



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOCENCIAS AGROALIMENTARIAS

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA COMPARAS (UCO)

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA (FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS) LUZ

TESIS DOCTORAL

**EFECTO DE LAS AFLATOXINAS
SOBRE ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y
MORFOLÓGICOS REPRODUCTIVOS EN
GALLOS (*Gallus gallus*) ASÍ COMO EL
EFECTO DETOXIFICADOR DE LA
VITAMINA C SOBRE LOS MISMOS**

Lourdes Pérez Arévalo

Córdoba Septiembre 2013

TITULO: *Efecto de las aflatoxinas sobre aspectos fisiológicos y morfológicos reproductivos en gallos (Gallus gallus) así como el efecto detoxificador de la vitamina C sobre los mismos*

AUTOR: *Lourdes Pérez Arévalo*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2014
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOCENCIAS
AGROALIMENTARIAS

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA COMPARAS (UCO)
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA (FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS) LUZ

TESIS DOCTORAL

**EFFECTO DE LAS AFLATOXINAS
SOBRE ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y
MORFOLÓGICOS REPRODUCTIVOS EN
GALLOS (*Gallus gallus*) ASÍ COMO EL
EFFECTO DETOXIFICADOR DE LA
VITAMINA C SOBRE LOS MISMOS**

Tesis Doctoral que presenta la Licenciada en
Veterinaria, **María Lourdes Pérez Arévalo**, para
optar al Grado de Doctor

25 Septiembre 2013

Vº. Bº.

Los Directores

Prof. Aniceto Méndez Sánchez

Prof. Miguel Angel Sierra Plana

ANICETO MÉNDEZ SÁNCHEZ y MIGUEL ANGEL SIERRA PLANA, profesores del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Universidad de Córdoba

INFORMAN:

Que la Tesis titulada “EFECTO DE LAS AFLATOXINAS SOBRE ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y MORFOLÓGICOS REPRODUCTIVOS EN GALLOS (*Gallus gallus*) ASÍ COMO EL EFECTO DETOXIFICADOR DE LA VITAMINA C SOBRE LOS MISMOS”, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria D^a. María Lourdes Pérez Arévalo, ha sido realizada bajo nuestra dirección y asesoramiento en el Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Universidad de Córdoba, y reúne las condiciones científicas necesarias para ser presentada ante el tribunal correspondiente con el fin de obtener el Grado de Doctora.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, firmamos el presente informe en Córdoba, a 25 de Septiembre de 2013.



Fdo. Aniceto Méndez Sánchez



Fdo. Miguel Angel Sierra Plana

INDICE

	Página
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- OBJETIVOS	7
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECIFICOS	9
3.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
3.1.- APARATO REPRODUCTOR DEL POLLO	15
3.2.- AFLATOXINAS	25
3.3.- ACIDO ASCÓRBICO	38
4.- MATERIAL Y MÉTODOS	45
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
5.1.-ANÁLISIS DE LA CALIDAD SEMINAL	67
5.2.-EVALUACIÓN MACROSCÓPICA	72
5.3.-EVALUACIÓN MICROSCÓPICA	78
6.- CONCLUSIONES	95
7.-RECOMENDACIONES	101
8.- RESUMEN	105
9.- SUMMARY	111
10.- AGRADECIMIENTOS	115
11.- BIBLIOGRAFÍA	119

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

Partiendo de investigaciones que prueban que la aflatoxina B₁ suministrada en el alimento a gallinas produce efectos adversos sobre la fertilidad y mortalidad embrionaria, se plantea el estudio de otras etapas vitales en la reproducción de esta especie como lo son los efectos producidos por esta toxina sobre los órganos reproductores de gallos, para así determinar cómo la mencionada toxina, influye sobre la fertilidad en gallos; así mismo, por ser éste un importante problema para la industria avícola, que involucra la proliferación y perpetuidad de la especie, se necesita el planteamiento de probables soluciones al mismo, como lo es el posible efecto detoxificador del ácido ascórbico sobre la aflatoxina B₁.

Una disminución de la fertilidad de gallos puede ser devastadora para la capacidad de producción del pollo de engorde, ya que un huevo infértil no solo representa la pérdida de un pollo, sino también significa un desperdicio en la productividad de la gallina, del trabajo humano y también ocupa un valioso espacio en la incubadora (McDaniel, C., 1996).

