



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**MORFOMETRÍA DEL TEJIDO TESTICULAR DE OVINOS SUPLEMENTADOS
CON ZINC Y CROMO ORGÁNICOS EN LA DIETA**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

PMVZ. JORGE ALFONSO IGLESIAS FUENTES



Toluca, México, Junio de 2022.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**MORFOMETRÍA DEL TEJIDO TESTICULAR DE OVINOS SUPLEMENTADOS
CON ZINC Y CROMO ORGÁNICOS EN LA DIETA**

**TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:
PMVZ. JORGE ALFONSO IGLESIAS FUENTES**

**ASESORES:
Dr. en C. Jorge Pablo Acosta Dibarrat
Dr. en C. Ignacio Arturo Domínguez Vara**



Toluca, México; Junio de 2022.

RESUMEN. En nutrición animal el uso de minerales en la dieta resulta indispensable para el correcto funcionamiento del organismo ya que son responsables de la cooperación entre diferentes procesos biológicos. El zinc (Zn) es un elemento muy importante en la reproducción ya que tiene efecto sobre el desarrollo gonadal. En la producción de LH, FSH y prolactina, lo que potencia la síntesis de ácidos nucleicos y por lo tanto la división celular; el cromo (Cr) estimula los receptores de insulina y el transporte de nutrientes a través de las membranas plasmáticas colaborando en el desarrollo del musculo. En el presente trabajo se evaluó el efecto de Cr y Zn orgánicos sobre el peso y diámetro testicular, así como en el desarrollo histológico de los túbulos seminíferos y altura del epitelio germinal de testículos de ovinos. En la fase experimental, respuesta productiva con alimentación intensiva, se usaron 36 ovinos, machos enteros, peso vivo inicio= 20.5 ± 1.1 , peso vivo final= 46.2 ± 1.4 kg, genotipo $\frac{3}{4}$ de la raza Suffolk, de aproximadamente 4.5 meses de edad. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 3x2. Cr (0, 0.3 y 0.6 ppm) y Zn (0 y 80 ppm) de tratamientos, con 6 repeticiones por tratamiento. Una vez concluida la engorda (75 d), los ovinos fueron sacrificados por métodos humanitarios, se pesó la canal caliente y se evaluó, en ambos testículos, el peso y circunferencia testicular de 30 ovinos (5/tratamiento). Para el estudio histológico, se colectaron 20 g de cada testículo izquierdo de 30 ovinos, las cuales fueron fijadas en solución de Bouin y posteriormente teñidas con hematoxilina y eosina. Para la evaluación métrica histológica, se seleccionaron cuatro cuadrantes por laminilla, se observaron 10 campos y se registraron 40 medidas de espesor y diámetro de túbulos seminíferos con el objetivo 10x, y la aplicación Zview de un microscopio con dispositivo táctil Amscope, modelo T-720, a una escala de ($0.963 \mu/1000$ pixeles). No hubo efecto de Cr, Zn o su interacción en el peso y circunferencia testicular, ni en el peso relativo testicular. En contraste, hubo efecto ($P \leq 0.001$) de Zn y Cr en el diámetro de los túbulos seminíferos y espesor de los epitelios germinales; además hubo efecto de la interacción Zn con Cr en el diámetro de los túbulos seminíferos ($P \leq 0.008$) y espesor de los epitelios germinales ($P \leq 0.008$). Se concluye que el Zn y Cr orgánicos influyeron en el desarrollo histológico testicular de ovinos jóvenes en engorda con alimentación intensiva.

Palabras claves: Cromo, Zinc, Testículos, Ovino, Túbulos seminíferos, Epitelios germinales.

SUMMARY. In animal nutrition, the use of minerals in the diet is essential for the proper functioning of the organism since they are responsible for the cooperation between different biological processes. Zinc (Zn) is a very important element in reproduction since it has an effect on gonadal development, production of LH, FSH and prolactin, which enhances nucleic acid synthesis and therefore cell division; on the other hand, chromium (Cr) has the property of stimulating insulin receptors and the transport of nutrients through plasma membranes collaborating in the development of muscle mass. In the present work, the effect of organic Cr and Zn on testicular weight and diameter was evaluated, as well as on the histological development of seminiferous tubules and height of the germline epithelium of sheep testicles. In the experimental phase, productive response with intensive feeding, 36 sheep, whole males, starting live weight= 20.5±1.1, final live weight= 46.2±1.4 kg, genotype $\frac{3}{4}$ of the Suffolk breed, approximately 4.5 months old, were used. A completely randomized experimental design was used with a factorial arrangement 3x2 Cr (0, 0.3 and 0.6 ppm) and Zn (0 and 80 ppm) of treatments, with 6 repetitions per treatment. After finishing the fattening (75 d), the sheep were slaughtered by humane methods, the warm carcass was weighed and the weight and testicular circumference of 30 sheep were evaluated in both testicles (5/treatment). To carry out the histological metric study, portions of approximately 20 g were collected from each left testis from 30 sheep, which were fixed in Bouin solution and subsequently stained with Hematoxylin and Eosin. For histological evaluation, four quadrants per slide were selected, 10 fields were observed and 40 measurements of thickness and diameter of seminiferous tubules were recorded with the 10x objective, and the Zview application of a microscope with an Amscope touch device, model T-720 , at a scale of (0.963 μ /1000 pixels). There was no effect of Cr, Zn or its interaction on weight and testicular circumference, nor on the body weight/testicular weight ratio. In contrast, a positive effect ($P \leq 0.001$) of Zn and Cr was observed in the diameter of the seminiferous tubules and in the thickness of the germinal epithelia; in addition, there was a significant effect of the Zn-Cr interaction on the diameter of the seminiferous tubules ($P \leq 0.008$) and on the thickness of the germinal epithelia ($P \leq 0.008$). It is concluded that the minerals Zn and Cr from organic sources influenced the testicular histological development of young sheep in fattening with intensive feeding.

Key words: Chrome, Zinc, Testes, Ovine, Seminiferous Tubes, Germinal epithelia.

AGRADECIMIENTOS

INDICE

Resumen.....	iii
Summary.....	iv
Agradecimientos.....	v
Índice.....	vi
Índice de cuadros.....	viii
Índice de figuras.....	ix
1. Introducción.....	1
2. Revisión de literatura.....	3
2.1. Aspectos generales.....	3
2.2. Zinc.....	4
2.2.1. Zinc en la producción y reproducción del ovino.....	4
2.3. Cromo.....	9
2.3.1. El cromo en la producción y reproducción del ovino.....	9
2.4. Anatomía testicular del ovino.....	14
2.4.1 La espermatogénesis en ovinos.....	15
3. Justificación.....	17
4. Hipótesis.....	18
5. Objetivos.....	19
5.1. Objetivos generales.....	19
5.2. Objetivos particulares.....	19
6. Material y métodos.....	20
6.1. Material biológico.....	20
6.2. Metodología.....	21
6.2.1. Tratamientos y evaluaciones de muestras.....	21
6.3. Evaluación histológica.....	22
6.3.1. Mediciones.....	23
6.4. Análisis estadístico.....	24
7. Límite de tiempo.....	25
8. Límite de espacio.....	26
9. Resultados.....	27

10. Discusión.....	34
11. Conclusiones.....	38
12. Perspectivas.....	39
13. Literatura citada.....	40

INDICE DE CUADROS

Cuadro I. Ingredientes de la dieta y su composición química.....	21
Cuadro II. Tratamientos que recibieron los ovinos durante la fase de engorda con alimentación intensiva.....	22
Cuadro III. Efecto de los minerales zinc y cromo orgánicos suministrados en la dieta sobre el peso (g) y diámetro testicular (cm) de ovinos en engorda.....	27
Cuadro IV. Efecto de los minerales zinc y cromo orgánicos suministrados en la dieta sobre el diámetro de los túbulos seminíferos y espesor del epitelio germinal de ovinos en engorda.....	28
Cuadro V. El efecto de la interacción de los minerales zinc con cromo orgánicos suministrados en la dieta sobre el diámetro de los túbulos seminíferos y espesor del epitelio germinal de tejido testicular de ovinos jóvenes en engorda.....	28
Cuadro VI. Efecto de la interacción de los minerales zinc con cromo orgánicos suministrados en la dieta sobre el diámetro de los túbulos seminíferos y espesor del epitelio germinal de tejido testicular de ovinos jóvenes en engorda.....	29

INDICE DE FIGURAS

Figura I. Corte histológico de testículo de cerdo: sección de túbulos seminíferos con identificación de células de Sertoli y diferenciación de la zona intersticial con presencia de células de Leydig.....	7
Figura II. Corte histológico de testículo de ovino: ejemplo de medición del diámetro de los túbulos seminíferos en la aplicación ZJView.....	23
Figura III. Corte histológico de testículo de ovino: ejemplo de medición del diámetro de túbulos seminíferos y espesor de epitelio germinal en ovinos del tratamiento I (control).....	29
Figura IV. Corte histológico de testículo de ovino: ejemplo de medición del diámetro de túbulos seminíferos y espesor de epitelio germinal en ovinos del tratamiento III.....	30
Figura V. Corte histológico de testículo de ovino: ejemplo de medición del diámetro de túbulos seminíferos y espesor de epitelio germinal en ovinos del tratamiento IV.....	31
Figura VI. Corte histológico de testículo de ovino: ejemplo de medición del diámetro de túbulos seminíferos y espesor de epitelio germinal en ovinos del tratamiento V.....	32
Figura VII. Gráfica que muestra el efecto de la interacción de los minerales Cr y Zn orgánicos sobre los diámetros de túbulos seminíferos de tejido testicular de ovinos jóvenes en engorda con alimentación intensiva.....	33
Figura VII. Gráfica que muestra el efecto de la interacción de los minerales Cr y Zn orgánicos sobre los diámetros de túbulos seminíferos de tejido testicular de ovinos jóvenes en engorda con alimentación intensiva.....	33

1. INTRODUCCIÓN

La reproducción animal está influenciada por factores como la edad, sexo, raza, época del año, alimentación, entre otros. La alimentación, en particular, es un factor muy importante en el desarrollo del organismo, de los órganos sexuales y futura capacidad de las hembras y machos reproductores; así mismo, la formulación de dietas permite cubrir los requerimientos nutricionales de energía, proteína, vitaminas y minerales (Peralta-Torres *et al.*, 2013).

El organismo necesita adquirir cantidades suficientes de cada micronutriente para formar una red homeostática de procesos que conlleve a la movilización, captación, distribución, tráfico intracelular, almacenamiento y aprovechamiento de dichos nutrientes (Hänsch y Mendel, 2009).

En los rumiantes, la complementación con minerales puede ser necesaria ya que cuando las fuentes minerales tienen biodisponibilidad limitada no se alcanzan a cubrir los requerimientos nutrimentales con relación a su potencial de producción; de esta forma, en hembras y machos, las funciones de producción y reproducción se ven afectadas por las deficiencias y/o excesos de minerales (Reséndiz *et al.*, 2012).

Los micro minerales son también llamados minerales traza u oligoelementos, forman parte de varias enzimas y participan en varios procesos biológicos, en consecuencia, son necesarios para mantener la salud animal y asegurar la productividad, pues aproximadamente el 50% de las enzimas corporales requieren algún mineral para su funcionamiento (Waldron *et al.*, 2009). En trabajos realizados con machos de distintas especies animales, la deficiencia de Zn produjo una disminución de la espermatogénesis, así como una menor síntesis de testosterona por las células de Leydig (McDowell, 1992).

El suministro de Zn, tanto en humanos como en animales pecuarios, ha mostrado tener una influencia funcional en la espermatogénesis. El Zn parece ser un elemento indispensable en la reproducción por su efecto sobre el desarrollo gonadal; además, el

Zn juega un papel muy importante en la producción de las hormonas LH, FSH y prolactina; asimismo, el Zn forma parte de enzimas vitales para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, así como en el estado oxidativo general, lo anterior indica que tiene funciones importantes en la reproducción del semental ovino (Irvine, 1996; Vézina *et al.*, 1996; Oguntibeju *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2013).

En general, está aceptado que hay una relación estrecha entre el tamaño de los testículos y la producción de semen; por lo tanto, los sementales ovinos con testículos pequeños pueden producir insuficientes concentraciones de espermatozoides durante el período de empadre, en consecuencia no se logran buenas tasas de fertilidad (Mahmoud, 2013).

Los requerimientos nutrimentales de los ovinos cambian durante el crecimiento, desarrollo y ciclo de producción (Mahmoud, 2013). Los testículos descienden al escroto en el momento del nacimiento. El tejido testicular comienza a diferenciarse entre los 3 y 4 meses de edad, con aparición de los primeros espermatozoides. Aproximadamente a los 6 meses de edad ya hay espermatozoides maduros; después de los 7 meses de edad, los espermatozoides ya pueden tener capacidad fecundante (madurez sexual). La capacidad fecundante del semen puede ser bastante baja al principio, pero aumenta rápidamente con la edad (Galina y Valencia, 2014).

