medio de una tinción fluorescente de una mezcla de diacetato de fluoresceína más ioduro de propidio y se observaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon, Eclipse E400) utilizando el objetivo de 20x. Para determinar la viabilidad se contó el número de espermatozoides con fluorescencia verde (células vivas) y fluorescencia roja (células muertas) a partir del conteo de 200 células observadas en el campo. Posteriormente con una cámara de Neubauer se calculó el número total de espermatozoides en un microscopio óptico (Zeiss, Primo Star) a 40x.

6.3 Análisis histológico

Una vez sacrificados los animales de cada grupo se fijaron los testículos en solución Bouin. Transcurridas 12 horas en solución Bouin cada testículo se cortó por la mitad y se dejó 12 horas en el fijador. Pasadas las 12 horas se realizó un cambio de Bouin por alcohol al 70%, con respectivos lavados sucesivos de alcohol

70% hasta disminuir el color amarillo que deja el Bouin al órgano, para posteriormente realizar los siguientes cambios crecientes de alcohol y cloroformo:

- 3 horas de Alcohol 96%
- 3 horas de Alcohol 70%
- 24 horas de Cloroformo
- 2 horas de Cloroformo

Deshidratado el tejido se procedió a la inclusión en parafina durante 3 horas. Listos los cubos de parafina se realizaron cortes de 10 μm en micrótopo manual (modelo: Erma Tokyo). Se utilizó la técnica de tinción Hematoxilina-Eosina (H-E) por lo que se procedió a desparafinar los cortes en una cámara de formol durante 24 horas para después pasarlos al tren de tinción H-E de la siguiente manera:

- 1.5 minutos Xilol
- 1.5 minutos Xilol
- 1.5 minutos Alcohol 100%
- 1.5 minutos Alcohol 96%
- 1.5 minutos Agua destilada
- 1.5 minutos Hemaoxilina de Meyer
- 5 minutos agua
- 5 minutos agua
- 5 minutos agua
- 15 segundos Eosina
- 1.5 minutos Alcohol 96%
- 1.5 minutos Alcohol 100%
- 1.5 minutos Carbol-Xilol
- 1.5 minutos Xilol

Terminado el proceso los cortes histológicos fueron cubiertos con resina sintética para su análisis por microscopía. El análisis morfométrico se hizo en un

microscopio óptico (Zeiss) equipado con un sistema de captura de imágenes y el software Motic versión 9.1.

6.4 Análisis morfométrico de Túbulos Seminíferos

Una vez teñidos y montados los cortes, se eligieron 4 individuos de cada grupo (Control, Hígado e Hígado + Clb), cada uno con sus respectivas laminillas de testículo izquierdo y derecho. Se seleccionaron de 30 a 50 cortes de cada testículo. El procedimiento para el análisis morfométrico se realizó de la siguiente manera:

- Solo se utilizaron cortes de testículos completos de la parte media del testículo.
- De cada corte seleccionado se tomó una fotografía mediante el microscopio óptico con un analizador de imagen conectado a una computadora.
- Cada corte de testículo se dividió en 4 hemisferios, se tomó una foto de cada hemisferio, alternando los cortes para evitar repetir túbulos, quedando de la siguiente manera:
 - Hemisferio superior izquierdo, corte 1; hemisferio superior derecho, corte 3; hemisferio inferior izquierdo, corte 5; hemisferio inferior derecho, corte 7; se repite el mismo procedimiento, hasta lograr las microfotografías necesarias para el análisis.
- Cada microfotografía presentaba de 5 a 10 túbulos seminíferos, solo se utilizaron aquellos que estaban completos dentro de la fotografía.
- Se midió el Área Tubular (AT) del túbulo seminífero y el Área del Lumen (AL) del túbulo de 100 túbulos seminíferos del testículo izquierdo y 100 túbulos seminíferos del testículo derecho de todos los individuos de cada grupo (Control, Hígado e Hígado + Clb), mediante el programa Motic, dibujando un círculo a mano alzada para cada parámetro; para determinar el Área del Epitelio germinal (AE) de cada túbulo seminífero se restó el Área del Lumen al Área Tubular del túbulo seminífero (Figura 6).

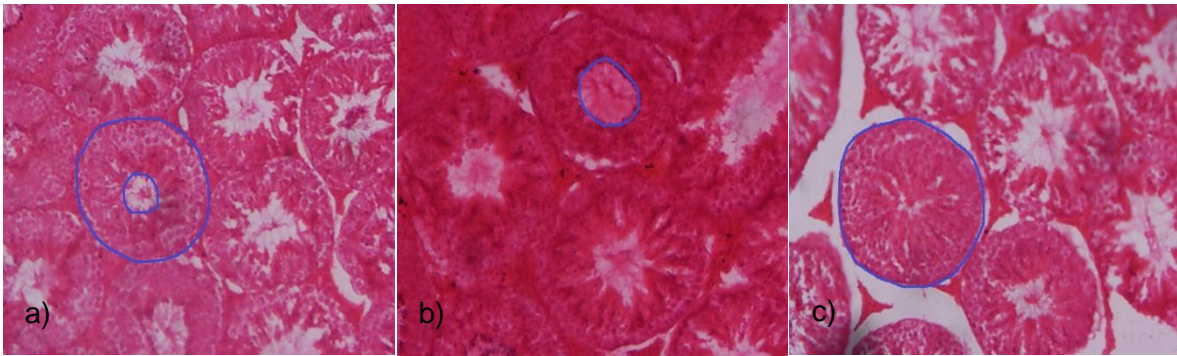


Figura 6. Fotografía de túbulos seminíferos: a) Túbulo seminífero donde el círculo grande representa el Área Tubular y el círculo pequeño el Área del Lumen. b) Área del Lumen en μm^2 . c) Área Tubular en μm^2 .

6.5 Análisis estadístico

Los datos sobre el número total de espermatozoides fueron analizados mediante la prueba Kruskal-Wallis, seguida de una “U” de Mann-Whitney. El análisis morfométrico de los túbulos seminíferos se realizó a través del analizador de imágenes Motic Images versión 9.1, a los datos se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba post hoc de Tukey, con el paquete estadístico IBM® SPSS® Versión 23. Se aceptaron aquellas diferencias en las que la probabilidad fue de ≤ 0.05 .

7. RESULTADOS

7.1 Análisis espermático

Nuestros resultados mostraron que en los ratones la ingesta de Hígado no modificó significativamente el número total de espermatozoides en comparación al grupo Control. Sin embargo, el grupo alimentado con Hígado + Clb provocó una disminución significativa en el número total de espermatozoides en comparación a los dos grupos anteriormente mencionados (Figura 7). No se observaron diferencias en la viabilidad de los espermatozoides (datos no presentados).