Recientemente la contaminación con micotoxinas en el ámbito animal ha comenzado a recibir más atención de parte de los legisladores y de los medios de comunicación; parece ser que aproximadamente el 25% de todos los productos alimenticios están contaminados con micotoxinas. Se estima que actualmente existen entre 300 y 400 tipos diferentes de micotoxinas, incluso se acepta que muchas micotoxinas aumentan el efecto de otras, lo que incrementa la toxicidad total, y como los niveles mínimos aceptables son determinados mediante la contaminación artificial con un solo tipo de micotoxina, se debe tener presente que la contaminación natural tendrá un impacto mucho más fuerte ya que a menudo habrá una combinación de toxinas (Eijk, C. 2003).

Las micotoxinas constituyen un grupo variado de sustancias químicas tóxicas elaboradas como metabolitos secundarios por los hongos toxigénicos que pueden causar detrimento de la salud del hombre y animales, y entre ellas encontramos a las aflatoxinas, las cuales son unas de las más importantes por ser altamente tóxicas y carcinogénicas; estas micotoxinas son producidas por hongos del género *Aspergillus* y se han identificados dieciocho diferentes aflatoxinas; sin embargo solo ocurren en forma natural las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, y G₂, las otras son productos metabólicos de su sistema microsomal, siendo la B₁ la más estudiada, de mayor toxicidad y ampliamente difundida (Leeson y col., 1995; Vaamonde, 1996).

Las aflatoxinas son las micotoxinas de mayor importancia económica y de prevalencia en la industria avícola, hallándose que las aves jóvenes son más susceptibles que las adultas y existiendo grandes diferencias de susceptibilidad entre especies, observándose que los patos son 10 veces más sensibles que los pollos. Por lo general la aflatoxicosis no produce mortalidad pero sí efectos económicos, siendo los más importantes la disminución del crecimiento, reducción del índice de conversión alimenticia y marcada reducción en la resistencia a infecciones (Jordan , F. y Pattison, M. 1998).

El ácido ascórbico o vitamina C juega un papel importante en varios procesos fisiológicos del cuerpo, incluyendo la detoxificación de diferentes compuestos tóxicos, habiéndose ya estudiado su efecto sobre las aflatoxinas en otras especies animales (Salem y col. 2001; Yousef y col. 2003).

Las aflatoxinas, además de afectar a la producción y salud animal tienen importancia desde el punto de vista de la salud pública, debido a su efecto carcinogénico, pudiendo el hombre estar expuesto a estas toxinas de manera directa por ingestión de granos, cereales o frutas contaminadas o indirectamente por la ingestión de carne, huevos o leche con toxinas o con residuos de las mismas.

Shuaib y col. (2010), realizaron una revisión de literaturas con el objeto de recaudar evidencias sobre el efecto de las aflatoxinas en la salud reproductiva humana; dichos autores encontraron que existía una alta concentración de aflatoxinas en el semen de un hombre infértil; asimismo describen 6 casos de asociación correlativa entre bajo peso al nacimiento y aflatoxinas, e igualmente citan que en un estudio se encontraron aflatoxinas en el suero de una madre, lo que se consideró como factor de riesgo en casos de ictericia en niños recién nacidos.

Introducción

OBJETIVOS

Objetivos

2.- OBJETIVOS

Objetivo general:

Partiendo de conocimientos previos sobre los graves efectos de las aflatoxinas, tanto sobre los órganos reproductivos como en otros órganos vitales, tales como hígado y riñones, y de estructuras de importancia inmunológica como bolsa de Fabricio y timo en aves, se pretende evaluar el efecto detoxificador del ácido ascórbico sobre la aflatoxina B₁ y de esta manera contribuir en la consecución de mejoras sanitarias, productivas y reproductivas de la industria avícola; en base a lo anteriormente expuesto, se plantea el siguiente objetivo general:

Evaluar el efecto de las aflatoxinas sobre aspectos fisiológicos y morfológicos reproductivos en gallos (*Gallus gallus*) así como el efecto detoxificador de la vitamina C sobre los mismos.

Objetivos específicos:

Con el fin de cumplir con el objetivo general arriba descrito se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la calidad del semen:
 - Ph seminal
 - Motilidad espermática
 - Vitalidad espermática
 - Morfoanomalías espermáticas

Objetivos

En los gallos que ingirieren alimento contaminado con aflatoxinas a dosis de 0,02mg/kg y 5 mg/kg con y sin suplementación de ácido ascórbico en proporción de 1g/lt.