Se ha indicado que para los ovinos en crecimiento, los requerimientos dietarios de zinc son de 30 a 40 ppm y de cromo de 0.2 ppm; para la función reproductiva óptima aunque no se ha establecido un mínimo, hay evidencia que los requerimientos de Zn y Cr pueden ser mayores que para crecimiento (NRC, 2007).

Por lo tanto, la finalidad del presente estudio se enfocó a evaluar el efecto de suplementar zinc y cromo orgánicos en la dieta, sobre el tamaño y desarrollo histológico testicular de ovinos jóvenes, durante el crecimiento y post sacrificio, en términos de circunferencia escrotal, peso, diámetro de los túbulos seminíferos y espesor del epitelio germinal.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Aspectos generales

Los alimentos para animales se componen principalmente de sustancias de origen orgánico como los glúcidos, proteínas y lípidos. Una pequeña cantidad está formada por la materia inorgánica o cenizas que contiene a los elementos minerales, varios de ellos, indispensables para diversas actividades del organismo (Shimada, 2009).

La materia inorgánica del organismo comprende un gran número de minerales presentes en concentraciones variables en las diferentes partes del cuerpo según las funciones que realizan (Underwood y Suttle, 1999).

A los siguientes elementos minerales se les conocen funciones esenciales en el organismo y por lo tanto, deben estar presentes en la dieta del animal: calcio, fosforo, sodio, potasio, cloro, magnesio, azufre, selenio, molibdeno, hierro, azufre, yodo, manganeso, cobre, cobalto, zinc y cromo. La exactitud de los requerimientos de los minerales ha sido más difícil de definir que la de los nutrientes orgánicos, ya que muchos factores determinan su aprovechamiento (Underwood y Suttle, 1999).

2.2. Zinc

El Zn es un elemento esencial para los animales pecuarios, muchas enzimas contienen Zn y es importante en el metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos, estimula la actividad de aproximadamente 100 enzimas, contribuye al buen funcionamiento del sistema inmunitario, es necesario para la cicatrización de las heridas, y en la síntesis del ADN. Se encuentra en la insulina, las proteínas dedo de Zn (zinc finger) y diversas enzimas como la superóxido dismutasa (Chirase *et al.*, 1994) (Jing *et al.*, 2007)

Por las funciones que desempeña el Zn es considerado esencial para la vida. Desde el punto de vista fisiológico es crítico porque posee propiedades multifuncionales, interviene en un gran número de rutas bioquímicas y tiene una función biológica importante ya que está presente en el núcleo de la célula, nucléolo y cromosomas, aportando estabilidad a la estructura del ADN, ARN y ribosomas (Cámara y Amaro, 2003; Johnson *et al.*, 2011).

La función principal de Zn en el organismo está vinculada con las enzimas, como parte de la molécula o como activador. Las cantidades sustanciales de Zn firmemente ligado establecen las estructuras de ARN, ADN y ribosomas (McDowell y Arthington, 2005). La utilización de aminoácidos, en la síntesis de proteínas, es afectada por deficiencia de Zn. El Zn forma parte de casi 300 metaloenzimas en diferentes especies (Mertz, 1993). Las metaloenzimas que intervienen en los procesos de catálisis enzimática, desempeñan un papel estructural en las células, participan en gran variedad de procesos metabólicos como la síntesis y/o degradación de los lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos. (Molokwu y Li, 2006; Formigari y Irato, 2007).

2.2.1. Absorción del zinc

La ingestión de alimento puede verse afectada por el exceso o falta de Zn en la dieta, asimismo, el primer sistema del control homeostático de Zn en el organismo es el gastrointestinal (Suttle, 2010).

La absorción de Zn se produce en el duodeno en una proporción de (58%), yeyuno (10%) e íleon (30%). El mecanismo de absorción del Zn exógeno no ha sido estudiado a fondo, aunque se admite que este proceso se compone de dos fases: 1) Absorción insaturable, que no es afectada por la ingesta de Zn en el alimento y, 2) Absorción saturable, es estimulada por la disminución en el consumo de Zn (Klasing *et al.*, 2005; Maret. 2006).

2.2.2. El zinc en la producción y reproducción del ovino

El Zn es un regulador de la proliferación y crecimiento celular. La hipófisis contiene una alta concentración del Zn el cual se encarga de controlar la función hormonal, y con ello, la secreción de la hormona del crecimiento (GH). Esta hormona, cuenta con un sitio de unión al Zn que es funcional y estructuralmente importante para regular el crecimiento somático. La hormona de crecimiento estimula la síntesis hepática y la secreción de IGF-I a través de la asociación con los receptores de GH en el hígado. La síntesis del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), también es regulada por la presencia del Zn. La relación entre el Zn e IGF-I interviene en el efecto promotor del crecimiento de la GH. Los efectos anabólicos de IGF-I en las células osteoblásticas son mediados y mejorados por la presencia del Zn en el organismo (MacDonald, 2000; Hernández, 2006).

El Zn es esencial para la vida ya que forma parte de numerosos sistemas enzimáticos, con acción principalmente en los tejidos de alta velocidad de formación de células, de allí que su deficiencia perjudique el crecimiento de los corderos, disminuya la espermatogénesis en los carneros y predisponga a las enfermedades de la piel (Mufarrege, 2002).

El Zn interactúa significativamente con las hormonas, por lo tanto, es importante en la producción, almacenamiento y secreción de hormonas individuales, así como en la efectividad de los sitios receptores y la respuesta de órganos terminales. La deficiencia de Zn afecta la producción y secreción de las hormonas testosterona, insulina y corticosteroides adrenales. En el macho, la espermatogénesis y el desarrollo de los órganos sexuales primarios y secundarios, y en la hembra, todas las fases del proceso reproductivo, desde el estro hasta el parto y la lactancia, pueden ser adversamente afectados por la deficiencia de Zn (McDowell y Arthington, 2005).

El Zn es necesario para la expresión o represión de genes, de tal manera que el potencial genético de los animales no se puede expresar completamente sin los niveles óptimos de este micro elemento. En general, se ha demostrado que todas las etapas de la reproducción del macho pueden ser afectadas por la deficiencia de Zn (Apgar y Fitzgaerald, 1985).

El aparato reproductor no suele almacenar grandes cantidades de Zn, su contenido mineral se ve afectado por el consumo y absorción. A medida que aumenta el consumo de Zn, aumenta la concentración en los testículos, epidídimo y próstata, así como en sus secreciones. En el caso de los testículos, cuando una dieta es baja en Zn, suele disminuir, aproximadamente, el 11% de este mineral en el parénquima (Mertz, 1993).

Se ha indicado que el Zn fomenta el desarrollo de los órganos reproductores, así como la producción de esperma. El Zn también es importante en la fabricación de colágeno para el grosor de la piel, fortalecimiento del pelo, cuernos y pezuñas; asimismo, participa en la cicatrización de heridas y quemaduras (Underwood y Suttle, 1999).

La concentración tisular de Zn orgánico presenta variaciones de escasa magnitud en situaciones de deficiencia. La respuesta, entre otros, depende de la especie, edad y órgano considerado. En trabajos realizados con machos de distintas especies animales, la deficiencia de Zn produjo una disminución de la espermatogénesis y síntesis de testosterona por las células de Leyding (McDowell *et al.*, 1993).

2.2.3. Relación de Zn con las hormonas

La insulina cristalina posee cantidades sustanciales de Zn; se han llevado a cabo varios estudios (la mayoría en ratas), sobre el rol del Zn en la síntesis, almacenamiento y secreción de la insulina, así como la interacción hormona-receptor y la respuesta final en órganos blanco (Mc Dowell, 1992). El zinc, en su forma libre, se concentra en los gránulos secretorios de insulina.

El Zn tiene relación con otras hormonas como corticoides adrenales, gonadotrofinas, testosterona, hormona del crecimiento, etc.; también se ha sugerido que la acción de la ACTH, en corteza adrenal, es Zn dependiente ya que la ACTH es incapaz de estimular la síntesis de corticoesteroides en ratas deficientes de Zn. La deficiencia marginal de Zn en ratas se asocia también, a menores niveles circulantes de somatotrofina (Underwood y Suttle, 1999). En trabajos realizados con machos de distintas especies animales, la

deficiencia de Zn disminuyó la espermatogénesis y síntesis de testosterona por las células de Leydig (Mc Dowell, 1992).

2.2.4. Efecto del zinc en el desarrollo histológico del testículo

Células de Leyding

El Zn es esencial en procesos de regeneración celular, por lo tanto, afecta directamente el desarrollo de las células de Leyding (cL) (Piotrowska *et al.*, 2011; Khalaf *et al.*, 2014).

Estudios realizados por Loera-Ortega (2016) indicaron que el tratamiento control con menor concentración de Zn (25 ppm) redujo 28.5% el número de cL en testículos de cerdos prepúberes, y, en verracos jóvenes, redujo 14.61% el número de cL. Khalaf *et al.* (2014) consignaron que la deficiencia de Zn afecta el número de cL. Lunstra *et al.* (2003) evaluaron el número de cL en machos porcinos, encontrado valores de 24.04 a 57.48 cL/g testicular en cerdos de 112 y 220 días de edad. En el estudio de Loera-Ortega (2016) solo se contaron las cL ubicadas en el compartimento intertubular, por lo tanto los resultados son similares a los obtenidos por Costa *et al.* (2013) con valores de 12.9 ± 1.5 cL vs 14 a 20 cL en cerdos pre púberes. Para el caso de verracos jóvenes el número de cL encontrado fue de 15.6 a 19.6, lo cual indica que el efecto de los tratamientos fue similar al incluir Zn en el pienso, siendo dichos valores superiores a los reportados por Costa *et al.* (2013).

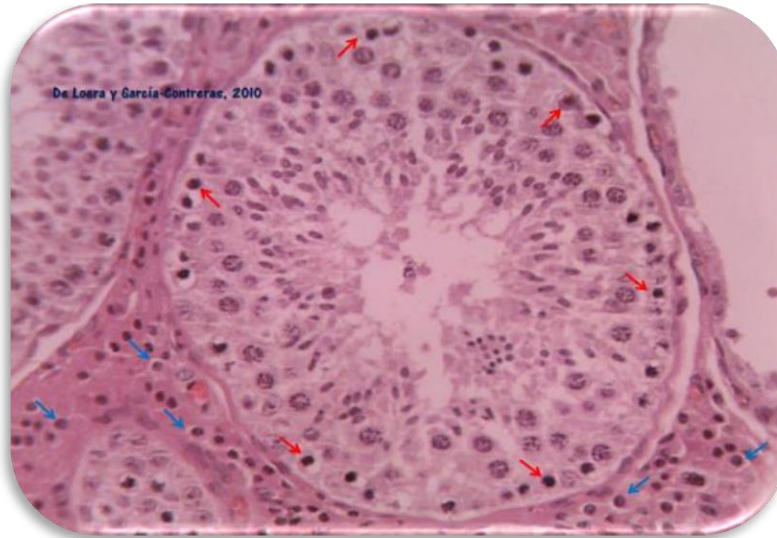


Figura I. Corte histológico de testículo de cerdo: sección de túbulos seminíferos con identificación de células de Sertoli (→) y diferenciación de la zona intersticial con presencia de células de Leydig (→) (tomado de De Loera-Ortega, 2016).

2.2.5. Epitelio germinal

Las células de Sertoli (cS) son estimuladas por la hormona FSH, en esta el Zn participa en su síntesis y excreción. La FSH promueve la producción de glicoproteínas y proteína de unión a andrógenos, y genera una elevada concentración de hormona testosterona (T) alrededor de las células germinales para la adecuada espermatogénesis. Por otra parte el Zn también participa en la producción de otras hormonas sexuales y factores de crecimiento como es el caso de la testosterona y GnRH (Kheirandish *et al.*, 2014 citado por De Loera-Ortega, 2016).

La función del Zn en la protección de las células germinales testiculares ha sido estudiada por Maremanda *et al.* (2014). Loera-Ortega (2016) encontró que, en testículos de cerdos pre púberes y cerdos jóvenes, el número de células de Sertoli fue de 1.35 a 4.72 vs 1.68 a 4.12 por túbulo, valores inferiores a los de cerdos recién nacidos (10.35) reportados por (Haeussler y Clauss, 2007).

Asimismo, Loera-Ortega (2016) concluyó que, en general, el Zn, en testículos de cerdos pre púberes y verracos jóvenes activos, no afectó las variables estudiadas, pero si observó un comportamiento diferente entre fuentes de Zn (orgánicas vs inorgánicas); por lo tanto, estableció que es probable que los cerdos pre púberes no necesiten niveles altos de Zn (150 ppm). Además, señala que utilizar fuentes orgánicas tampoco demuestra mejoras substanciales en las variables testiculares, por lo que, en tanto no se realicen mayores estudios, es mejor seguir usando concentraciones de Zn menores a 150 ppm en la dieta de cerdos.