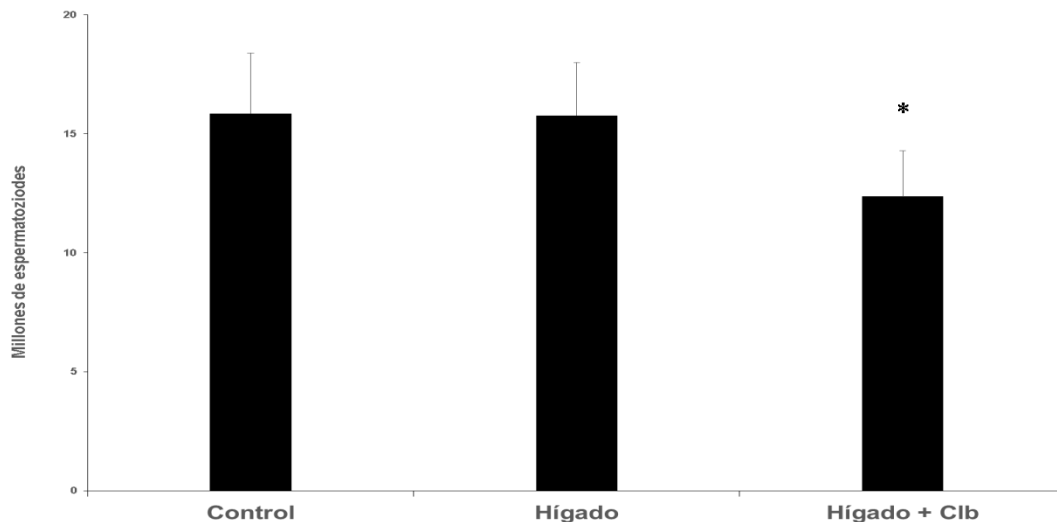


Figura 7. Media \pm e.e.m. de la cantidad total de espermatozoides de ratones Control o con ingesta de hígado de res tratada con o sin clenbuterol. (* $P \leq 0.05$; Prueba U de Mann-Whitney).

Cuando se comparó y analizó el número de espermatozoides, los ratones alimentados con Hígado + Clb tienen una disminución significativa de espermatozoides en el testículo derecho. También, es posible observar que la disminución en el número de espermatozoides en el grupo de Hígado + Clb es en ambos testículos, siendo aún más evidente en el testículo derecho en comparación al testículo derecho del grupo Hígado (Figura 8).

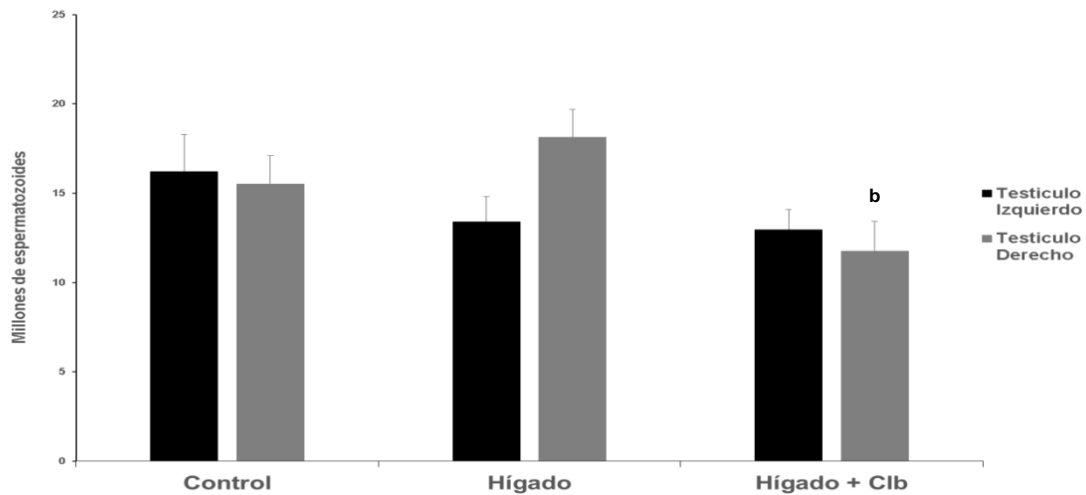


Figura 8. Media \pm e.e.m. de la cantidad total de espermatozoides izquierdo y derecho de ratones Control o con ingesta de hígado de res tratada con o sin clenbuterol. (a $P \leq 0.05$; vs testículo izquierdo del mismo tratamiento. b $P \leq 0.05$; vs grupo Hígado del testículo derecho. Prueba U de Mann-Whitney.)

Los datos obtenidos en el estudio indican que en la motilidad progresiva rápida los ratones que fueron tratados con Hígado + Clb tuvieron un incremento significativo en proporción a los otros 2 tratamientos, los espermatozoides inmóviles presentaron una disminución significativa en el grupo Hígado + Clb con respecto al grupo Control e Hígado, mientras tanto en motilidad progresiva lenta e *in situ* no se pudo observar diferencias significativas en ninguno de los grupos tal como observamos en la figura 9 y la tabla 1.

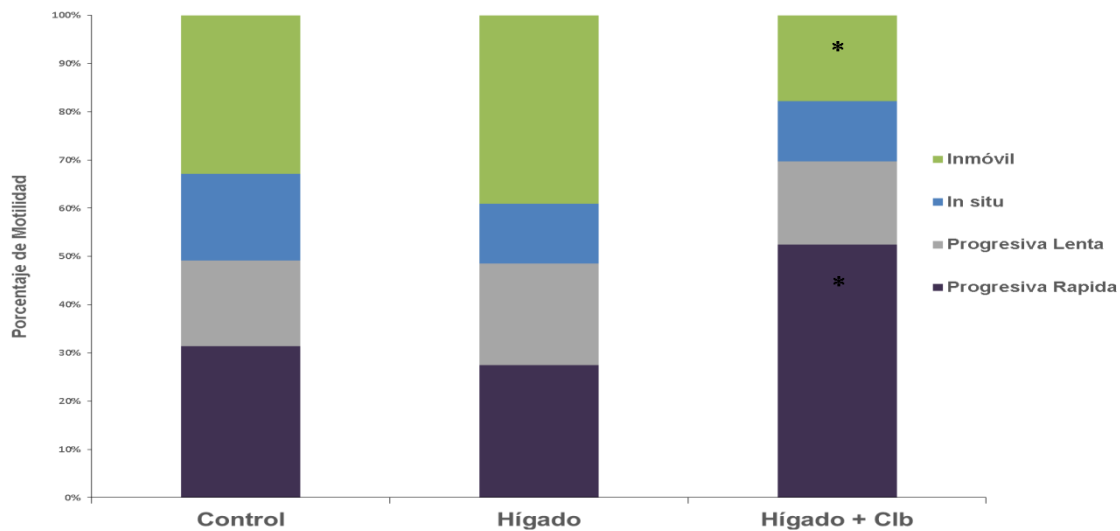


Figura 9. Media \pm e.e.m. del porcentaje de motilidad en espermatozoides de ratones Control o con ingesta de hígado de res tratada con o sin clenbuterol. (* $P \leq 0.05$; Prueba U de Mann-Whitney).

En la comparación de testículo izquierdo y derecho de cada grupo se evaluó el tipo de motilidad espermática (progresiva rápida, progresiva lenta, *in situ* e inmóvil) dentro de un mismo grupo experimental, solo se encontró que hay un incremento significativo de espermatozoides inmóviles del testículo derecho con respecto al testículo izquierdo en el grupo experimental Hígado + Clb. No se encontró ninguna otra diferencia significativa. (Figura 10 y Tabla1).

En la figura 10 también podemos ver que en el testículo izquierdo el porcentaje de motilidad progresiva rápida del grupo Hígado + Clb tiene un incremento significativo en comparación a los otros dos grupos experimentales, lo mismo paso en el testículo derecho. Mientras tanto los espermatozoides inmóviles del testículo izquierdo tuvieron una disminución significativa en el grupo Hígado + Clb en comparación a los demás grupos.