2. Determinar:

Peso absoluto de testículos

Peso relativo de testículos

Área testicular

En los gallos que ingirieren alimento contaminado con aflatoxinas a dosis de 0,02mg/kg y 5 mg/kg con y sin suplementación de ácido ascórbico en proporción de 1g/lt.

3. Evaluar histológicamente la morfología testicular en relación a:

Contaje número de vacuolas en epitelio germinal

Número de túbulos seminíferos que presentaron descamación o del epitelio germinal.

Contaje de capas o estratos de células germinales por túbulo seminífero.

Área total de túbulo seminífero.

Área de luz del túbulo seminífero.

Área de células germinales.

Espacio intertubular.

En gallos que ingieren alimento contaminado con aflatoxinas a dosis de 0,02 mg/kg y 5 mg/kg con y sin suplementación de ácido ascórbico en proporción de 1g/lt.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

APARATO REPRODUCTOR DEL GALLO

Los testículos en el gallo (*Gallus gallus*) se encuentran dispuestos simétricamente a los lados de la línea media del celoma, ventrales a los riñones y su borde cóncavo se encuentra a los lados de la línea media; poseen forma de habichuela y su color varía del blanco amarillento (macho inmaduro) al blanco puro durante la actividad sexual. En el macho adulto y sexualmente activo, los testículos miden de 3,25 a 5,6 cm de largo y unos 2,5 cm de grosor (Bahr y Baks. 1989); el peso de cada testículo es de 25 a 35 g; normalmente el izquierdo es 0,5 a 3 g más pesado que el derecho, con una correlación positiva entre el peso del ave y el tamaño del testículo (Etehes, 1996; Rospigliosi y Figueroa, 2003). La superficie de los testículos está cubierta por la túnica albugínea muy fina; no existe septum, lobulaciones, ni capas mediastínicas, y están constituidos por miles de túbulos seminíferos, los cuales comienzan de una forma ciega y tortuosamente hacia la cara dorsomedial del órgano con anastomosis entre ellos (King, 1982; Bahr y Baks. 1989; Barnes, H. y col. 2008).

Los testículos se encuentran contenidos dentro de una fina capa de tejido conectivo, túnica albugínea, la cual no emite septum dentro del tejido testicular ni lo separa en lóbulos, como consecuencia el órgano es blando al tacto; aunque este tejido no está dividido en septum, existen unas finas capas de tejido conectivo que separan a los túbulos seminíferos. Numerosos vasos sanguíneos, capilares arteriales y pequeñas venas, se encuentran debajo de la túnica.

En el testículo existen dos principales tipos de tejidos: el epitelio seminífero, donde encontramos las células de Leydig, y el tejido intersticial. El

epitelio seminífero descansa sobre una membrana basal rodeada enteramente por una fina capa de tejido conectivo que contiene pocas fibras elásticas, los fibroblastos son finos y alargados; dentro de la membrana basal se observan múltiples capas de sucesivos estadios de espermatogénesis, desde la periferia al lumen se encuentran progresivamente las células germinales en diferentes estados de desarrollo: espermatogonias, espermatocito primario, espermatocito secundario, espermátida y finalmente espermatozoide maduro; dentro del epitelio se encuentran las células de soporte o células de Sertoli (Hadges, 1974).

Las células de Sertoli tienen la función de soporte y nutrición de las células germinales participando en la maduración de los espermatozoides, aunque el citoplasma de estas células no se reconoce fácilmente puede observarse como ramificaciones alrededor y entre las células germinales, en íntima relación con ellas y parte de estas células se encuentran cerca de la pared del túbulo seminífero con un núcleo basal, con un aparato de Golgi y numerosas mitocondrias; en cierto estado de desarrollo se encuentra la espermatide, célula que comienza a alongarse hacia la luz del túbulo (Hadges, 1974).