Está demostrado que el número de cS en el testículo de animales adultos está relacionado con el peso testicular (Sharpe *et al.*, 2003), lo cual no ocurrió en este estudio. Estudios en ratones indican que la deficiencia de Zn puede producir atrofia de los túbulos seminíferos e interrupción de la espermatogénesis (Ozturk *et al.*, 2003).

2.2.6. Función antioxidante del Zn

Las propiedades antioxidantes del Zn en los sistemas biológicos son esenciales, participa en la estabilización de las membranas lipídicas, regeneración de células dañadas, como mecanismo de defensa antioxidante y puede bloquear la muerte celular (apoptosis). Al no sufrir reacciones de óxido reducción, tiene alta capacidad de estabilidad, por lo tanto actuando como antagonista de metales redox-activos como el Cu y Fe. El Zn está involucrando en procesos de transferencia de electrones en condiciones celulares normales y patológicas, pero debido a su carga eléctrica no puede cruzar las membranas biológicas por mecanismos de difusión pasiva. Estabiliza ciertos sulfhídricos de las enzimas oxidativas, un ejemplo de ello es su acción en la enzima tubulina (Johnson *et al.*, 2011; Piotrowska *et al.*, 2011).

Formigari e Irato (2007), mencionan que el papel del Zn en la estabilización de las membranas lipídicas y en el bloqueo de la muerte celular, puede presentarse debido a las siguientes acciones del Zn: 1) Provee un nivel adecuado de MTs, que actúan como mecanismos de eliminación de radicales libres. 2) Participa como componente esencial de la interacción con la enzima Cu-Zn-SOD (superóxido dismutasa). 3) Resguarda a la

célula de la acción de agentes tóxicos y otros grupos químicos nocivos. Después de un estímulo nocivo, por ejemplo una inflamación transitoria, el posterior estrés de oxidación, induce la liberación de Zn procedente de MT a través de óxido nítrico (NO), favoreciendo la actividad y expresión de enzimas antioxidantes, incluyendo MT, reduciéndose el daño oxidativo y las consecuencias de un estímulo de efectos perjudiciales para la célula, por lo que se ha demostrado que el Zn puede participar como modulador de la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Formigari e Irato, 2007; Johnson *et al.*, 2011; Piotrowska *et al.*, 2011).

2.3. Cromo

2.3.1. Cromo en la producción y reproducción del ovino

El interés sobre la nutrición con cromo fue primero en animales de laboratorio y humanos; en las especies pecuarias, es una nueva área de investigación. Los beneficios potenciales del Cr que se han generado ahora se están estudiando en el ganado. El enfoque de los estudios con Cr ha sido sobre reducir el estrés y mejorar el estado inmunológico, mejorar la eficiencia alimenticia, el estado metabólico y la calidad de los alimentos (NRC, 1997).

2.3.2. Función del Cr

El Cr es un nutriente esencial en el metabolismo de humanos y animales de laboratorio (Mertz, 1993). El Cr participa en la estructura del factor de tolerancia a la glucosa (FTG) (Anderson *et al.*, 1978) y de la cromodulina (Vincent, 2000). La función del Cr en el metabolismo es a través de estos compuestos organometálicos (Mertz, 1993; Vincent, 2000). El efecto trófico del Cr es mejorar la comunicación entre la insulina y sus receptores ubicados en la membrana celular de los tejidos sensibles a la insulina (tejidos adiposo y muscular) al aumentar la fluidez de la membrana y la tasa de internalización de la insulina (Evans y Bowman, 1992). El FTG amplifica la acción de la

insulina en sujetos con deficiencia de Cr, mientras que la cromodulina mejora la acción de la insulina en sujetos con suficiente Cr (Yomamoto *et al.*, 1988).

Factor de tolerancia a la glucosa y su significado biológico. El primer concepto del Cr como elemento indispensable para el metabolismo normal de carbohidratos y lípidos se desarrolló a principios de los años cincuenta. Schwarz (1951) observó disminución de la tasa de desaparición de la glucosa en plasma en ratas alimentadas con 300 g de levadura torula como única fuente de proteína. Posteriormente, en un estudio comparativo, y Schwarz y Mertz (1957) evaluaron la relación entre la tasa de desaparición de la glucosa plasmática y el tipo de levadura e informaron que la tasa de desaparición de la glucosa plasmática aumentó de 2.6 a 4.5% por minuto, cuando las ratas fueron cambiadas de una dieta con inclusión de levadura torula a levadura de cerveza. En un experimento siguiente, Schwarz y Mertz (1959) demostraron que la inyección de levadura de cerveza en ratas dio como resultado un aumento en la tasa de oxidación de la glucosa a dióxido de carbono, la utilización de la glucosa para la lipogénesis, la captación de glucosa por la lente óptica y el transporte de galactosa. Dos años más tarde, los mismos investigadores (Schwarz y Mertz, 1959) aislaron el compuesto que mejoró la tasa de desaparición de la glucosa plasmática en ratas alimentadas con levaduras de cerveza y riñón de cerdo; llamando a este compuesto como FTG.

Los receptores de sensibilidad a la insulina aumentan gracias al Cr; en consecuencia, incrementan la potencia de esta hormona, la cual estimula a los receptores de transporte, para llevar los nutrientes hacia el interior de la membrana plasmática en la célula (Kandror, 1999).

La cromodulina y su significado biológico. El Cr también existe como parte de varias sustancias de unión al Cr de bajo peso molecular en diversos tejidos de mamíferos, incluidos riñón, hígado y calostro (Vincent, 2000; Yomamoto *et al.*, 1988). Entre estas sustancias, solo la cromodulina tiene una actividad biológica. La cromodulina, un polipéptido de unión a Cr consiste en ácido aspártico, ácido glutámico, glicina y cisteína en una proporción de 5: 4: 2: 1 (Yomamoto *et al.*, 1988).

2.3.3. Absorción del Cr

La capacidad de absorción de Cr en el ganado es en parte desconocida porque los estudios se han realizado principalmente en animales de laboratorio y humanos. El Cr se absorbe poco en el tubo gastrointestinal. La absorción de Cr es un proceso no saturable y es regulado por difusión pasiva (Dowling *et al.*, 1989). En una proporción de consumo, el principal sitio de absorción de Cr es el yeyuno (0.8 a 2.1%), seguido del íleon (0.7 a 1.8%) y el duodeno (0.8 a 1.5%) (Chen *et al.*, 1973). La baja absorción podría deberse a la formación de cromato o la unión a proteínas no digeridas después de la ingestión (Stoecker, 1996).

Varios factores influyen en la absorción de Cr, se incluyen las características químicas de Cr (orgánico *versus* inorgánico y el estado de valencia), la presencia de agentes quelantes, el estado fisiológico de los individuos, la cantidad de consumo de Cr y otros metabolitos y fármacos (NRC, 1997). La suplementación de vitamina C, niacina (Wang *et al.*, 1985) y aminoácidos (Urberg *et al.*, 1986) aumenta la biodisponibilidad de Cr hasta 25%.

En general, se ha demostrado que el Cr en formas orgánicas se absorbe más fácilmente que el Cr en formas inorgánicas (Anderson *et al.*, 1993). Anderson y Kozlovsky (1985) informaron que el Cr en la levadura es ocho veces más absorbible que el Cr en el cloruro de Cr (2-3%). El Cr hexavalente se reduce a la forma trivalente antes de ser digerido cuando se administra por vía oral (Anderson, 1987). Cuando se realiza una infusión directa en el intestino delgado, la absorción de Cr hexavalente es aproximadamente cinco veces mayor que la del Cr trivalente. El estado nutricional también altera la capacidad de absorción de Cr. La absorción de cromo es mayor en condiciones de ayuno que en condiciones de alimentación (Chen *et al.*, 1973). Un estudio, realizado en ratas, mostró que la absorción de Cr aumenta a medida que aumenta el oxalato, disminuye a medida que aumenta el fitato y no se afecta por el citrato y el EDTA (Chen *et al.*, 1973).

La absorción de Cr está inversamente relacionada con su ingesta. Anderson y Kozlovsky (1985) demostraron en humanos que con 2 mg de ingesta, la absorción fue de 2%, mientras que con 40 mg de ingesta, o mayor, la absorción fue de 0.4%.

2.3.4. Excreción de Cr

Los factores que afectan la absorción de Cr parecen afectar la ruta de excreción del mismo. El Cr en formas inorgánicas se excreta principalmente a través de las heces (Offenbacher *et al.*, 1986), mientras que el Cr en formas orgánicas se excreta principalmente a través de la orina (Hambidge, 1974). La cantidad de Cr excretada es proporcional a la consumida. Anderson *et al.* (1990) demostraron, en humanos, que a una ingesta de 38 mg, la cantidad de Cr en orina fue de 0.3 mg, mientras que con una ingesta de 74 mg, la cantidad de Cr en la orina fue de 0.8 mg. También se informó que la excreción de Cr aumenta de 10 a 300 veces con el estrés o consumo de altas cantidades de carbohidratos.

2.3.5. Deficiencia de Cr

Los factores que causan el agotamiento del Cr incluyen un alto consumo de carbohidratos, envejecimiento, estrés por calor, embarazo, lactancia, ejercicio agudo, trauma físico y obesidad (Hambidge, 1974; Mertz, 1993).

La deficiencia marginal de Cr causa un síndrome que no se distingue de la diabetes mellitus moderada, se caracteriza por una tasa de eliminación de glucosa alterada, hiperglucemia en ayunas y glucosuria (Mertz, 1993). La deficiencia de Cr afecta la función de la insulina al reducir la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina, la cantidad de receptores de insulina y su afinidad por la insulina (Anderson, 1986). Además, la deficiencia de Cr puede aumentar los riesgos de diabetes (Mertz, 1969) y enfermedades coronarias (Schroeder, 1968).

La deficiencia de Cr se asocia con concentraciones elevadas de lipoproteínas de baja densidad y triglicéridos en suero y formación de placa aórtica (Schroeder y Balassa,

1965). En varios estudios se demostró que la suplementación con Cr revirtió rápidamente la hipercolesterolemia en sujetos deficientes en Cr (Schroeder, 1969) y causó una reducción de peso en sujetos adecuados en Cr (Evans, 1989; Press *et al.*, 1990).

Aparentemente la deficiencia de Cr origina la disminución de la sensibilidad de tejidos periféricos a la insulina. Se atribuyen a las deficiencias de Cr las lesiones en la córnea, reducción del grado de crecimiento, trastorno en el metabolismo proteico y reducción de la longevidad. También se establece que en cierto grado causa la intolerancia a la glucosa en humanos (Mertz, 1993).

2.3.6. Efecto del Cr en la fertilidad

La nutrición con Cr es un concepto relativamente nuevo en la nutrición animal del ganado. Recientemente, el Comité de Nutrición Animal (NRC, 1997) evaluó los resultados de la suplementación con Cr a partir de siete estudios realizados en ganado lechero, 20 estudios realizados en ganado de carne y siete estudios realizados en ovejas. En estos estudios, la cantidad de Cr proporcionada en las dietas basales varió de 0.79 a 1.6 mg de Cr por kg de MS y la cantidad de Cr suplementario varió de 5.5 a 10 mg de Cr por día. Las principales conclusiones fueron la inconsistencia entre los resultados informados y la insuficiencia de los datos disponibles generados a partir de estos estudios para evaluar los requisitos de Cr para las especies pecuarias. Sin embargo, también se llegó a la conclusión de que los suplementos dietéticos de Cr podrían ser benéficos para la salud y el bienestar de los rumiantes en momentos de estrés (NRC, 1997).

Además del deterioro de la función de la insulina, la deficiencia de Cr se caracteriza por el deterioro de los parámetros que pueden ser pertinentes para la producción de alimentos de origen animal. Estas incluyen opacidades corneales (Roginski y Mertz,

1967), reducción del conteo de espermatozoides y la fertilidad (Anderson y Polansky, 1981), disminución de la tasa de supervivencia (Schroeder *et al.*, 1965), disminución de la tasa de crecimiento (Schroeder *et al.*, 1963) y reducción de la longevidad (Evans y Mayer, 1994). Los factores estresantes enmascaran los síntomas de la deficiencia de Cr (Roginski y Mertz, 1969).

Diversos estudios en animales y humanos han demostrado que la suplementación con Cr aumenta la masa muscular, sobre todo en la etapa de crecimiento, viéndose reflejado en una disminución en la cantidad de grasa en el músculo (Hegsted *et al.*, 1997).

2.4 Anatomía testicular del ovino

Los testículos son los órganos centrales del aparato reproductor del macho; generalmente de la misma dimensión (pares), formas ovoides y encapsulados; histológicamente están conformados por túbulos seminíferos separados por tejido intersticial y rodeados por tejido conjuntivo fibroso (túnica albugínea). Los dos testículos se encuentran dentro de un saco bilobulado en el que se suspenden por fuera de la cavidad corporal, este saco es una invaginación subcutánea del peritoneo conocida como escroto. Esta disposición anatómica es necesaria en la medida en que la producción normal de espermatozoides requiere una temperatura de alrededor de 2°C inferior a la temperatura corporal interna (Ross *et al.*, 2013).