En los parámetros de motilidad progresiva lenta e *in situ* tanto en el testículo derecho como en el izquierdo no se observó ninguna diferencia en ningún grupo experimental.

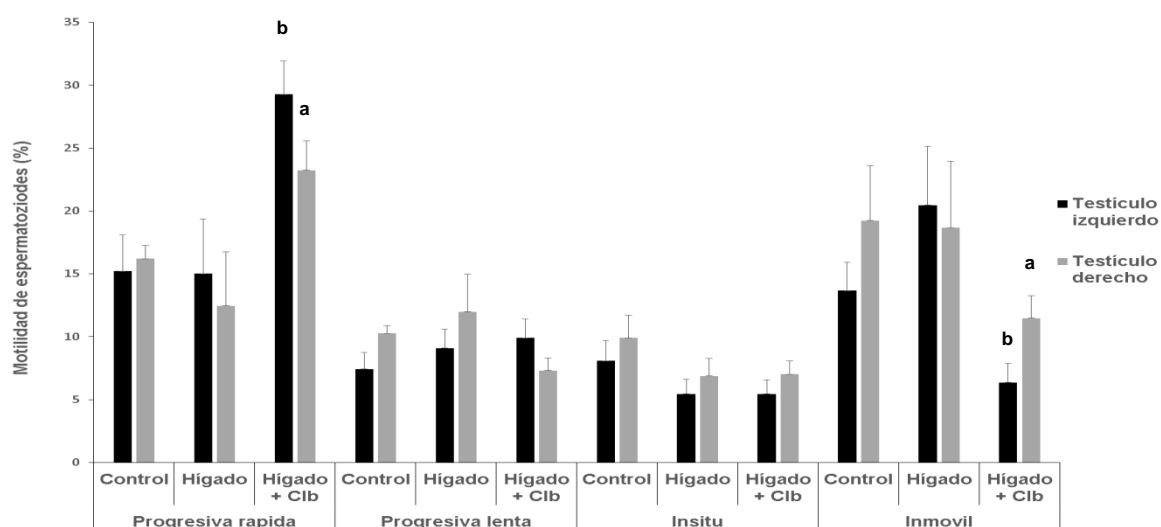


Figura 10. Media \pm e.e.m. de la cantidad total de espermatozoides izquierdo y derecho de ratones Control o con ingesta de hígado de res tratada con o sin clenbuterol. (a $P \leq 0.05$ vs testículo izquierdo del mismo tratamiento; b $P \leq 0.05$ mismo testículo vs mismo testículo de otros tratamientos. Prueba U de Mann-Whitney.)

Motilidad total

		X̄	e.e.m
Progresiva Rápida	Control	31.41%	± 5.23
	Hígado	27.48%	± 5.44
	Hígado + Clb *	52.50%	± 9.78
Progresiva Lenta	Control	17.71%	± 1.01
	Hígado	21.07%	± 1.46
	Hígado + Clb	17.20%	± 2.83
In situ	Control	17.97%	± 3.28
	Hígado	12.32%	± 2
	Hígado + Clb	12.47%	± 8.23
Inmóvil	Control	32.89%	± 2.25
	Hígado	39.12%	± 2.1
	Hígado + Clb *	17.82%	± 3.01

Tabla 1. Media ± e.e.m. del porcentaje de espermatozoides. Donde se observa motilidad progresiva rápida, progresiva lenta, *in situ* e inmóvil, de ratones Control o con ingesta de hígado de res tratada con o sin clembuterol.

7.2 Análisis morfométrico de los túbulos seminíferos

Nuestros datos revelaron que en ratones la ingesta de hígado con clembuterol disminuye significativamente el Área Epitelial total de los túbulos seminíferos con respecto a los ratones del grupo Control e Hígado (Figura 11).

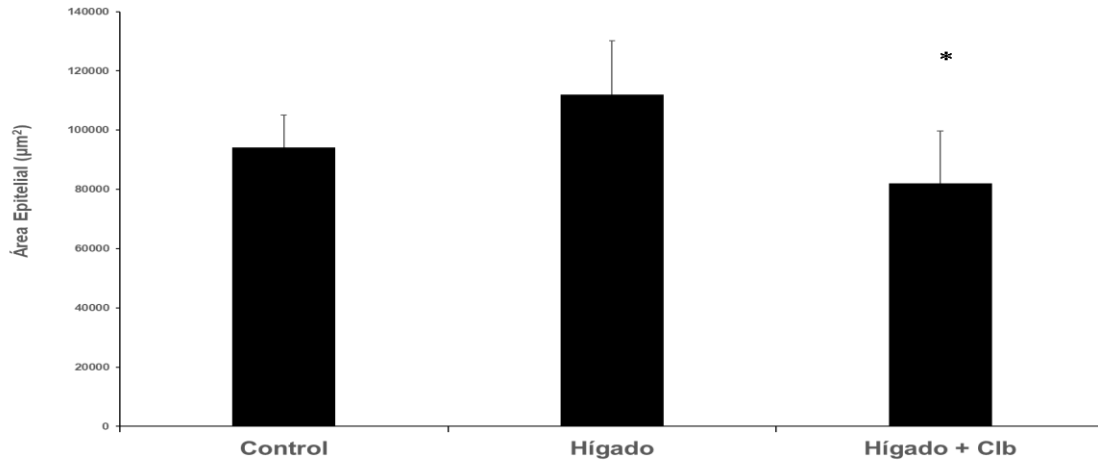


Figura 11. Media ± e.e.m. del Área Epitelial de los túbulos seminíferos de ratones Control o con ingesta de hígado de res tratada con o sin clembuterol. (*P≤0.05; Prueba de ANOVA).

Cuando se comparó el testículo derecho y el izquierdo dentro de cada grupo experimental solo el grupo Hígado + Clb tiene una disminución significativa en el testículo derecho con respecto al izquierdo. En el estudio del testículo derecho de

los ratones, se encontró que en el grupo Hígado + Clb es significativamente menor, mientras que en el testículo izquierdo ningún grupo presenta diferencias significativas (Figura 12).

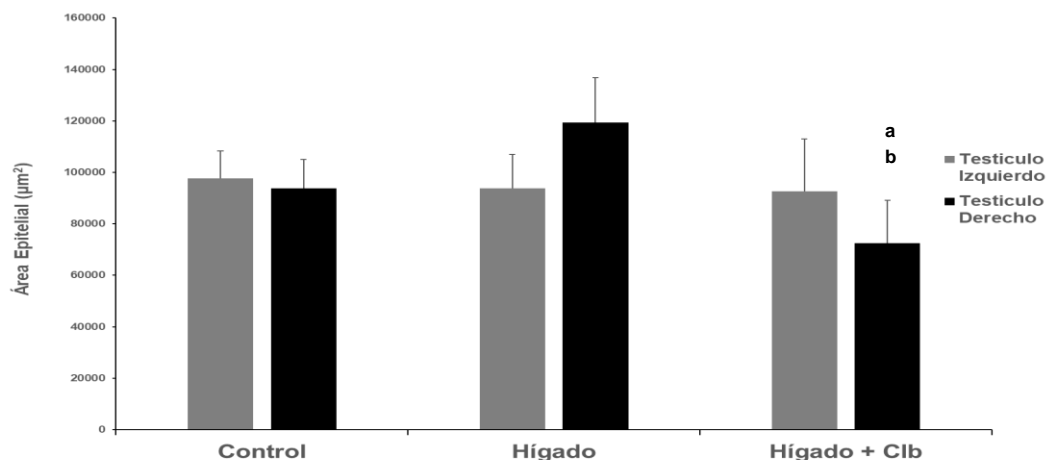


Figura 12. Media \pm e.e.m. del Área del Lumen de los túbulos seminíferos izquierdo y derecho de ratones Control o con ingesta de hígado de res tratada con o sin clenbuterol. (a $P \leq 0.05$ vs testículo izquierdo del mismo tratamiento; b $P \leq 0.05$ mismo testículo vs mismo testículo de otros tratamientos. Prueba de ANOVA).