Las células de Sertoli son altas, estrechas, están dispuestas radialmente y asientan en la membrana basal mediante una delgada placa pedia, ensanchada y portadora del núcleo; en tanto que su extremo libre y lobuliforme alcanza la luz del conductillo; los intersticios que median entre ellas los ocupan las células germinales, las cuales en ciertas fases, penetran en las prolongaciones citoplasmáticas de las células con pie. Estas últimas están unidas de modo sincitial por sus placas pedias. Las células de Sertoli se caracterizan por tener un núcleo basilar vesiculoso, claro, pobre en cromatina y con nucleolo bien visible; nunca presenta fenómenos de división y el citoplasma contiene con frecuencia gotas cristalinas (Piebiger, T. 1942).

Las espermatogonias que componen el estrato externo y tienen forma redondeada difieren de las células de Sertoli por su núcleo esférico, rico en

cromatina, oscuro y a menudo en estado de mitosis. Lo mismo sucede con los núcleos grandes, oscuros y ricos en cromatina de los espermatocitos, los cuales contienen 1 ó 2 nucleolos y un corpúsculo intranuclear lenticular y poco coloreable, junto a la envoltura nuclear. En el citoplasma de las pequeñas espermátidas, cuyo núcleo claro carece de corpúsculo intranuclear y de nucleólo se advierten una o varias esferillas basófilas muy coloreables que son los corpúsculos accesorios cromatoides. Las células germinales poseen un espermiocentro llamado también idiozoma, que es una esfera con dos centrosomas que realiza una importante función tanto en las divisiones celulares como en el curso de la transformación de las espermátides en espermatozoides (Piebiger, 1942).

En testículos de aves de un día de edad, a las 6 semanas las células de Sertoli son el tipo celular más abundante, pero a las 28 semanas de edad, las células germinales son las más abundantes junto con una hipertrofia de las células de Sertoli (González-Morán y Soria-Castro, 2010a)

Las espermatogonias se encuentran en la membrana basal del epitelio seminífero con un núcleo pálido y ovoide, el espermatocito primario diferenciado de los contiguos con el aspecto apical de las espermatogonias formado por una capa concéntrica irregular interna y tiene un gran núcleo ovoide prominente con la cromatina densamente distribuida sobre la membrana nuclear interna. Los espermatocitos secundarios tienen un pequeño núcleo y se encuentran más cerca del lumen y las células espermáticas, redondas y alargadas, son la capa celular más interna del epitelio seminífero. El núcleo de las espermátides redondas es pequeño y esférico y contiene varios nucléolos.

Las células espermáticas elongadas eventualmente darán lugar a los espermatozoides maduros los cuales después de la espermiación están libres dentro del lumen de los túbulos seminíferos. En aves adultas (el núcleo), de las células de Sertoli está localizadas a la misma distancia encima de la base de la célula con un núcleo pálido de forma irregular y con una o más hendiduras intranucleares y por tanto los nucléolos aparecen como masas prominentes (González-Morán y Soria-Castro, 2010^a; Tiba y col, 1993).

El tejido intersticial en el ave adulta está reducido y consiste en poco tejido conectivo disperso, fibroblastos alongados, vasos sanguíneos de varios tamaños, fibras nerviosas y células intersticiales endocrinas de Leydig, que producen andrógenos testiculares; la forma de las células intersticiales endocrinas es altamente variable, polimórficas con núcleos esféricos y retículo endoplasmático liso; en sus membranas se encuentran las enzimas necesarias para la síntesis de esteroides; las mitocondrias presentes poseen crestas tubulares y están implicadas en el primer paso para la producción hormonal esteroidea, es decir, la transformación del colesterol a pregnenolona; los complejos de Golgi son relativamente pequeños y no participan en la secreción de andrógenos; la liberación de andrógenos a partir de las células intersticiales no se aprecia morfológicamente (Kart-Heinz y Dieter, 1994).

El intersticio testicular aviar es similar al del humano y el gato en la posesión de un componente de miofibroblastos de varias capas, y a la del roedor en la posesión de un pequeño número de células de Leydig, así como en la localización de los vasos linfáticos. Así, el pájaro combina características de la variable intersticio encontrado en los mamíferos (Aire, 1997).

Estas aves al alcanzar las 28 semanas de edad muestran una dramática reducción del tejido intersticial con pocas células de Leydig alrededor de los espacios linfáticos y vasos sanguíneos y se muestran de forma alargada con un núcleo fusiforme y citoplasma grande con pocas y pequeñas gotas lipídicas y son las principales fuentes de andrógenos (González-Morán y Soria-Castro, 2010 b; Hedges, 1974).