Los túbulos seminíferos integran la mayor parte de la masa testicular y en ellos se encuentran las células de Sertoli, las cuales son las más grandes y menos numerosas, su función es la nutrición, sustentación y control endocrino de las células germinales

(Galina y Valencia, 2006); también participan activamente en la liberación de los espermatozoides de la luz del tubo fagocitando el citoplasma. (, and Braves 2006)

La *rete testis*, es un conjunto de túbulos conectados entre sí, están ubicados en la parte central y superior del testículo, su función consiste en recoger los espermatozoides que provienen de los túbulos seminíferos a través de los túbulos rectos. Una vez colectados los espermatozoides en la *rete testis*, estos viajan a través de los conductos eferentes a la cabeza del epidídimo, todavía sin capacidad fecundante, la que adquirirán en su paso por el epidídimo, en donde tiene lugar el proceso de maduración (Galina y Valencia, 2006).

2.4.1. Espermatogénesis en ovinos

La espermatogénesis es un proceso complejo que se realiza en los túbulos seminíferos, en el proceso se desarrollan los espermatozoides con capacidad fertilizante del gameto femenino. El tiempo total de duración del proceso de espermatogénesis y espermiogénesis es de 64 días. Los espermatozoides testiculares todavía no son fecundadores y deben pasar por una fase de maduración en el epidídimo, durante la cual obtienen su capacidad fecundadora (Hafez, 2002).

Las fases de desarrollo espermático se dividen en dos partes: 1) la espermacitogenesis y 2) espermatogénesis. La primera consiste en una serie de divisiones mitóticas en las cuales la espermatogonia forma espermatides. En la segunda las espermatides sufren metamorfosis para formar al espermatozoide. Las espermatogonias son las células de menor tamaño, más abundantes y aparecen en diferentes etapas de maduración y se encuentran dentro de los túbulos. Fuera de los túbulos, en el espacio intersticial, se encuentran el tejido y fluido intersticial, compuestos por vasos sanguíneos, vasos linfáticos y células de Leydig. Al acercarse la pubertad, las espermatogonias empiezan a dividirse aceleradamente por mitosis, mientras que en el espacio intersticial las células mesenquimales también empiezan a diferenciarse y a dar origen a las células de Leydig (Galina y Valencia, 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se busca aumentar la capacidad reproductiva del macho ovino cubriendo de forma más eficiente sus requerimientos nutricionales a través del uso de complementos nutrimentales; recientemente se estudian los efectos de minerales orgánicos para determinar su potencial para aumentar el tamaño y masa de los testículos, evaluando los cambios histológicos en términos de la morfología y tamaño celular del tejido testicular del macho ovino joven, con la finalidad de comparar la capacidad de alterar de forma positiva el desarrollo testicular.

4. HIPÓTESIS

El suministro dietario de Zn y Cr de fuentes orgánicas (Zn-Met y Cr-Met) influye en el tamaño y desarrollo del tejido testicular de ovinos jóvenes en crecimiento y finalización bajo un sistema de alimentación intensiva.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto de la suplementación de zinc y cromo orgánicos sobre el desarrollo testicular de ovinos.

5.2. Objetivos particulares

- Medir *in situ*, post sacrificio, el peso y circunferencia individual de los testículos de ovinos complementados con Zn y Cr orgánicos en la dieta.
- Comparar el diámetro de los túbulos seminíferos y espesor del epitelio germinal del tejido testicular de ovinos jóvenes complementados con Zn y Cr orgánicos

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Material biológico

Un total de 30 ovinos en engorda con alimentación intensiva (Cuadro 1) alojados en corrales individuales de 2x1.5 m, en los cuales se evaluó el efecto del Zn y Cr orgánicos en el comportamiento productivo y calidad de canales, los cuales fueron sacrificados al final de la prueba de comportamiento, a partir de los cuales se colectaron muestras de aproximadamente 20 g del testículo izquierdo de cada ovino, para su evaluación histológica.

Otros materiales y equipo

- 30 muestras de testículos
- Dieta suministrada a los ovinos en engorda (Cuadro I)

- Minerales Zn y Cr orgánicos
- Corraletas con bebedero y comedero
- Tinciones
- Laminillas
- Microscopio óptico
- Software Captura
- Equipo de Cómputo Hp
- Solución de Bouin
- Micrótopo

Cuadro I. Ingredientes de la dieta suministrada y su composición química.	
Ingredientes	(g kg⁻¹ MS)
Rastrojo de maíz	152.0
Maíz molido	491.0
Pasta de soya	210.0
Canola	59.0
Salvado de trigo	50.0
Bicarbonato de sodio	13.0
Carbonato de calcio	3.0
Mezcla vitaminas-minerales ¹	22.0
<hr/>	
Composición química:	
Materia Seca (g kg ⁻¹)	926.2

Proteína Cruda (g kg ⁻¹ MS)	149.8
Fibra Detergente Neutro (g kg ⁻¹ MS)	337.1
Energía Metabolizable (MJ kg ⁻¹ MS)	11.83
Zinc (mg kg ⁻¹ MS)	14.86

¹Premezcla: micro minerales (mg kg⁻¹) I=0.3; Se=0.3; Co=0.09; Cu=10; Mn=4.0; Fe=5.0; macro minerales (%) S=0.09; P=0.10; Ca=0.45; Na=0.09; Cl=0.05;

6.2. Metodología

6.2.1. Tratamientos y evaluación de las muestras

El suministro de los minerales orgánicos, Cr (0.3 y 0.6 ppm) y Zn (80 ppm), fue diariamente, de forma individual, mezclado con el alimento servido por la mañana a las 09:00 am.

Una vez que la canal ovina fue expuesta se registró el peso en caliente y posteriormente se extrajeron ambos testículos, procediéndose a medir y pesar cada uno, y posteriormente se obtuvieron las muestras de tejido testicular, las cuales fueron colocadas inmediatamente en frascos de plástico con 50 mL de solución de Bouin, previamente preparada; de cada muestra se obtuvieron cuatro cuadrantes (A, B, C y D). A las muestras ya fijadas se les eliminó el fijador, posteriormente se deshidrataron en alcohol y se incluyeron en parafina (Paraplast, Merck) para realizar cortes con un

microtomo tipo Minot y luego ser teñidas con Hematoxilina-Eosina (HE) (Goodarzi et al., 2017).

En el Cuadro II se describen los tratamientos aplicados a los ovinos en fase de engorda, de los cuales se obtuvieron los testículos para realizar las mediciones, obtener las muestras y llevar a cabo el estudio histológico.

Cuadro II. Tratamientos que recibieron los ovinos durante la fase de engorda con alimentación intensiva.

Factor A (Cromo) Nivel (ppm)	Factor B (Zinc) Nivel (ppm)	Combinación; Tratamiento (Repetición)
0	0	T1 (n=5) 0.0 Cr; 0.0 Zn
	80	T2 (n=5) 0.0 Cr; 80.0 Zn
0.3	0	T3 (n=5) 0.3 Cr; 0.0 Zn
	80	T4 (n=5) 0.3 Cr; 80.0 Zn
0.6	0	T5 (n=5) 0.6 Cr; 0.0 Zn
	80	T6 (n=5) 0.6 Cr; 80.0 Zn

N=30 ovinos

6.3. Evaluación histológica

Se identificó la laminilla, de cada cuadrante (4 cortes por laminilla), se determinaron los diámetros y espesor de las células de Sertoli en el epitelio germinal de los túbulos seminíferos presentes en 10 campos proyectados en la pantalla de la cámara con los objetivos 10X y 40X (Kangawa *et al.*, 2016). Se registró la información y se elaboraron las bases de datos con las variables de respuesta correspondientes, según los objetivos expuestos.

6.3.1. Mediciones

Se tomó lectura de 60 laminillas que corresponden a los 30 testículos (5 repeticiones por tratamiento), se tomaran 5 campos por laminilla, de cada campo se localizaran 50 túbulos seminíferos, de los cuales, solamente fueron considerados aquellos que cumplieron con una forma redonda y que no fueron alterados en el proceso del corte de tejido; mediante un dispositivo táctil y la aplicación ZJView, que permite tomar medidas de estructuras microscópicas mediante una calibración en los diferentes lentes del microscopio (5x, 10x, 40x), se realizaron las mediciones de los diámetros, alturas (Razi *et al.*, 2010; Razi *et al.*, 2012) (Figura I). La Figura II muestra una imagen con un ejemplo de las herramientas presentes en la aplicación ZJView, integrada al dispositivo táctil de la cámara del microscopio, en la cual se pueden observar las dimensiones del diámetro de los túbulos seminíferos.

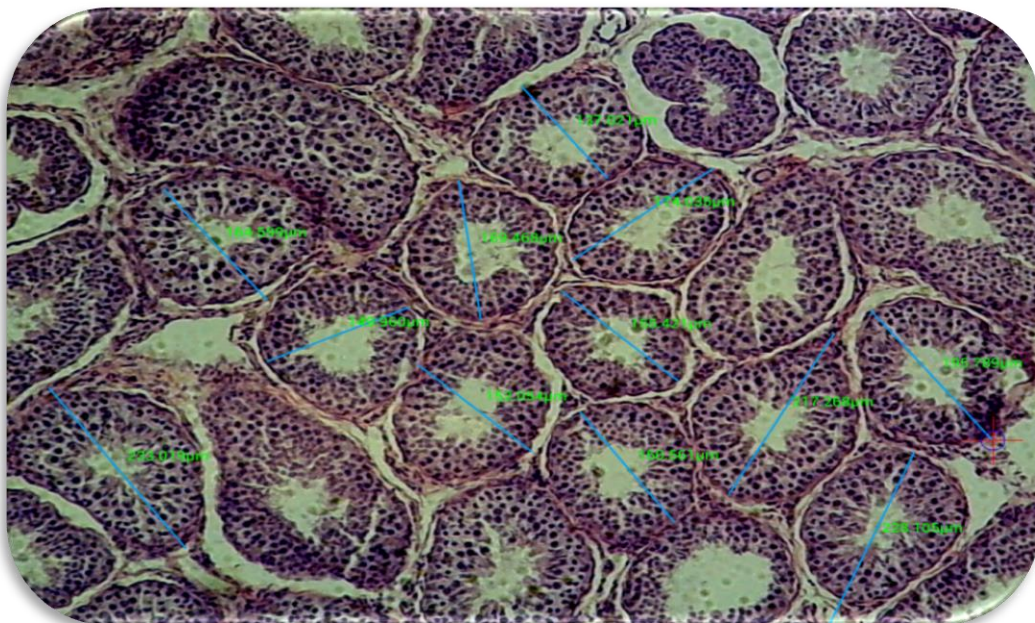


Figura II. Corte histológico de testículo de ovino: ejemplo de medición del diámetro de los túbulos seminíferos en la aplicación ZJView . (Ross *et al.*, 2013)

6.4. Análisis estadístico

Derivado de la evaluación del comportamiento productivo y características de las canales de los 36 ovinos, se colectaron los testículos izquierdos de 30 ovinos para el estudio histológico, bajo un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 3x2 (0, 0.3 y 0.6 ppm de Cr; y 0.0 y 80 ppm de Zn) de tratamientos, con 5 repeticiones por tratamiento (n=30). La información recabada fue procesada mediante un análisis de varianza usando el procedimiento GLM con apoyo del programa estadístico SAS/STAT, 2002. Los promedios de cada variable con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) fueron comparados con el método de Tukey.

7. LIMITE DE TIEMPO

La fase experimental de campo que comprenderá de septiembre 2017 a Diciembre 2017, siendo esta la prueba de respuesta productiva, la fase de faenado de los ovinos para evaluar las canales y colectar las muestras de testículos se realizará durante un período aproximado de un mes, y la fase de laboratorio para los estudios histológicos se realizará durante un período de seis meses.

Cronograma de actividades

Actividad	Mayo 2018	Junio a diciembre	Enero - diciembre	Febrero 2020	Marzo 2020

		2018	2019		
Evaluación histológica	X	X			
Registro de protocolo		X			
Evaluación y procesamiento de datos		X	X		
Revisión bibliográfica			X	X	
Conclusión de tesis					X

8. LIMITE DE ESPACIO

El presente trabajo se realizó, en su fase experimental de campo, en las instalaciones de la unidad docencia e investigación en producción animal, del Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México; asimismo, la matanza y faena de los ovinos, para obtener los testículos, se realizó en el obrador de carne ovina “Calpulli”, localizado en el municipio de Capulhuac, México.

La fase de laboratorio, para realizar la evaluación histológica de los testículos, se llevó a cabo en los laboratorios del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la misma institución.

9. RESULTADOS

En el Cuadro III se muestran los resultados del efecto de Zn y Cr orgánicos sobre el diámetro y peso de los testículos.

El análisis estadístico realizado a los datos no mostró efecto de Zn (0 vs 80 ppm) o de Cr (0 vs 0.3 y 0.6 ppm) orgánicos suplementados, o de su interacción (Zn X Cr), en las variables diámetro y peso testicular individual o total de los ovinos tratados.