Se evaluó el área tubular total de los túbulos seminíferos de cada grupo de ratones, los cortes histológicos mostraron que el alimento de hígado de res con clenbuterol provocó una disminución significativa, como podemos observar en la figura 13.

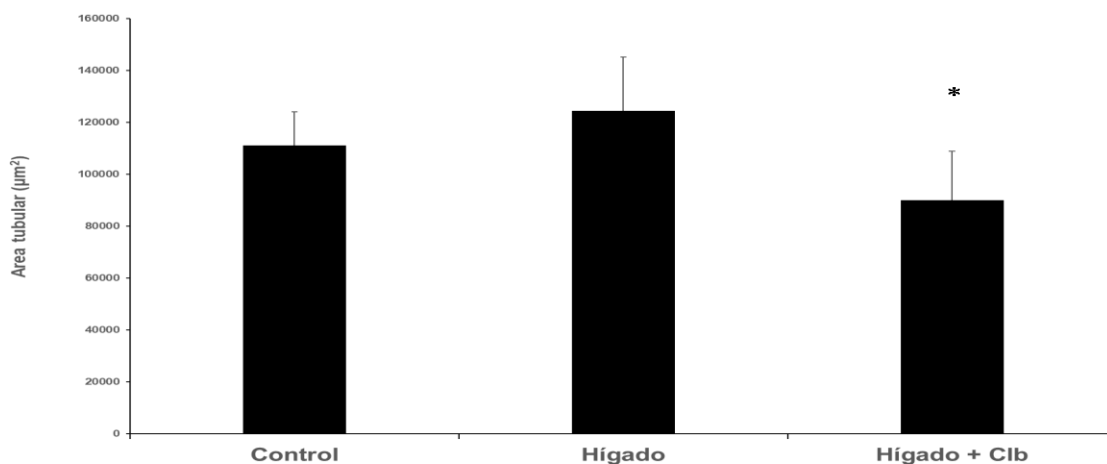


Figura 13. Media \pm e.e.m. del Área Tubular de los túbulos seminíferos de ratones Control o con ingesta de hígado de res tratada con o sin clenbuterol. (* $P \leq 0.05$; Prueba de ANOVA).

En la comparación del testículo izquierdo y derecho del Área Tubular dentro de cada uno de los grupos experimentales muestra que existen diferencias entre testículos en el grupo tratado con Hígado.

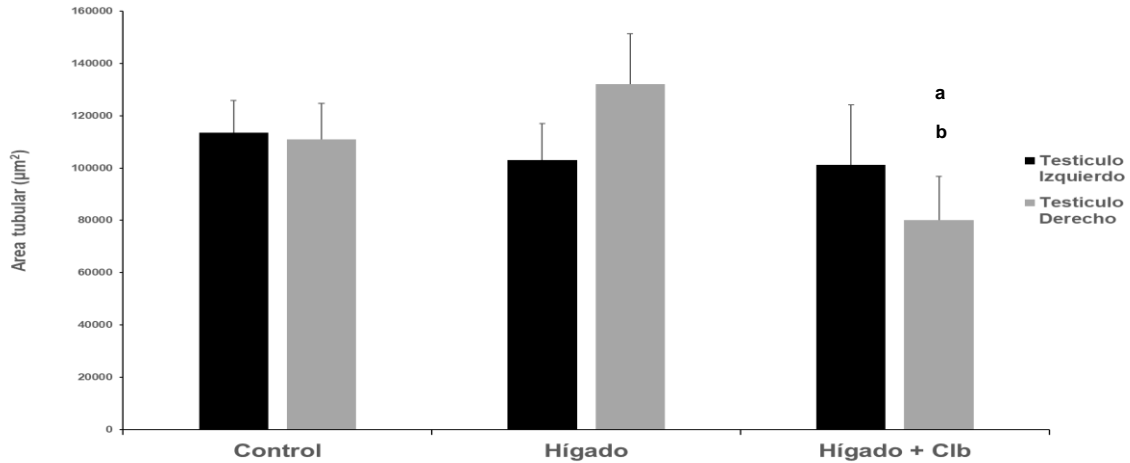


Figura 14. Media \pm e.e.m. del Área Tubular de los túbulos seminíferos izquierdo y derecho de ratones Control o con ingesta de hígado de res tratada con o sin clenbuterol. (a $P \leq 0.05$ vs testículo izquierdo del mismo tratamiento; b $P \leq 0.05$ mismo testículo vs mismo testículo de otros tratamientos. Prueba de ANOVA).

Las micrografías de la Figura 15, muestran los cortes histológicos del área epitelial, vistas en microscopio, donde los asteriscos indican el área luminal del epitelio germinativo.

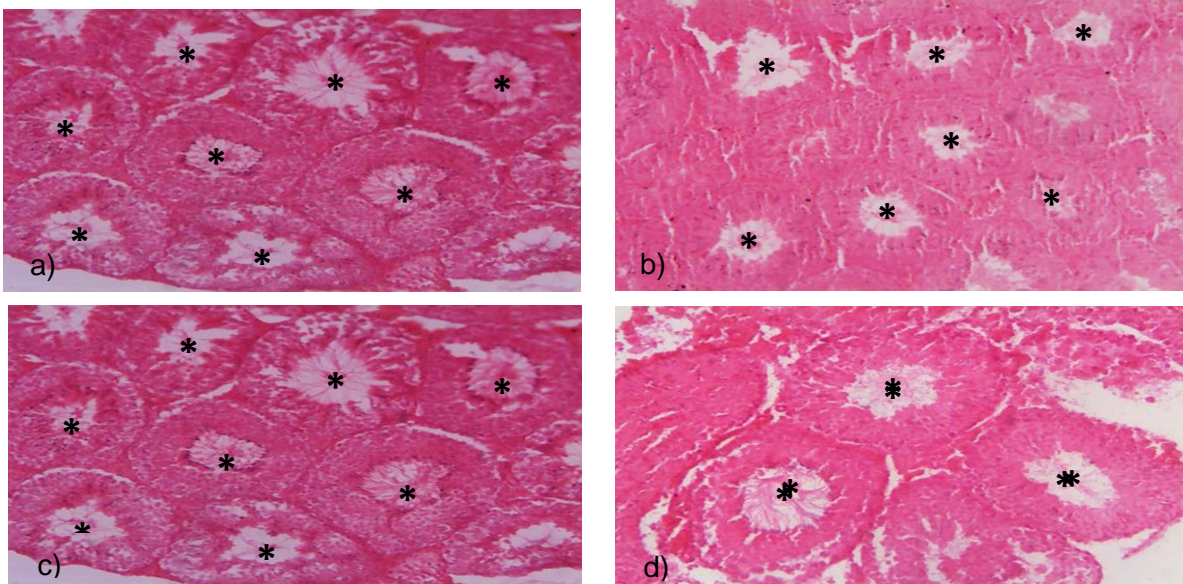


Figura 15. Micrografía de túbulos seminíferos, donde el Área Luminal está marcada con un asterisco: a) Tratamiento Control. b) tratamiento Hígado + Clb c) tratamiento Control d) tratamiento Hígado

El lumen de los túbulos seminíferos muestra que los ratones del grupo Control tienen un espacio luminal mayor a los otros grupos experimentales. El análisis morfométrico del área del lumen total de los túbulos seminíferos da como resultado que el grupo de Hígado + Clb tiene una disminución significativa (Figura 16).