Los espermatozoos de las aves domésticas son muy diferentes a los de los mamíferos; son vermiformes con una cabeza larga en forma de lanza y ligeramente curva y están compuestos por una cabeza ligeramente curva y una cola compuesta por un cuello, parte media y pieza principal. La cabeza consta de un acrosoma y un núcleo; el acrosoma en forma de cono contiene material homogéneo envuelto en una membrana acrosómica continua y el núcleo consta de gránulos de cromatina condensada y está envuelto por una

membrana nuclear. La región del cuello une a la cabeza con el segmento de la cola y está formada por un complejo centriolar. El axonema, componente motor de la cola, se origina del centriolo distal. Alrededor del complejo centriolar están cerca de 30 mitocondrias, las cuales forman la pieza media. El anulus, un anillo denso, marca el límite distal de la pieza media y el límite proximal de la pieza principal; esta última no tiene vaina fibrosa (Hedges, 1974; Bahr y Bakst, 1989). Presentan un ancho máximo de 0,6 μm y una longitud que va de 75 a 90 μm . La densidad media de estas células es de unos 3,5 millones de espermatozoides por milímetro cúbico de semen y el volumen de eyaculado es de 0,2 a 0,5 ml, 60 a 80% de espermatozoides móviles y 85 a 90% de espermatozoides normales (Froman y col. 2000; King 1982; Garner 2002).

Los espermatozoos se presentan con sus colas proyectándose en la luz y sus cabezas unidas a las células de Sertoli; cuando las espermatidas están maduras se desprenden de las células de Sertoli y pasan hacia el conducto abierto.

El esperma testicular pasa de los túbulos seminíferos a una serie de pequeños conductos que se comunican entre sí y después son transportados al conducto del epidídimo; el conjunto de estos conductos también es denominado región del epidídimo, el cual abre en el conducto deferente, sitio primario de almacenamiento de espermatozoides en el gallo (Barh y Bakst, 1989).

El epidídimo está formado por un conjunto de conductos eferentes y conductos conectores; se puede decir que es una estructura alargada unida casi a la totalidad del borde dorsomedial del testículo asociado al hilio del testículo; no presenta la forma espiral y con subdivisiones característico de la mayor parte de los mamíferos y su extremo caudal continua con el conducto deferente sinusal (King, 1982; Barh y Bakst, 1989, Froman, y col. 2000).

El conducto deferente es un tubo muy contorneado que en su extremo distal se dilata ligeramente, discurren en forma de zigzag con una longitud aproximada de 10 cm, van paralelos a la línea media y entran en la pared en la

cloaca (urodeum) y su abertura final es a través de una corta papila inmediatamente ventral a la abertura de los uréteres.

La anatomía de los conductos excretores (zona del epidídimo y conductos deferentes) han sido estudiados ampliamente, no así sus funciones, sin embargo se conoce que los espermatozoides adquieren proteínas secretadas durante su pasaje a través de éstos conductos (Aire, 2002). En las aves, más del 70% de los ductos deferentes se encuentran en la región del epidídimo, sugiriendo ésto que el epidídimo es la porción de los ductos seminíferos de mayor importancia; el epitelio de los ductos deferentes esta fuertemente plegado para así incrementar el área de superficie del lumen del ducto y consiste en un epitelio con células ciliadas y no ciliadas; la principal función de estos ductos es la reabsorción de fluidos, transporte y concentración de espermatozoides, fagocitosis y la secreción de proteínas; en pollos se ha asociado a una subfertilidad hereditaria con malformación de los ductos deferentes y también se ha observado la formación de piedras de calcio en los ductos deferentes en diversas poblaciones de pollos que resultan en una reducción de la fertilidad, (Janssen y col, 2000). Aire (2000), observó que segmentos específicos del sistema de ductos deferentes identifican ciertos espermatozoides para su eliminación desde la luz del ducto.

El principal sitio de almacenamiento de espermatozoides es en los conductos deferentes; el aparato copulador está formado por las papilas de los conductos deferentes, los cuerpos vasculares y los pliegues linfáticos pares (King, 1982).