Cuadro III. Efecto de los minerales zinc y cromo orgánicos suministrados en la dieta sobre el peso (g) y diámetro testicular (cm) de ovinos en engorda.

Variable	Zn (ppm)		EEM ¹	Cr (ppm)			EEM ¹	Efectos		
	0.0	80		0	0.3	0.6		Zn	Cr	ZnXCr
PVF,Kg	44.6	47.8	20.55	45.4	47.6	45.5	13.70	ns	Ns	ns
DTIzq.	15.8	16.0	0.478	16.3	15.5	15.8	0.318	ns	Ns	ns
DTDer.	15.9	15.8	0.527	16.2	15.5	16.0	0.351	ns	Ns	ns
PTIzq.	140.6	132.8	12.23	152.2	130.8	127.0	8.153	ns	Ns	ns
PTDer.	143.8	153.4	119.3	152.3	137.5	139.1	79.59	ns	Ns	ns
PTTot.	284.4	286.2	25.92	304.5	268.3	266.1	17.28	ns	Ns	ns
PTPV,%	0.637	0.598	0.035	0.670	0.563	0.584	0.011	ns	Ns	ns

EEM¹ = Error Estándar de la Media.

PVF= Peso vivo final, DTIzq.= Diámetro testículo izquierdo, DTDer.= Diámetro testículo derecho, PTIzq.= Peso testículo izquierdo, PTDer= Peso testículo derecho, PTTot.= Peso ambos testículos, PTPV= Peso testículos como porcentaje del peso vivo.

En el Cuadro IV se observa el efecto de los minerales zinc y cromo orgánicos suministrados sobre el diámetro de los túbulos seminíferos y espesor del epitelio germinal de tejido testicular de ovinos jóvenes.

Cuadro IV. Efecto de los minerales zinc y cromo orgánicos suministrados en la dieta sobre el diámetro de los túbulos seminíferos y espesor del epitelio germinal de ovinos en engorda.

Variable (μ m)	Zn (ppm)		EEM ¹	Cr (ppm)			EEM ¹	Efectos		
	0	80		0	0.3	0.6		Cr	Zn	ZnXCr
Diámetro	148.65	164.39	15.14	153.3	129.42	168.85	12.4	0.001	0.001	0.008
Espesor	43.59	50.32	4.97	45.05	47.43	48.59	4.05	0.001	0.001	0.001

EEM¹ = Error Estándar de la Media x

En el Cuadro V se muestra el efecto de los minerales zinc y cromo orgánicos suministrados en la dieta sobre el diámetro de los túbulos seminíferos y espesor del epitelio germinal de tejido testicular de ovinos jóvenes.

Cuadro V. Efecto de la interacción de los minerales zinc y cromo orgánicos suministrados en la dieta sobre el diámetro de los túbulos seminíferos y espesor del epitelio germinal de tejido testicular de ovinos jóvenes en engorda.

Variable (μm)	Zn (ppm)		EEM ¹	Cr (ppm)			EEM ¹	Efectos		
	0	80		0	0.3	0.6		Cr	Zn	ZnXCr
Diámetro	148.65	164.39	15.14	153.3	129.42	168.85	12.4	0.001	0	0.008
Espesor	43.59	50.32	4.97	45.05	47.43	48.59	4.05	0.001	0	0.001

En el Cuadro VI se muestran los resultados del efecto de la interacción de Zn con Cr orgánicos en el diámetro de los túbulos seminíferos y espesor del epitelio germinal del tejido testicular de ovinos jóvenes. Se observó efecto significativo de $p \leq 0.008$ en la interacción de estos minerales en el diámetro de los túbulos seminíferos y grosor de los epitelios germinales de los ovinos usados en el estudio.

Cuadro VI. Efecto de la interacción de los minerales Zn con Cr orgánicos suministrados en la dieta sobre el diámetro de los túbulos seminíferos y espesor del epitelio germinal de tejido testicular de ovinos jóvenes en engorda.

Variable (μm)	Cr (0 ppm)		Cr (0.3 ppm)		Cr (0.6 ppm)		EEM ¹	Pr \leq
	Zn 0	Zn 80	Zn 0	Zn 80	Zn 0	Zn 80		
Diámetro	143.58	162.87	144.14	154.69	158.36	179.34	8.74	0.008
Espesor	43.34	46.75	42.70	52.17	44.57	52.62	2.87	0.001

EEM¹ = Error Estándar de la Media.

En las Figuras III, IV, V y VI. Se observan las diferencias microscópicas en la relación diámetro de los túbulos seminíferos y espesor del epitelio germinal en el tejido testicular de ovinos de los tratamientos 1, 3, 4 y 5 en relación al análisis estadístico.

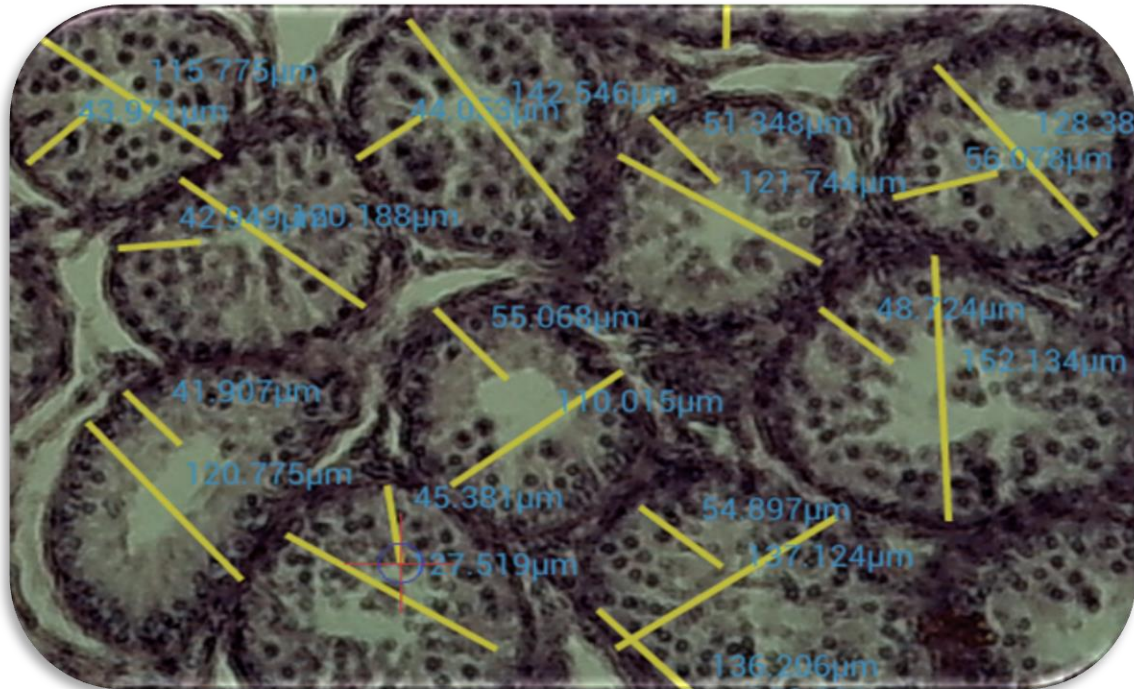


Figura III. Corte histológico de testículo de ovino: ejemplo de medición del diámetro de túbulos seminíferos y espesor de epitelio germinal en ovinos del tratamiento I (control).

En la Figura III los diámetros de los túbulos seminíferos del tratamiento I (ovinos grupo control) muestran las medidas bajo condiciones sin suministro de minerales cromo y zinc orgánicos; en la imagen se puede observar que los túbulos seminíferos presentan dimensiones uniformes; asimismo, se observan algunas células de Sertoli, y hay escasa presencia de espermatoцитos.

En la Figura IV se muestra una imagen del corte histológico de testículo de ovino del tratamiento III; se observa un aumento del diámetro de los túbulos seminíferos; cabe mencionar que estos túbulos presentan mayor engrosamiento de los epitelios germinales, por lo tanto, la luz de los túbulos está más estrecha, observándose mayor concentración de espermatogonias.

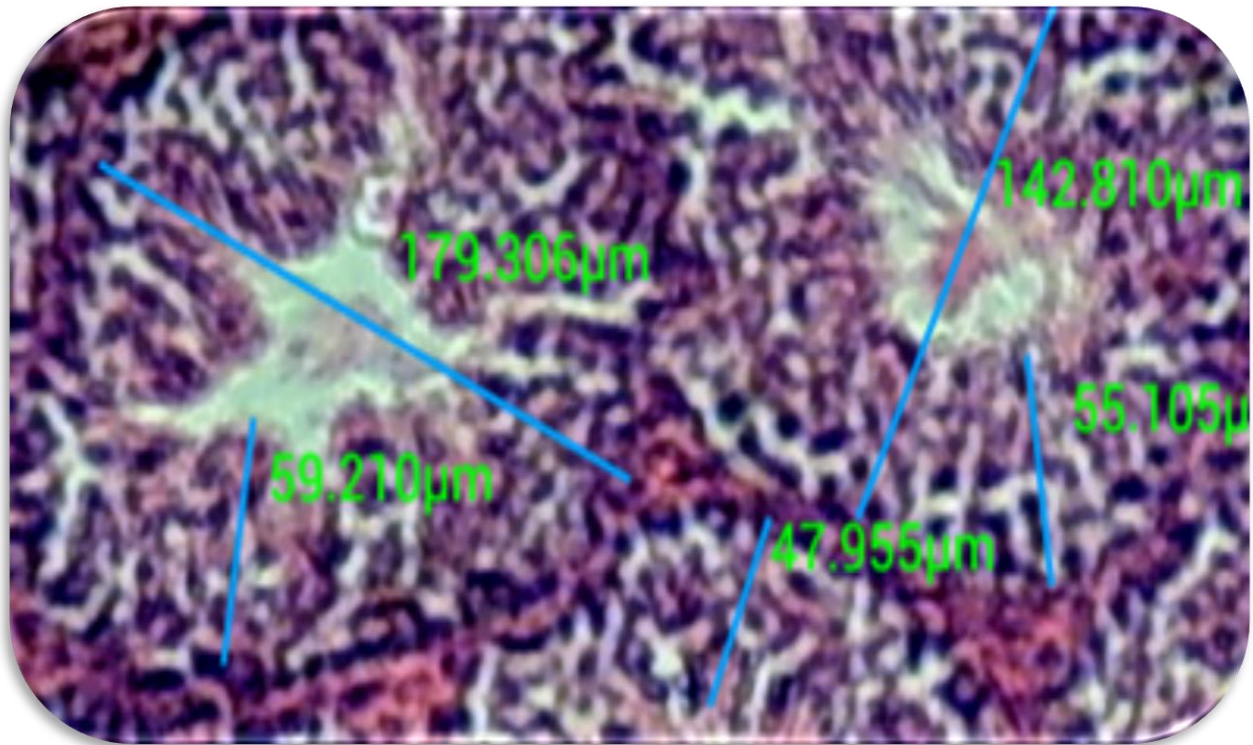


Figura IV. Corte histológico de testículo de ovino: ejemplo de medición del diámetro de túbulos seminíferos y espesor de epitelio germinal en ovinos del tratamiento III.

En la Figura V se muestra una imagen de corte histológico de testículo de ovinos del tratamiento IV; se puede apreciar que los túbulos seminíferos presentan mayor diámetro; en este grupo de laminillas se observó mayor variación en cuanto a tamaños, pero predominaron los túbulos con menor dimensión de la luz; también se observó mayor número de células de Sertoli, así como la presencia de espermatogonias y espermatozoides inmaduros.

En la Figura V, se presentan túbulos seminíferos con el tratamiento V: en este grupo se observó uniformidad de los tamaños en los túbulos mostrando mayor desarrollo del epitelio germinal, cabe mencionar que los diámetros abundaban entre los 160 y ≥ 180 μm .