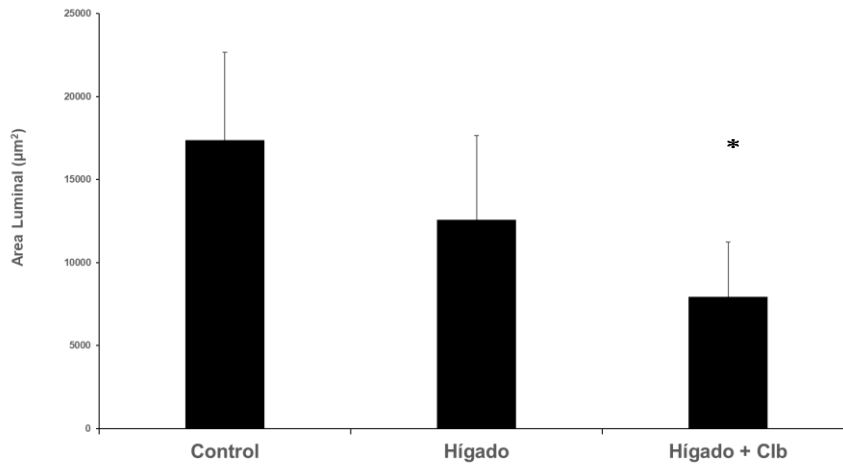


Figura 16. Media \pm e.e.m. del Área del Lumen de los túbulos seminíferos de ratones Control o con ingesta de hígado de res tratada con o sin clenbuterol. (* $P \leq 0.05$ vs Control. Prueba de ANOVA).

Los testículos izquierdo y derecho de los ratones dentro de cada grupo experimental como se muestra en la figura 17, no fueron diferentes entre sí en lo que respecta al Área Luminal de los túbulos seminíferos, pero cuando se compararon los grupos de un mismo testículo se encontró que en el testículo izquierdo los ratones tratados con Hígado + Clb tuvieron una disminución significativa, del mismo modo en el testículo derecho los ratones alimentados con Hígado + Clb tuvieron una disminución significativa.

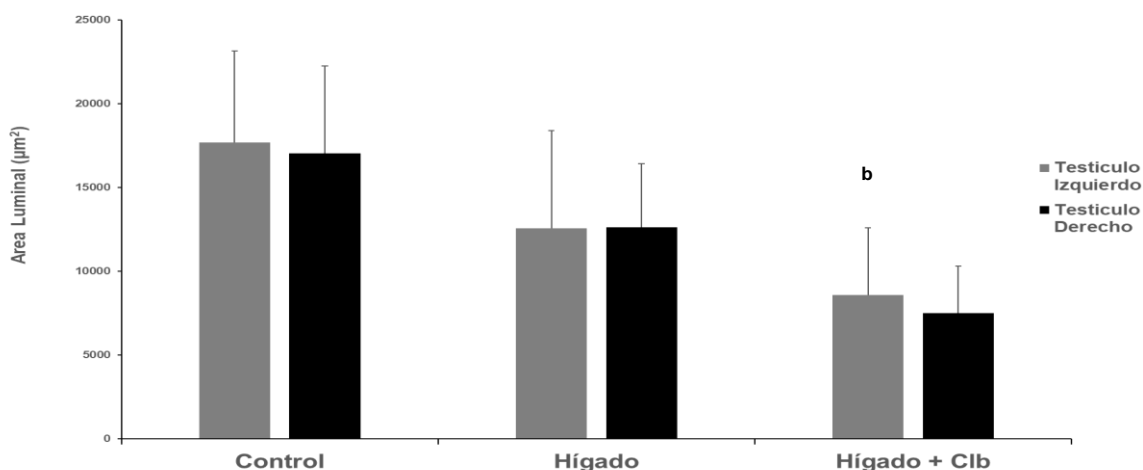


Figura 17. Media \pm e.e.m. del Área del Lumen de los túbulos seminíferos izquierdo y derecho de ratones Control o con ingesta de hígado de res tratada con o sin clenbuterol. (a $P \leq 0.05$ vs testículo izquierdo del mismo tratamiento; b $P \leq 0.05$ mismo testículo vs mismo testículo de otros tratamientos. Prueba de ANOVA).

En la tabla 2 observamos que los individuos alimentados con clenbuterol tuvieron un área significativamente menor que los otros tratamientos, en todos los parámetros morfométricos de los túbulos seminíferos (Área Epitelial, Área Luminal y Área Tubular).

Área de los tubulos seminíferos

	Tratamiento	\bar{X}	e.e.m
Área Epitelial	Control	94098.54 μm^2	± 10979.27
	Hígado	111988.97 μm^2	± 18193.64
	Hígado + Clb	^a 82065.46 μm^2	± 17675.98
Área del Lumen	Control	17357.98 μm^2	± 5302.89
	Hígado	12583.82 μm^2	± 5083.19
	Hígado + Clb	^{a b} 7923.83 μm^2	± 3318.84
Área total	Control	111197.7159 μm^2	± 12832.59
	Hígado	124572.8043 μm^2	± 20746.7
	Hígado + Clb	^a 89989.2966 μm^2	± 19010.73

Tabla 2. Media \pm e.e.m. del área del túbulo seminífero, donde se observa Área Epitelial, Área del Lumen y Área Tubular del túbulo seminífero de ratones Control o con ingesta de hígado de res tratada con o sin clenbuterol. (a $P \leq 0.05$ vs Grupo Hígado; b $P \leq 0.05$ vs Grupo Control. Prueba ANOVA).

8. DISCUSIÓN

El proceso de producción y maduración de espermatozoides depende de muchos factores para su correcto funcionamiento, como lo mencionamos anteriormente la espermatogénesis es susceptible a todo tipo de disturbios e influencias adversas ya sean físicos, químicos, endocrinos, patológicos, etc. (Urdaneta, et al., en 1998).

Nuestros resultados muestran que ratones alimentados con hígado de bovinos tratados con clenbuterol (Cib) reducen la producción de espermatozoides de manera significativa, esto es consistente con trabajos anteriores donde refieren que este agonista β_2 adrenérgico ejerce efectos negativos sobre la espermatogénesis en mamíferos (Jing y ZHU, 2015). Esta disminución en la cantidad de espermatozoides puede deberse a que inicialmente el consumo del hígado con clenbuterol provocó un incremento de la síntesis de testosterona dado su afinidad por los receptores beta-adrenérgicos y con el tiempo se provocó una desensibilización en el eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-testículos resultando en un decremento en la secreción de testosterona y por ende una disminución en la espermatogénesis. En apoyo a lo anterior, se sabe que en terneras hembras la administración prolongada de clenbuterol provoca una disminución significativa del número de receptores β adrenérgicos (β -AR) en el corazón, los bronquios y el sistema nervioso central. Esta disminución se entiende como una desensibilización del sistema adrenérgico e implica una falla en los componentes β -AR, por consiguiente, genera una reducción en la tasa de síntesis de AMP cíclico (AMPc) (Re et al., 1995; Re et al., 1997; Harden, 1983). Los mecanismos para explicar este fenómeno son el desacoplamiento funcional del receptor, el secuestro físico del receptor lejos de la superficie celular (internalización) y/o la regulación negativa del número total de receptores (Liggett, 2002; Badino et al., 2005). Las células de Leydig presentan una importante cantidad de receptores beta-adrenérgicos que están involucrados en la síntesis de testosterona (Moger y Murphy, 1983; Anakwe y Moger, 1984; Poyet y Labrie, 1987).

En un estudio en ratas macho adultas la administración diaria de clenbuterol durante 14 días provocó una disminución en la expresión del gen ARN mensajero de la Respuesta Aguda Esteroidogénica (mRNA StAR) en células de Leydig (Ma y Zhu, 2010; Jing y Zhu, 2015). Como complemento de lo dicho anteriormente, un estudio realizado por Bosmann et al. (1996) concluyó que la disminución de mRNA StAR está directamente correlacionada a una baja en la síntesis de testosterona en las células de Leydig.

La disminución en el conteo espermático probablemente por una disminución en la secreción de testosterona coincide con una menor agresividad que hemos reportado previamente (Cordero et al., 2017) utilizando el mismo modelo experimental, la ingesta de hígado con Clenbuterol en ratones macho disminuye la agresividad evaluada mediante la prueba de intruso vs residente. Esto apoya la idea de que el consumo de hígado con clenbuterol provoca una disminución significativa en las concentraciones séricas de testosterona.

El aumento del número de espermatozoides con motilidad progresiva rápida de animales alimentados con hígado con clenbuterol puede estar asociado a cambios en el epidídimo, órgano en el cuál el espermatozoide adquiere la motilidad y que se sabe que presenta una rica inervación simpática. En apoyo a lo anterior, se ha mostrado que en la rata adulta la simpatectomía quirúrgica del epidídimo provoca una acumulación significativa de espermatozoides en la cola del epidídimo (Ricker *et al.*, 1996). El uso de inhibidores para la recaptura de monoaminas permite brindar información acerca de la respuesta del aparato reproductor masculino a un ambiente con la presencia continua de serotonina o noradrenalina. Por ejemplo, el grupo de Borges (et al., 2020) mostró que en las ratas macho adultas la administración de sibutramina (un inhibidor no selectivo de la recaptura de serotonina y norepinefrina) aceleró el paso de los espermatozoides por el epidídimo y provocó una disminución en la concentración y motilidad de los espermatozoides, así como de los niveles de testosterona séricos.

Por otra parte, la administración de venlafaxina (un inhibidor selectivo de serotonina y noradrenalina) a ratas adultas, mostraron una disminución en la concentración y en la motilidad de los espermatozoides. También reportaron una alteración de la espermiogénesis, probablemente relacionada con un incremento de la actividad de la aromatasa, interesantemente observaron un incremento en la muerte de células germinales y una disminución de las células de Sertoli (Santi et al., 2021). Estos resultados nos permiten sugerir que los cambios en el ambiente de influencia de las monoaminas en el aparato reproductor alteran procesos muy importantes, como son, la espermatogénesis, el transporte de los espermatozoides y adquisición de la motilidad en el epidídimo. Finalmente, no se observaron diferencias significativas en la viabilidad, ni en la motilidad progresiva lenta, ni la movilidad *in situ* en ninguno de los grupos experimentales.

En cuanto al análisis histológico de los testículos de animales con ingesta de hígado con clenbuterol se encontró una disminución significativa del área epitelial. Nuestros resultados apoyan lo reportado por Blanco *et al.*, (2002) donde la administración de Clb por tres meses en cerdos provoca regresión de los túbulos seminíferos, esto nos hace suponer que el clenbuterol ejerce un efecto negativo en el desarrollo del epitelio germinativo. Pudimos corroborar estos resultados con otros trabajos previos, varios estudios abordan las alteraciones a nivel histológico que ejerce el clenbuterol sobre los túbulos seminíferos. Blanco y colaboradores en distintos estudios (2001, 2002a & 2002b) menciona los efectos directos del clenbuterol sobre la morfología del epitelio germinal de cerdos alimentados con CLB, donde sus resultados apuntan a que los túbulos seminíferos sufrieron una regresión del área epitelial tal como lo muestran nuestros resultados. Las alteraciones en el epitelio germinal que explican una menor producción de espermatozoides, también son frecuentes en los estudios donde a ratas macho se les administra inhibidores de la recaptura de noradrenalina y serotonina (Borges et al., 2020; Santi et al., 2021).

Por otra parte, Blanco utilizó dosis constantes de 1000 ng/ml CLB diario de alimento, estas concentraciones de clenbuterol utilizadas en sus estudios con cerdos son posiblemente parecidas que la nuestra. Ante la imposibilidad que tuvimos de medir los niveles de CLB en cada hígado administrado y contaminado, solo podemos especular que los niveles de concentración oscilaron entre $123,1 \pm 0,25$ ng/ml a $989,4 \pm 12,8$ ng/ml como lo muestran estudios de Paz-Calderón (et al., 2011) en bovinos de los rastros de Atlixco y Puebla. También en 2019 en rastros municipales y en fincas ganaderas en varios estados de México, Saavedra-Rodríguez (et al., 2019) con una población de 4650 animales estudiados 245.1 ± 23.2 y 1263.4 ± 62.6 ng/ml 63.2% tuvieron altas concentraciones de Clb. Estos estudios muestran que a pesar de que el Clembuterol está prohibido para acelerar el crecimiento de animales para consumo humano, desgraciadamente es muy común que ganaderos lo utilicen, sin pensar los efectos adversos en la fertilidad de los consumidores de esa carne o vísceras.

Otros resultados de nuestro estudio mostraron que, el testículo derecho del grupo tratado con ingesta de hígado con clenbuterol tuvo un desarrollo diferencial significativo del área epitelial respecto al otro testículo. El testículo derecho mostró una menor área del epitelio germinal de los túbulos seminíferos en comparación con el testículo izquierdo, esto apoya lo reportado por Frankel et al, 1989, quien demostró que los testículos tienen una respuesta compensatoria diferente, siendo el testículo derecho quien produce más testosterona a la falta del izquierdo. Probablemente, el testículo presenta una mayor inervación que el izquierdo, por tal razón el nuestro estudio el testículo derecho presenta una mayor inervación simpática que explicaría porque fue más susceptible a los efectos del Clembuterol.

Es necesario realizar más estudios, entre ellos histológicos sobre área epitelial que pudieran presentar tanto las células germinales, como las células de Sertoli y las células de Leydig a diferentes dosis de CLB, así como la medición de niveles séricos de Testosterona y FSH, también evaluar el porcentaje de espermatozoides maduros.

9. CONCLUSIONES

La ingesta de hígado con clenbuterol en ratones de laboratorio macho ejerce probablemente un efecto negativo en la producción de testosterona.