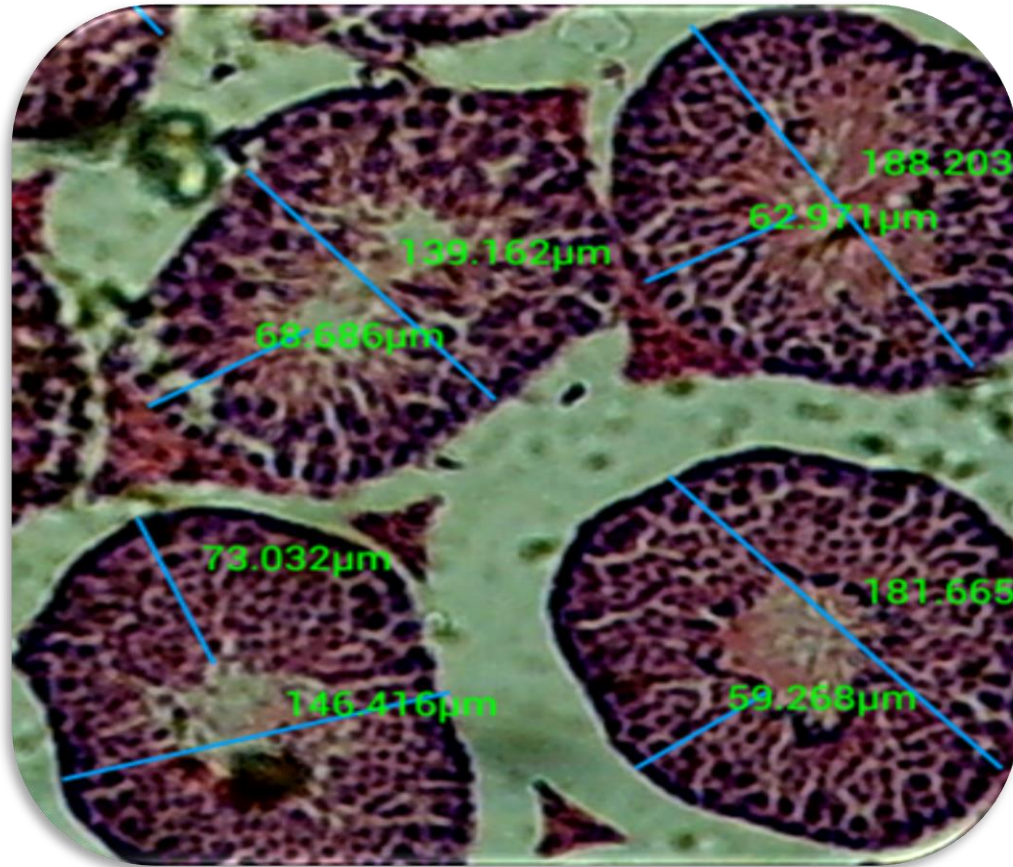


Figura V. Corte histológico de testículo de ovino: ejemplo de medición del diámetro de túbulos seminíferos y espesor de epitelio germinal en ovinos del tratamiento IV.

En la Figura VI. Gráfica del efecto de los tratamientos de (Cr) (Zn) en las mediciones de diámetro de Túbulo seminífero; se observa un incremento del tejido. Tomando en cuenta que el grupo control (Cr 0 Zn 0) mantiene un promedio de 143 μm y comparando los demás grupos con incrementos variables, siendo el (Cr 0.6, Zn 80) el más efectivo.

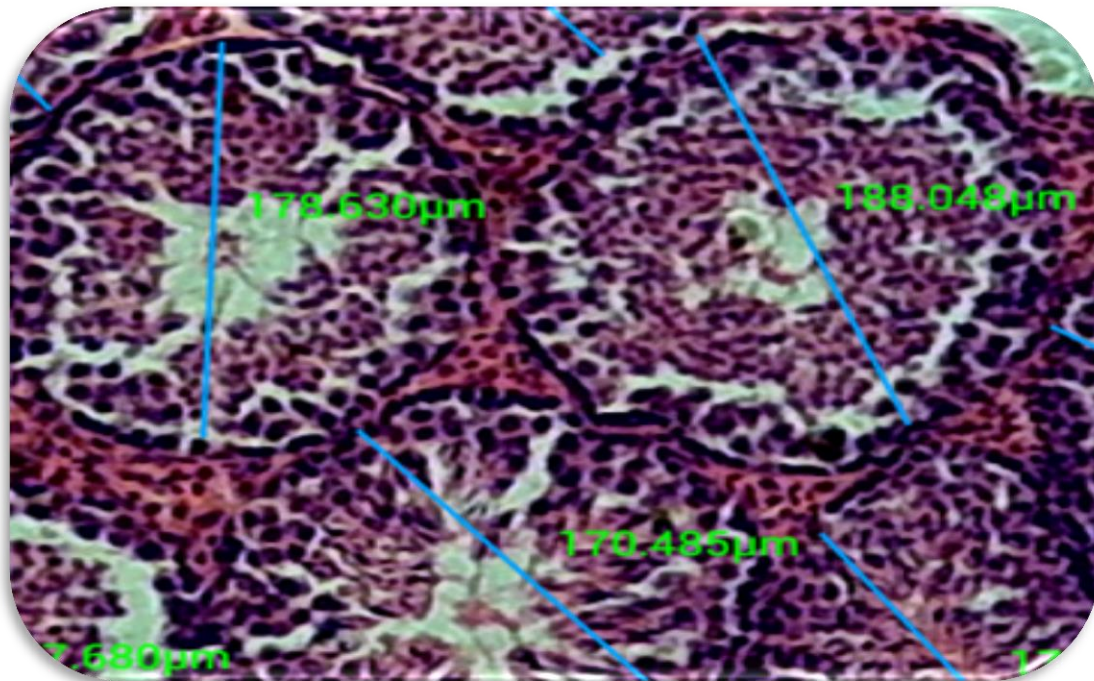


Figura VI. Corte histológico de testículo de ovino: ejemplo de medición del diámetro de túbulo seminífero y espesor de epitelio germinal en ovinos del tratamiento V.

En la Figura VII, se observa que en los tratamientos 3 (0.6 ppm de Cr), 4 (0 Cr+80 ppm Zn) y 6 (0.6 ppm Cr+80 ppm Zn) comparados con los tratamientos I (control), II (0.3 ppm Cr) y 5 (0.3 ppm Cr+80 ppm Zn), los túbulo seminífero tuvieron mayor diámetro; asimismo, en la Figura VIII, se observa que en los tratamientos 4 (0 ppm de Cr+80 ppm Zn), 5 (0.3 ppm Cr+80 ppm Zn) y 6 (0.6 ppm Cr+80 ppm Zn), comparados con los tratamientos I (control), II (0.3 ppm Cr sin Zn) y III (0.6 ppm Cr sin Zn), el espesor del epitelio germinal fue mayor.

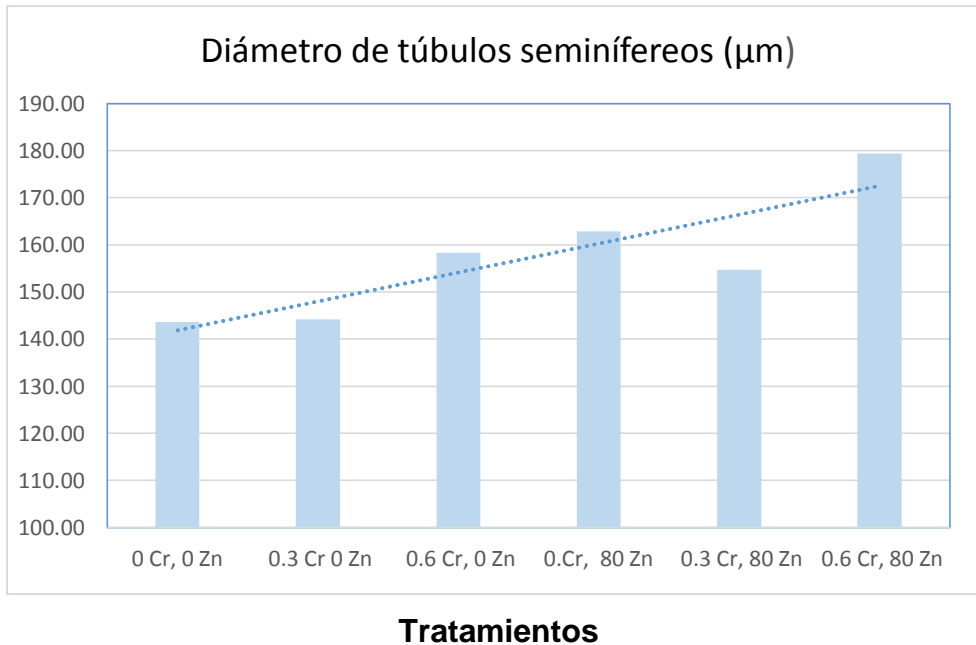


Figura VII. Gráfica que muestra el efecto de la interacción de los minerales Cr y Zn orgánicos sobre los diámetros de túbulos seminíferos de tejido testicular de ovinos jóvenes en engorda con alimentación intensiva.

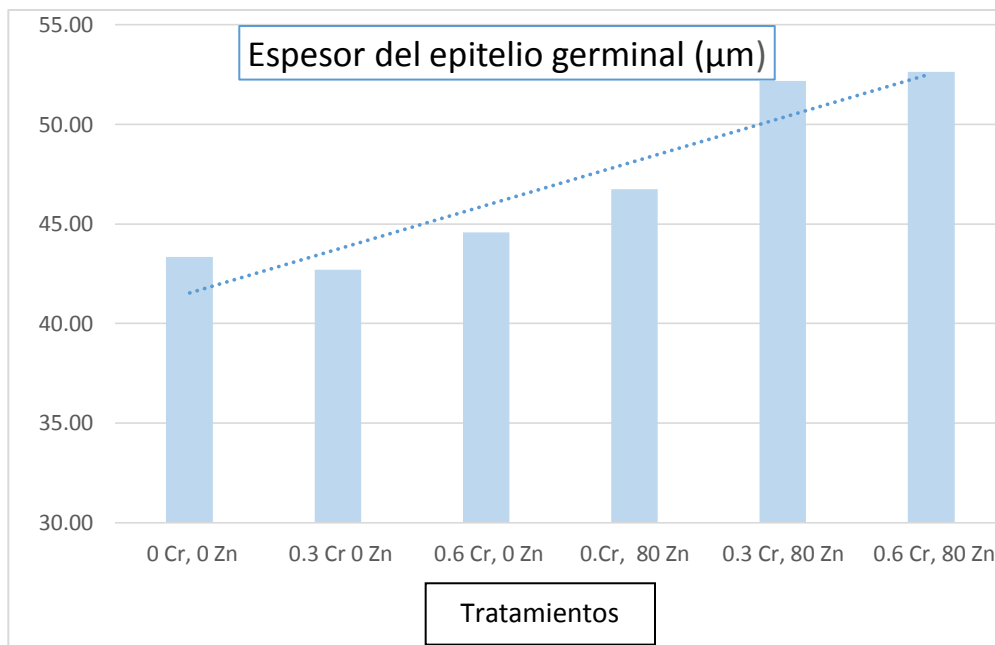


Figura VII. Gráfica que muestra el efecto de la interacción de los minerales Cr y Zn orgánicos sobre los diámetros de túbulos seminíferos de tejido testicular de ovinos jóvenes en engorda con alimentación intensiva.

10. DISCUSIÓN

El estudio realizado presentó como resultado diferencia en el diámetro de los túbulos seminíferos y en el espesor del epitelio germinal a nivel histológico ya que en el grupo control hay un valor promedio de los diámetros en los túbulos seminíferos de 143 μm y 42 μm en el espesor del epitelio germinal, los tratamientos de los ovinos suplementados con Cr y Zn presentaron diámetros mayores que variaron según la concentración de Cr y Zn.

En cuanto a las características morfométricas de los testículos, se pudo determinar que los tratamientos no tuvieron efecto sobre el peso y diámetro de éstos órganos; por lo tanto, se puede decir que el suministro complementario de Cr y Zn de fuentes orgánicas no tuvo efecto en el desarrollo de la masa testicular de los ovinos utilizados en este estudio. Está comprobado que la deficiencia de Zn puede producir hiporquidismo y desarrollo insuficiente de los caracteres sexuales secundarios en el macho prepuber (Underwood y Suttle, 1999; Endre *et al.*, 1990); y, por lo tanto, causar un desarrollo testicular lento con disminución del diámetro y atrofia de los túbulos seminíferos; como consecuencia puede haber retraso o falla en la espermatogénesis, como lo han demostrado (Endre *et al.*, 1990; Sharpe *et al.*, 2003; Ozturk *et al.*, 2003; Loera-Ortega, 2016; Goodarzi *et al.*, 2017) en humanos y machos rata, cerdos y ovinos.

Por otra parte, las células de Leydig (cL) o células esteroideogénicas, debido a que tienen capacidad de sintetizar y secretar esteroides, además de enzimas y péptidos, junto con las células de Sertoli (cS), son los mayores componentes endocrinos del testículo. Las cL ocupan 50% del compartimento intertubular testicular, por ello, son ampliamente conocidas por su función endocrina; debido a la participación del Zn en procesos de regeneración celular, afecta directamente el desarrollo de las células de Leyding (cL) (Piotrowska *et al.*, 2011; Khalaf *et al.*, 2014); además, debido a que están dispuestas alrededor de los vasos sanguíneos, esto facilita el paso de los esteroides a la circulación sanguínea (Campo, 2009).

Loera-Ortega (2016) observaron que en dietas con 25 ppm de Zn se redujo 28.5% el número de cL en testículos de cerdos prepúberes, y, en verracos jóvenes, se redujo 14.61% el número de cL. Asimismo, Khalaf *et al.* (2014) constataron que la deficiencia de Zn afecta el número de cL. De forma similar, Lunstra *et al.* (2003), en machos porcinos de 112 y 220 días de edad, encontraron valores de 24.04 a 57.48 cL/g de tejido testicular. Debido a que el estudio de Loera-Ortega (2016) solo consideró el conteo de cL ubicadas en el compartimento intertubular, los resultados son similares a los del estudio realizado por Costa *et al.* (2013), con valores de 12.9 ± 1.5 cL vs 14 a 20 cL en cerdos pre púberes.