La ingesta de hígado con clenbuterol en ratones de laboratorio incrementa la motilidad progresiva rápida de espermatozoides de manera significativa.

La ingesta de hígado con clenbuterol en ratones de laboratorio de manera significativa disminuye la concentración de espermatozoides.

La ingesta de hígado con en ratones de laboratorio disminuye el área epitelial de los túbulos seminíferos.

La ingesta de hígado con Clembuterol afecta negativamente la espermatogénesis.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Anakwe, O. O. & Moger, W. H. (1984) Beta 2-adrenergic stimulation of androgen production by cultured mouse testicular interstitial cells. *Life Sciences* 35, 2041±2047.
2. Badino, P., Odore, R., & Re, G. (2005). Are so many adrenergic receptor subtypes really present in domestic animal tissues? A pharmacological perspective. *The Veterinary Journal*, 170(2), 163-174.
3. 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. *Journal of animal science*, 65(6), 1514-1524.
4. Biolatti, B., Castagnaro, M., Bollo, E., Appino, S., & Re, G. (1994). Genital lesions following long-term administration of clenbuterol in female pigs. *Veterinary Pathology Online*, 31(1), 82-92.
5. Blanco, A., Agüera, E., Flores, R., Artacho-Pérula, E., & Monterde, J. G. (2001). Morphological and quantitative study of the Leydig cells of pigs fed with anabolic doses of clenbuterol. *Research in veterinary science*, 71(2), 85-91.
6. Blanco, A., Artacho-Pérula, E., Flores-Acuña, R., Agüera, E., & Monterde, J. G. (2002a). Quantitative modification of the testicular structure in pigs fed with anabolic doses of clenbuterol. *Veterinary research*, 33(1), 47-53.
7. Blanco, A., Flores-Acuña, F., Roldan-Villalobos, R., & Monterde, J. G. (2002b). Testicular damage from anabolic treatments with the β 2-adrenergic

agonist clenbuterol in pigs: a light and electron microscope study. *The Veterinary Journal*, 163(3), 292-298.

8. Borges CS, Silva PV, Lozano AFQ, Missassi G, Silva RF, Anselmo-Franci JA, Kempinas WG. (2020). Impact of timing of the anorexigen sibutramine administration on reproductive end-points of male rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 127(6):525-532.
9. Bosmann, H. B., Hales, K. H., Li, X., Liu, Z., Stocco, D. M., & Hales, D. B. (1996). Acute in vivo inhibition of testosterone by endotoxin parallels loss of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in Leydig cells. *Endocrinology*, 137(10), 4522-4525.
10. Cahill, L., Haier, R. J., White, N. S., Fallon, J., Kilpatrick, L., Lawrence, C., & Alkire, M. T. (2001). Sex-related difference in amygdala activity during emotionally influenced memory storage. *Neurobiology of learning and memory*, 75(1), 1-9.
11. Caicedo Rivas R. E., M. Paz-Calderon Nieto¹ y S. V. Badillo M. (2011) Clembuterol (β 2-Agonista Adrenérgico), Enmascara las patologías hepáticas en bovinos. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal-AICA*.
12. Cordero Flores, N. P. (2017). Análisis histológicos de los túbulos seminíferos de las ratas hemicastradas (Tesis de Licenciatura Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ciencias Biológicas).
13. Couse, J. F., Hewitt, S. C., & Korach, K. S. (2006). Steroid receptors in the ovary and uterus. Knobil and Neill: physiology of reproduction, 3rd edn. Academic Press, New York, 593-678.
14. de Santi F, Beltrame FL, Rodrigues BM, Junior MJVP, Scaramele NF, Lopes FL, Cerri PS, Sasso-Cerri E. (2021). Venlafaxine-induced damage to

- seminiferous epithelium, spermiation, and sperm parameters in rats: A correlation with high estrogen levels. *Andrology*, 9(1):297-311.
15. De Kretser, D. M., and Kerr, J. B. (1988). The cytology of the testis. In *The Physiology of Reproduction* (E. Knobil, and J. D. Neill, Eds.), Vol. 1, pp. 837–932. Raven Press, New York.
 16. Domínguez-Vara, I. A., J. Mondragón-Ancelmo, M. González R., F. Salazar-García, J. L. Bórquez-Gastelum, y A. Aragón-Martínez. (2009). Los β -agonistas adrenérgicos como modificadores metabólicos y su efecto en la producción, calidad e inocuidad de la carne de bovinos y ovinos: una revisión. *Ciencia Ergo Sum* 16 (3) 278-284.
 17. Olaya Fernández, E. (2012). Residuos de clenbuterol en tejidos comestibles de bovino (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma Chapingo).
 18. Frankel, A. I., Chapman, J. C., & Cook, B. (1989). Testes are asymmetric in the testicular hemicastration response of the male rat. *Journal of endocrinology*, 122(2), 485-488.
 19. Geisinger Wschebor, A. (2003). Expresión genética diferencial durante la espermatogénesis de la rata (No. 576.354 GEI).
 20. Gerendai, I., Banczerowski, P., & Halász, B. (2005). Functional significance of the innervation of the gonads. *Endocrine*, 28(3), 309-318.
 21. Gong, Y. G., Wang, Y. Q., Gu, M., Feng, M. M., Zhang, W., & Ge, R. S. (2009). Deprivation of testicular innervation induces apoptosis of Leydig cells via caspase-8-dependent signaling: a novel survival pathway revealed. *Biochemical and biophysical research communications*, 382(1), 165-170.

22. Groot, M. J., Schilt, R., Ossenkoppele, J. S., Berende, P. L. M., & Haasnoot, W. (1998). Combinations of growth promoters in veal calves: consequences for screening and confirmation methods. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 45(1-10), 425-440.
23. Heindel, J. J., Steinberger, A. & Strada, S. J. (1981) Identification and characterization of a beta 1-adrenergic receptor in the rat Sertoli cell. *Molecular and Cellular Endocrinology* 22, 349±358.
24. Hodson, N. (1970). The nerves of the testis, epididymis and scrotum. In *The Testis* (A. D. Johnson, W. R. Gomes, and N. L. Vandemark, Eds.), Vol. I, pp. 47–99. Academic Press, New York.
25. Hull, E. M., Wood, R. I., & McKenna, K. E. (2005). Neurobiology of male sexual behavior. In *Knobil and Neill's physiology of reproduction* (pp. 1729-1824). Elsevier.
26. Jing, L. I., & ZHU, W. J. (2015). Changes of testicular ultrastructure of rat after clenbuterol exposure. *Journal of Reproduction and Contraception*, 26(1), 1-5.
27. Ledo-Varela, M. T., Giménez-Amaya, J. M., & Llamas, A. (2007, April). El complejo amigdalino humano y su implicación en los trastornos psiquiátricos. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 30, No. 1, pp. 61-74). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
28. Liggett, S. B. (2002). Update on current concepts of the molecular basis of β 2-adrenergic receptor signaling. *Journal of allergy and clinical immunology*, 110(6), S223-S228.