La función de las cL es controlada por la acción de la hormona luteinizante (LH), secretada por la glándula hipófisis. Sin embargo, estudios indican que la hormona folículo estimulante (FSH), también es importante en el control y aumento de la función de estas células (Lunstra *et al.*, 1986; Almeida *et al.*, 2006; Chandrashekar y Bartke, 2007; Audet *et al.*, 2009).

Se ha indicado que el diámetro y masa testicular están relacionados con la producción de semen del macho ovino, sin embargo, en el presente estudio los minerales Zn y Cr orgánicos suministrados a ovinos jóvenes en las fases de crecimiento y finalización no aumentaron el tamaño y peso testicular (Loera-Ortega, 2016; Espitia-Pacheco, 2018).

Como parte de la proliferación celular, en el tejido testicular se producen cambios fisiológicos muy dinámicos, que incluyen la síntesis de andrógenos y estrógenos. Estos cambios, son coordinados por las células de Sertoli (cS), células de Leydig (cL) y células Germinales (cG). En los mamíferos, las células germinales, que forman parte del epitelio germinal, se asocian y tienen relación con diferentes tipos de células asociadas al túbulo seminífero (células peritubulares mioideas, células endoteliales y fibroblastos), las cuales están organizadas en tiempo y espacio (Lunstra *et al.*, 1986; França *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2006; Ford *et al.*, 2006; Leuan y Hughes, 2006).

Las células de Sertoli (cS) son esenciales en el desarrollo funcional testicular, proporcionan nutrientes y protección física para la proliferación de las células germinales y la expresión fenotípica masculina. En el desarrollo testicular inicial, las cS actúan en dos procesos: 1) en la formación de los testículos o diferenciación sexual y, 2) en la espermatogénesis (Mackay, 2000; McCoard *et al.*, 2001; Sharpe *et al.*, 2003; França *et al.*, 2005).

Entre otras, las funciones de las cS incluyen, regulación de genes, apoyo estructural y nutrición para el desarrollo de las cG, la compartimentación de los túbulos seminíferos (entorno de protección celular), fagocitosis de células degeneradas y cuerpos residuales, secreción de fluidos, proteínas y factores de crecimiento, liberación de espermátidas en la espermiación y la producción de una serie de proteínas que regulan y/o responden a la liberación de hormonas pituitarias que intervienen en la actividad mitótica de las espermatogonias, así como influir en la proliferación de las células de Leydig. Las cS son mediadores fundamentales de la acción de FSH y LH, estimuladas por la producción de testosterona, por el testículo y, probablemente, dependiente de la etapa de desarrollo (McCoard *et al.*, 2003; França *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2008).

En un estudio para evaluar el efecto de suplementar Zn (ZnO: 25, 50, 75 y 100 mg/kg MS) a dietas basales (27 mg Zn/kg MS) de codornices japonesas, registraron efectos tipo cuadrático, de la dosis en la ganancia de peso, conversión alimenticia y el peso relativo de los testículos (% de peso vivo) (Abbasi *et al.*, 2017); por lo tanto, estos autores sugieren que los bajos pesos testiculares de la codornices macho que recibieron la dieta deficiente en Zn (27 mg/kg MS) pueden estar relacionados con la disfunción gonadal.

El otro estudio, se suplemento Zn (orgánico) y Zn (inorgánico) en la dieta de corderos de 3 a 3.5 meses de edad, con dosis de 40 mg Zn/kg MS, por un periodo de 70 días, se encontró que hubo efectos en el incremento del diámetro y espesor de los túbulos seminíferos, en ambos grupos con Zn, en comparación con el grupo control ($P \leq 0.05$); por lo tanto el Zn mejoró el desarrollo de los túbulos seminíferos, tanto en altura de los epitelios como en la producción celular testicular, además, también hubo incremento

significativo en el peso testicular (Goodarzi *et al.*, 2017). La semejanza en la metodología usada en el presente estudio, así como los resultados similares que se obtuvieron en los trabajos antes mencionados, se puede afirmar que el Zn es indispensable en el desarrollo del tejido gonadal del macho ovino joven en la fase de crecimiento y finalización.

11. CONCLUSIONES

Los tratamientos con Cr y Zn no tuvieron efecto nutricional a corto tiempo sobre la circunferencia testicular y peso testicular, ni sobre la relación peso corporal/peso testicular; en contraste, los testículos de ovinos de los tratamientos con Zn y Cr tuvieron un efecto positivo en el diámetro de túbulos seminíferos ($p \leq 0.008$), así como en el espesor de los epitelios germinales ($p \leq 0.001$). Lo anterior confirma la importancia de los micro minerales, en este caso fuentes orgánicas de Zn y Cr, en la nutrición de ovina, en particular en sementales jóvenes, para el óptimo desempeño productivo y reproductivo durante su vida adulta.

La inclusión de concentraciones de Cr y Zn en la dieta de ovinos jóvenes, por arriba del requerimiento indicado por el NRC 2007, puede ser una opción viable para mejorar el potencial productivo y reproductivo de los futuros sementales ovinos adultos, así como para mejorar la calidad de semen fresco o congelado para venta, ya que en el presente estudio se observó que, mediante el suministro dietario de los minerales Cr y Zn orgánicos, se puede estimular prematuramente el desarrollo del tejido testicular de los ovinos machos jóvenes de la raza Suffolk.

12. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en el estudio permiten generar expectativas para que los tratamientos con Zn y Cr, aplicados durante un período de tiempo más prolongado, hasta la madurez biológica de los sementales ovinos, tengan efectos en el peso, masa y morfometría testicular, así como en el desarrollo histológico del mismo con impacto en las mediciones microscópicas de las variables como diámetros de túbulos seminíferos, espesor de epitelios germinales, desarrollo de células de Sertoli y células de Leyding.

Mediante estudios adicionales, planificados para desarrollarse a un mayor plazo, en ovinos jóvenes y adultos, reproductiva y sexualmente maduros, se pueden esperar efectos significativos, considerando edad adulta, apropiada sexualmente para su reproducción, lo que permitirá realizar las siguientes evaluaciones:

- Contar el número de Células de Sertoli (maduras) y espermatogonias en los túbulos seminíferos de los ovinos suplementados con diferentes niveles de Zn y Cr.
- Contar el número de células de Leydig por medio de técnicas de inmunohistoquímica, medir los niveles de testosterona y relacionarlo con el suministro de minerales.
- Realizar estudios de calidad de eyaculados de semen ovino y relacionarlos con los tratamientos de suministro de minerales.
- Realizar pruebas de viabilidad y fertilidad del semen fresco y congelado de ovinos tratados con distintas concentraciones de los minerales Cr y Zn.

13. LITERATURA CITADA

1. Abbasi, M., Dastar, B., Afzali, N., Shams, S.M., and Hashemi, S.R. 2017. Zinc Requirements of Japanese Quails (*Coturnix coturnix japonica*) by Assessing Dose- Evaluating Response of Zinc Oxide Nano-Particle Supplementation. Poultry Science Journal. 5 (2):131-143.
2. Almeida, F.L., Leal, M.C., França, L.R. 2006. Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). Biology of Reproduction. 75(5):792-799.
3. Anderson, R. A., J.H. Brantner, and M.M. Polansky. 1978. An improved assay for biologically active chromium. J. Agric. Food Chem. 26:1219-1211.
4. Anderson, R.A. 1986. Chromium metabolism and its role in disease processes in man. Clin. Physiol. Biochem. 4:31-43.
5. Anderson, R.A. 1987. Chromium. Pages 225-244 In Trace Elements in Human and Animal Nutrition. Ed. W. Mertz. Academic Press Inc., San Diego, CA.
6. Anderson, R.A., and A.S. Kozlovsky. 1985. Chromium intake, absorption, and excretion of subjects consuming self-selected diets. Am. J. Clin. Nutr. 41:1177-1183.
7. Anderson, R.A., and M.M. Polansky. 1981. Dietary chromium deficiency: effect on sperm count and fertility in rats. Biol. Trace Elem. Res. 3:1-8.
8. Anderson, R.A., N.A. Bryden, and M.M. Polansky. 1993. Form of chromium affects tissue chromium concentration. FASEB J. 7:A204-A209.
9. Anderson, R.A., N.A. Bryden, M.M. Polansky, and S. Reiser. 1990. Urinary chromium excretion and insulinogenic properties of carbohydrates. Am. J. Clin. Nutr. 51:864-868.

10. Apgar, J., and Fitzgerald, J.A. 1985. Effect on the ewe and lamb of low zinc intake throughout pregnancy. *Anim. Sc.* 60:1530-1538.
11. Audet, I., Bérubé, N., Bailey, J.L., Laforest, J.P., Quesnel, H., Matte, J.J. 2009. Effects of dietary vitamin supplementation and semen collection frequency on hormonal profile during ejaculation in the boar. *Theriogenology* 71(2):334-341.
12. Camara, F. and Amaro, C.A. 2003. Nutritional aspects of zinc availability. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 54:143-152.
13. Campo, M.L. 2009. Chapter: Apoptosis. Book *Apoptosis: Involvement of Oxidative Stress and Intracellular Ca²⁺ Homeostasis.* Springer eBook. Pp.17-55. Print ISBN 978-1-4020-9872-7.
14. Chandrashekar, V., and Bartke, A. 2007. Growth factors in Leydig cell function. *The Leydig cell in health and disease. Contemporary Endocrinology, 2007, IV,* 263277.
15. Chen, N.S.C., A. Tsai, and I.A. Dyer. 1973. Effect of chelating agents on chromium absorption in rats. *J. Nutr.* 103:1182-1186.
16. Chirase, N.K., Hutcheson, D.P., Thompson, G.B., Spears, J.W. 1994. Recovery rate and plasma zinc and copper concentrations of steer calves fed organic and inorganic zinc and manganese sources with or without injectable copper and challenged with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Anim. Sci.* 72:212-219.
17. Costa, D.S., Faria, F.J. Fernandes, C.A., Silva, J.C., and Auharek, S.A. 2013. Testis morphometry and kinetics of spermatogenesis in the feral pig (*Sus scrofa*). *Animal Reproduction Science.* 142(1):63-70.
18. De Loera-Ortega. 2016. Efecto de la fuente y nivel de zinc en el comportamiento productivo de machos no castrados (40-110 kg) y su relación con el comportamiento sexual. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. España. 257p.
19. Dowling, H. J., Offenbacher, E. G., & Pi-Sunyer, F. X. (1989). Absorption of inorganic, trivalent chromium from the vascularly perfused rat small intestine. *The Journal of nutrition,* 119(8), 1138-1145.

20. Endre, L., Beck, F.W.J., and Prasad, A.S. 1990. The role of zinc in human health. *The Journal of trace elements in experimental medicine*, 3:337-375.
21. Engelhardt, W.V., and Braves, G. (2006 *Fisiología Veterinaria*. 1ª Ed., Acribia, Zaragoza, España.
22. Espitia-Pacheco, A., Montes-Vergara, D., and Lara-Fuenmayor, D. 2018. Evaluación del desarrollo testicular y medidas morfométricas en ovinos de pelo colombiano. *Agronomía Mesoamericana*. 29(1):175-185.
23. Evans, G.W. 1989. The effect of chromium picolinate on insulin controlled parameters in humans. *Int. Biosocial Med. Res.* 11:163-171.
24. Evans, G.W., and L.K. Mayer. 1994. Life span is increased in rats supplemented with chromium-pipidine-carbonilate complex. *Adv. Sci. Res.* 1:19-22.
25. Evans, G.W., and T.D. Bowman. 1992. Chromium picolinate increases membrane fluidity and rate of internalization. *J. Inorg. Biochem.* 46:243-251.
26. Ford, J.J., McCoard, S.A., Wise, T.H., Lunstra, D.D., and Rohrer, G.A. 2006. Genetic variation in sperm production. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 62:99-112.
27. Formigari, A., and Irato, P. 2007. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. Volume 3.
28. França, L.R., Avelar, G.F., and Almeida, F.F. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*. 63(2):300-318.
29. França, L.R., Silva, Jr. V.A., Chiarini-Garcia, H., Garcia, S.K., and Debeljuk, L. 2000. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biology of Reproduction*. 63:1629-1636.
30. Galina, C. y Valencia, J. 2006. *Reproducción de Animales Domésticos*. 2ª Ed., Limusa, México, D.F.
31. Galina, C. y Valencia, J. 2014. Morfofisiología de los órganos genitales del macho y de la hembra. En: *Reproducción de animales domésticos*. Editorial LIMUSA, 3ª edición, México. 27-34.