29. Ma, J. K., & Zhu, W. J. (2010). Effects of the β 2-agonist clenbuterol on testicular steroidogenic acute regulatory protein mRNA expression in adult rats. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 33(6), 558-563.
30. Mersmann, H. J. 2002. Beta-adrenergic receptor modulation of adipocyte metabolism and growth. *Journal of Animal Science* 80: 24-29.
31. Moger, W. H., & Murphy, P. R. (1983). β -adrenergic agonist induced androgen production during primary culture of mouse Leydig cells. *Archives of andrology*, 10(2), 135-142.
32. Moore, N. G., U. G. Pego, and M. N. Sillence. 1994. Anabolic effects of the β 2-adrenoreceptor agonist salmeterol are dependent on route of administration. *American Journal of Physiology* 267: 475-484.
33. Moreno M., R. S. 2011. Detección de los niveles de clenbuterol en rastros municipales del estado de Puebla a partir de muestras de retina mediante la técnica de ELISA. In 2do Foro Nacional de Rastros 9 y 10 de junio Puebla, México 9 p.
34. Morgan, D. J. 1990. Clinical pharmacokinetics of β -agonists. *Clinical Pharmacokinetics* 18 (4):270-294.
35. O'Donnell, L., Meachem, S. J., Stanton, P. G., & McLachlan, R. I. (2006). Endocrine regulation of spermatogenesis. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, 1, 1017-1070.
36. Odore, R., Badino, P., Barbero, R., Cuniberti, B., Pagliasso, S., Girardi, C., & Re, G. (2007). Regulation of tissue β -adrenergic, glucocorticoid and androgen receptors induced by repeated exposure to growth promoters in male veal calves. *Research in veterinary science*, 83(2), 227-233.

37. Paz-Calderón, N. M., Caicedo-Rivas, R. E., & Hernández-Pérez, B. (2011). Effect of clenbuterol in the levels of acid phosphatase" Prostatic fraction" in cattle males. *Actas Iberoam Conserv Anim*, 1, 136-40.
38. Poyet, P., & Labrie, F. (1987). Characterization of β -adrenergic receptors in dispersed rat testicular interstitial cells. *Journal of andrology*, 8(1), 7-13.
39. Rauchenwald, M., Steers, W. D., & Desjardins, C. (1995). Efferent innervation of the rat testis. *Biology of reproduction*, 52(5), 1136-1143.
40. Re, G., Badino, P., Novelli, A., & Girardi, C. (1995). Down-regulation of β -adrenoceptors and up-regulation of estrogen and progesterone receptors induced by dietary clenbuterol in the female reproductive system of veal calves. *American Journal of Veterinary Research*, 56, 1493-1497.
41. Re, G., Badino, P., Novelli, A., & Girardi, C. (1997). Effects of clenbuterol as a repartitioning agent on β -Adrenoceptor concentrations in heart, bronchi and brain of veal calves. *The Veterinary Journal*, 153(1), 63-70.
42. Recabarren, S. E., Muñoz, P., Lobos, A., Vilches, C., & Parilo, J. (2006). Análogo de GnRH disminuye la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) en ovejas prepúberes. *Archivos de medicina veterinaria*, 38(1), 39-46.
43. Ricker, D. D., Chamness, S. L., Hinton, B. T., & Chang, T. S. (1996). Changes in luminal fluid protein composition in the rat cauda epididymidis following partial sympathetic denervation. *Journal of andrology*, 17(2), 117-126.
44. Ross, M. H., & Wojciech, P. (2009). Sistema genital masculino. En: *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Médica Panamericana. pp. 784-829.

45. Ruffolo Jr, R. R. (1991). Chirality in α - and β -adrenoceptor agonists and antagonists. *Tetrahedron*, 47(48), 9953-9980.
46. Saavedra-Rodríguez, A., Caicedo-Rivas, R. E., Nieto, M. P. C., & Estrada-Poblano, M. (2019). Efecto fisiológico del "[[beta]. sub. 2]-agonista adrenérgico" clenbuterol" en bovinos *Bos taurus* x *Bos indicus*, en el Estado de Puebla, México. *AGROProductividad*, 12(6), 63-69.
47. Setchell, B. P., Maddock, S., and Brook, D. E. (1994). In: *The physiology of reproduction*, Vol. 1, 2nd ed. Knobil, E. and Neill, D. (eds.). Raven Press: New York, pp. 1063–1175.
48. Setchell, B., y Breed, W. (2006). Anatomy, vasculature, and innervation of the male reproductive tract. En: *Physiology of Reproduction*. Eds. Knobil y Neill's USA: Elsevier. 3ra Ed. pp. 771-825.
49. SINGH, J., & HANDELSMAN, D. J. (1996). The Effects of Recombinant FSH on Testosterone-Induced Spermatogenesis in Gonadotrophin-Deficient (hpg) Mice. *Journal of andrology*, 17(4), 382-393.
50. Soria J., L. B., y J. A. Arias M. (1997). Señalización celular por segundos mensajeros. In: *Curso Internacional Precongreso: Actualización en Fisiología. XI Congreso Nacional de Temas Fisiológicos*. Ed. Sociedad Nacional de Temas Fisiológicos. México Distrito Federal del 6 al 8 de octubre. 305 p.0
51. Toyama, Y., Hosoi, I., Ichikawa, S., Maruoka, M., Yashiro, E., Ito, H., & Yuasa, S. (2001). β -estradiol 3-benzoate affects spermatogenesis in the adult mouse. *Molecular and cellular endocrinology*, 178(1-2), 161-168.

52. Tresguerres, J. A., & Salazar, V. (2005). Fisiología del testículo. En: Fisiología Humana. 3ra ed. Madrid, España: Editorial McGraw-Hill Interamericana España, S.A.U: pp.1024.
53. Tsafiriri, A. y Adashi, E. Y. (1994). In: The physiology of reproduction, Vol. 1, 2nd ed. Knobil, E. and Neill, J. D. (eds.). Raven Press: New York, pp. 817–860.
54. Urdaneta, A., Madrid-Bury, N., Rodríguez, J., Aranguren, A., González - Stagnaro, c., & Castejón, o. (1998). Histopatología y morfometría de testículos en toros mestizos 5/8 Holstein y 5/8 Pardo Suizo a los 24 meses de edad. Rev. Científica FCV-LUZ, 8(2), 163-176.
55. Valladares, C.B., Velázquez, O.V., Zamora, E.J.L., Avilés, M.J.A., Zaragoza, B.A. and Posadas, S.M.A. (2013). Implications of the Use of Clenbuterol Hydrochloride in Beef Cattle. In: Salem AFZM. Nutritional Strategies of Animal Feed Additives, New York: Nova Science Publishers, Inc.
56. Waldeck, B., & Widmark, E. (1985). Steric aspects of agonism and antagonism at β -adrenoceptors: Experiments with the enantiomers of clenbuterol. Acta pharmacologica et toxicologica, 56(3), 221-227.
57. Zalco, D., Bories, G. and Tulliez, J. 1998. Metabolic fate of clenbuterol in calves. J Agric Food Chem 1998; 46:1935-1943.

11. ANEXO

Abreviaturas

Clb	Clembuterol
μ	Sufijo Micro
LH	Hormona luteinizante
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina hipotalámica
SSN	Nervio espermático superior
ISN	Nervio espermático inferior
MPOA	Área preóptica medial
AR	Receptores de androgenos
ER	Receptores de estrogenos
GPEG	Grado de Pérdida del Epitelio Germinal
AE	Área epitelial
AT	Área tubular
AL	Área luminal
TI	Testículo izquierdo
TD	Testículo derecho
β-AR	Receptores Beta adrenérgicos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
mRNA StAR	ARN mensajero de la Respuesta Aguda Esteroidogénica