32. Goodarzi, N., Nooriyan, M.E. and Rahimi, P.S.K. 2017. Testicular stereology of lambs supplemented with organic and inorganic zinc. *Bulg. J. Vet. Med.*
33. Haeussler, S., and Claus, R. 2007. Expression of the glucocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 in pig testes cells along fetal development. *Reproduction, Fertility and Development*. 19(5):664-669.
34. Hafez, E. 2002. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 7^a Ed., McGraw-Hill Interamericana, México, D.F.
35. Hambidge, K.M. 1974. Chromium nutrition in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 27:505-514.
36. Hänsch, R. and Mendel, R.R. 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current opinion in plant biology*, 12(3):259-266.
37. Hegsted, M., Hasten, D.L., Keenan, M.J. and Morris, G.S. 1997. Effects of various forms of dietary chromium on growth and body composition in the rat. *Nut. Res.* 17(2):283-294.
38. Hernández, A. 2006. Influence of the form and level of organic versus inorganic copper and zinc in diets for growing and finishing pigs. Thesis Master of Philosophy. Division of Health Sciences School of Veterinary and Biomedical Sciences. Murdoch University, Australia.
39. Irvine, D.S. 1996. Glutathione as a treatment for male infertility. *Rev. Reprod.* 1:12.
40. Jing, M.Y., Sun, J.Y., Weng, X.Y. 2007. Insights on zinc regulation of food intake and macronutrient selection. *Biol. Trace. Elem. Res.* 115(2):187-94.
41. Johnson, F.O., Gilbreath, E.T., Ogden, L., Graham, T.C., and Gorham, S. 2011. Reproductive and developmental toxicities of Zinc supplemented rats. *Reproductive Toxicology*. 31(2):134-143.
42. Johnson, L., Thompson Jr, D.L., and Varner, D.D. 2008. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Animal reproduction science*, 105(1-2):23-51.
43. Kandror, K.V. 1999. Insulin regulation of protein traffic in rat adipocyte cells. *J. Biol. Chem.* 274:250210-250217.

44. Kangawa, A., Otake, M., Enya, S., Yoshida, T., and Shibata, M. 2016. Histological development of male reproductive organs in mini pigs. *Tox. Path.* 44(8):1105-1022.
45. Khalaf, G., Fahmy, H.F., and Saleh, H.A. 2014. Effect of a zinc-free diet from weaning through puberty on the structure of the testis in albino rats, with a special focus on the Leydig cells. *Egyptian Journal of Histology.* 37(2):304-315.
46. Kheirandish, R., Askari, N., & Babaei, H. (2014). Zinc therapy improves deleterious effects of chronic copper administration on mice testes: histopathological evaluation. *Andrologia*, 46(2), 80-85.
47. Klasing, K.C., Goff, J.P., Greger, J.L. King, J.C., Lall, S.P., Lei, X.G., Linn, J.G., Nielsen, F.H., and Spears, J.W. 2005. *Mineral Tolerance of Animals*. 2nd ed. National Academics Press, Washington DC. ISBN: 0309096545. p.413-427. (Mineral tolerance of animals/Committee on Minerals and Toxic Substances, Board on Agriculture and Natural Resources, Division on Earth and Life Studies.- 2nd rev. ed.).
48. Kumar, P., Yadav, B. and S. Yadav. 2013. Effect of zinc and selenium supplementation on antioxidative status of seminal plasma and testosterone, T₄ and T₃ level in goat blood serum. *J. of Appl. Anim. Res.* 41:382-386.
49. Leuan, A., and Hughes, M.D. 2006. Chapter 16. The Testes: Disorders of Sexual Differentiation and Puberty in the Male. *Pediatric Endocrinology (3rd Edition)*. 662-685.
50. Loera-Ortega, Y.G. 2016. Efecto de la fuente y nivel de zinc en el comportamiento productivo de machos no castrados (40-110 kg) y su relación con el comportamiento sexual (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
51. Lunstra, D.D., Ford, J.J., Christenson, R.K., and Allrich, R.D. 1986. Changes in Leydig cell ultrastructure and function during pubertal development in the boar. *Biol Reprod.* 34(1):145-58.

52. Lunstra, D.D., Wise, T.H., and Ford, J.J. 2003. Sertoli cells in the boar testis: changes during development and compensatory hypertrophy after hemicastration at different ages. *Biology of Reproduction*. 68(1):140-150.
53. MacDonald, R.S. 2000. The role of zinc in growth and cell proliferation. *Journal of Nutrition*. 130:1500S-1508S.
54. Mackay, S. 2000. Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. 47-99.
55. Mahmoud, G.B. 2013. Sexual behaviour, testosterone concentration, semen characteristics and testes size of Ossimi rams as affected by age and scrotal circumference. *Egyptian J. Anim. Prod.* 50:53-58.
56. Maremanda, K.P., Khan, S., Jena, G. 2014. Zinc protects cyclophosphamide-induced testicular damage in rat: involvement of metallothionein, tesmin and Nrf2. *Biochemical and biophysical research communications*. 445(3):591-596.
57. Maret, W. 2006. Zinc coordination environments in proteins as redox sensors and signal transducers.
58. McCoard, S.A., Lunstra, D.D., Wise, T.H., and Ford, J.J. 2001. Specific staining of Sertoli cell nuclei and evaluation of Sertoli cell number and proliferative activity in Meishan and White Composite boars during the neonatal period. *Biology of Reproduction*. 64(2):689-695.
59. McCoard, S. A., Wise, T. H., Lunstra, D. D., & Ford, J. J. (2003). Stereological evaluation of Sertoli cell ontogeny during fetal and neonatal life in two diverse breeds of swine.
60. Mc Dowell, L.R. 1992. Minerals in animal and human nutrition. Academic Press. San Diego, CA, USA. 524p.
61. McDowell, LR. 1992. Minerals in animal and human nutrition. In: Pechin GH. (Eds.). *El Zinc en la Nutrición de los Rumiantes*. San Diego, California, USA: Academic Press. 50-79.
62. McDowell, L.R., and J.D. Arthington. 2005. *Minerales para Rumiantes en Pastoreo en Regiones Tropicales*. Cuarta ed. IFAS University of Florida.

63. McDowell, L.R., Conrad, J.H., and Hembry, F.G. 1993. *Minerales para rumiantes en pastoreo en regiones tropicales* 2da Ed. Dep. Zoot. Universidad de Florida Gainesville, USA.
64. Mertz, W. 1969. Chromium occurrence and function in biological systems. *Physiol. Rev.* 49:163-171.
65. Mertz, W. 1993. Chromium in human nutrition: a review. *J. Nutr.* 123:626-633.
66. Molokwu, C.O., and Li, Y.V. 2006. Zinc homeostasis and bone mineral density. *Ohio Res. Clin. Rev.* 15:7-15.
67. Mufarrege, D.J. 2002. *Producción Ciencia y Tecnología Agropecuaria.: Chaco Argentina.* Amanecer Rural. 17-18.
68. NRC, 1997. National Research Council. (1997). *The role of chromium in animal nutrition.* National Academies Press.
69. NRC. 2007. *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids.* The National Academies Press, Washington, D.C. 362p.
70. Offenbacher, E.G., H. Spencer, H.J. Dowling, and F.X. Pi-Sunier. 1986. Metabolic chromium balances in men. *Am. J. Clin. Nutr.* 44:77-82.
71. Oguntibeju, O.O., Esterhuyse, J.S., and Truter, E.J. 2009. Selenium: its potential role in male infertility. *Pak. J. Med. Sci.* 25:332-337.
72. Ozturk, A., Baltaci. A.K., Mogulkoc, R., Oztekin, E., Sivrikaya, A., Kurtoglu, and E., Kul, A. 2003. Effects of zinc deficiency and supplementation on malondialdehyde and glutathione levels in blood and tissues of rats performing swimming exercise. *Biological Trace Element Research.* 94(2):157-166.
73. Peralta-Torres, J.A., Cancino-Arroyo, G.R. y Aguilar-Cabrales, J.A. 2013. *Prácticas Reproducción Animal Aplicada.* Universidad Juárez Autónoma De Tabasco México.
74. Piotrowska, K., Baranowska-Bosiacka, I., Marchlewicz, M., Gutowska, I., Nocoń, I., Zawiślak, M., Chlubek, D., and Wiszniewska, B. 2011. Changes in male reproductive system and mineral metabolism induced by soy isoflavones administered to rats from prenatal life until sexual maturity. *Nutrition.* 27(3):372-379.

75. Press, R.I., J. Geller, and G.W. Evans. 1990. The effect of chromium on serum cholesterol and apolipoprotein fractions in human subjects. *West. J. Med.* 152:41-49.
76. Razi, M., Hasanzadeh, S., Najafi, G., Feizi, S., Moshtaghi, M., Janbaz, H., and Amin, M. 2010. Histological and anatomical study of the White Rooster: testis, epididymis and ductus deferens. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 4(4).
77. Razi, M., Najafi, G., Feyzi, S., Karimi, A., Shahmohamadloo, S., and Nejati, V. 2012. Histological and histochemical effects of Gly-phosate on testicular tissue and function. *Iranian journal of reproductive medicine*. 10(3):181.
78. Reséndiz, M., Bárcena J.R., Crosby, M.M., Cobos, M., Herrera, J.H., Hernández, P.A. y Carreón, L. 2012. Efecto del selenio y cromo orgánicos y *Saccharomyces cerevisiae* en la degradación *in situ* de la dieta, fermentación ruminal y crecimiento de borregos. Centro Universitario UAEM-Amecameca, Universidad Autónoma del Estado de México. México.
79. Roginski, E.E., and W. Mertz. 1967. An eye lesion in rats fed low-chromium diets. *J. Nutr.* 93:249-254.
80. Roginski, E.E., and W. Mertz. 1969. Effect of chromium III supplementation on glucose and amino acid metabolism in rats fed a low protein diet. *J. Nutr.* 97:525-533.
81. Ross, M.H., Kaye, G.I., and Pawlina, W. 2013. *Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular.* Editorial Médica Panamericana. (6ª Edición) Madrid., Sistema reproductor masculino
82. Schroeder, H. A., J.J. Balassa, and H.W. Vinton, Jr. 1965. Chromium, cadmium, and lead in rats: effects of life span, tumors, and tissue levels. *J. Nutr.* 86:51-62.
83. Schroeder, H.A. 1963. Chromium deficiency in rats: a syndrome simulating diabetes mellitus with retarded growth. *J. Nutr.* 88:439-444.
84. Schroeder, H.A. 1968. The role of chromium in mammalian nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 21:230-241.
85. Schroeder, H.A. 1969. Serum cholesterol and glucose levels in rats fed refined sugars and less refined sugars and chromium. *J. Nutr.* 97:237-242.
86. Schroeder, H.A., and J.J. Balassa. 1965. Influence of chromium, cadmium, and lead on rat aortic lipids and circulating cholesterol. *Am. J. Physiol.* 209:433-440.

87. Schwarz 1951. Production of dietary necrotic liver degeneration using American Torula yeast. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 11, 818–823.
88. Schwarz, K., and W. Mertz. 1957. A glucose tolerance factor and its differentiation from factor 3. *Arch. Biochem. Biophys.* 72:515-521.
89. Schwarz, K., and W. Mertz. 1959. Chromium (III) and the glucose tolerance factor. *Arch. Biochem. Biophys.* 85:292-295.
90. Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C., and Fisher, J.S. 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction.* 125(6):769-784.
91. Shimada, A. 2009. Nutrimientos inorgánicos. En: *Nutrición Animal*, 5^a ed., Shimada A. 198-204. Trillas, México.
92. Stoecker, B.J. 1996. Chromium. Pages 344-352. In: *Present Knowledge of Nutrition*. Eds. E. E. Ziegler and L. J. Filer, Jr. 7th ed., ILSI Press, Washington, DC.
93. Suttle, N.F. 2010. *Mineral nutrition of livestock*. 4th ed. Cabi. ISBN13: 978:1 845934729.
94. Underwood, E.J., and N.F. Suttle. 1999. *The Mineral Nutrition of Livestock*. 3rd ed. Ed. CABI, Midlothian, UK.
95. Urberg, M., M. Parent, D. Mill, and M. Zemel. 1986. Evidence for synergism between Cr and nicotinic acid in normalizing glucose tolerance. *Diabetes.* 35:37-43.
96. Vézina, D., F., Mauffette, K.D., Robert, and Bleau, G. 1996. Selenium vitamin E supplementation in infertile men effect on semen parameters and micronutrient levels and distribution. *Biol. Trace Element. Res.* 53:55-83.
97. Villanueva, C.G.J. 2011. *Nutrición del Ganado Zinc*, Sitio Argentino de Producción Animal. México.
98. Vincent, J. B. 2000. The biochemistry of chromium. *J. Nutr.* 130:715-718.
99. Waldron, K.J., Rutherford, J.C., Ford, D. and Robinson, N.J. 2009. Metalloproteins and metal sensing. *Nature.* 460:823-830.
100. Yomamoto, A., O. Wada, and H. Suzuki. 1988. Purification and properties of biologically active chromium complex from bovine colostrum. *J. Nutr.* 118:39-45.