La secuencia de eventos en el desarrollo del espermatozoide desde la espermatogonia se llama espermatogénesis y se divide en tres fases:

- 1.- Espermatocitogénesis, proceso en el cual una espermatogonia madura pasa a espermatocito.
- 2.- Meiosis, división natural de los espermatocitos que da lugar a espermátides con un número reducido (haploide) de cromosomas y
- 3.- Espermiogénesis, proceso de transformación de las espermátidas en espermatozoide (kart-Heinz y Dieter, 1994).

Esta secuencia programada de pasos involucra tipos de células específicas (espermatogonia, espermatoцитos y espermátides) que persisten por periodos que van de minutos a días; es un proceso complejo de proliferación celular, reducción haploide del genoma nuclear y diferenciación celular, y en aves galliformes se ha descrito a partir de estudios realizados con la codorniz japonesa y se calcula la duración de la espermatogénesis en ésta codorniz en 12,8 días. Se ha calculado que la eficiencia de la espermatogénesis en el gallo es de 80 a 120 x 10⁶ de espermatozoides por gramo de testículo por día; en aves la espermatogénesis ocurre a temperatura central del cuerpo (40-41°C) (Froman y col., 2000).

Las gonadotropinas y esteroides gonadales son esenciales para la espermatogénesis en gallos, aunque se ha cuestionado el papel directo de la testosterona en la regulación del epitelio seminífero debido a la ausencia de inmunoreactividad semejante a receptores de andrógenos dentro del túbulo seminífero. La espermatogénesis culmina con la liberación de espermatozoides inmóviles del epitelio seminífero, de allí son llevados por una corriente de líquido de los túmulos seminíferos que fluye por la luz de éstos hacia los conductos excretores de los testículos, formándose un semen viscoso debido a la absorción de esa fracción líquida de los túbulos seminíferos a nivel de los conductos excretores y donde los espermatozoides adquieren la habilidad de volverse mótils (Froman y col. 2000, Martínez-Moreno y col, 2011).

No existe ninguna estructura homóloga a la próstata, vesículas seminales o glándulas bulbouretrales (Froman y col. 2000; King 1982).

La habilidad de fertilizar del semen puede ser medida por la motilidad, y evaluación morfológica de espermatozoides vivos y muertos, aunque el objetivo de la valoración del semen es predecir la capacidad fertilizante de las células espermáticas; los controles que se utilizan normalmente sobre la morfología y actividad metabólica no guardan una estrecha relación con su capacidad fertilizante. La evaluación más simple de la calidad del semen es su color, el cual debe ser de color blanco perla y la aparición de otro color es indicativo de

la presencia de algún contaminante (Etehes, R. J. 1996; Tabatabaei y col, 2009).

La motilidad espermática es la forma más común de valorar el semen al microscopio; normalmente la motilidad es valorada según una escala de 1 a 5 ó de 1 a 10, donde el valor menor corresponde al semen con menor motilidad y el valor superior al que sea más móvil. En general el semen con poca movilidad es muy poco probable que posea buena fertilidad, aunque semen con buena motilidad, necesariamente, no es signo definitivo de óptima capacidad fecundante.

El volumen de semen eyaculado es importante por cuanto se precisa para calcular la dilución adecuada para inseminación artificial, la cantidad de semen producida por las aves es pequeña (0,2 a 0,35 ml), la cantidad de volumen eyaculado no es negativa ni positiva desde el punto de vista de su capacidad fecundante. La integridad de la membrana que rodea a la célula espermática puede ser estimada por varios métodos para obtener la relación entre células vivas y células muertas en el eyaculado. Como la lesión de la membrana conduce a la muerte de la célula, la tinción vivo-muerto se puede hacer con algún colorante habitual que penetrara a las células que tengan lesión en la membrana; las mezclas de eosina y nigrosina producen una buena discriminación; la eosina tiñe a las células lesionadas de color rosa mientras que las vivas permanecen incoloras contra un fondo negro o azul (Etehes, R. J. 1996; Peralta y col. 2003).

La fecundidad en los gallos, comienza una fuerte caída al cumplir el primer año de vida, y la misma, está relacionada con cambios en las células de Sertoli, que impiden la liberación normal de los espermatozoides, lo que resulta en la disminución de la concentración de espermatozoides. Parámetros como la degeneración de los epitelios seminíferos y el incremento de anomalías espermatozoides, juegan un papel importantes en la disminución de la fertilidad por envejecimiento (Rosenstrauch y col. 1994).

Según Barnes y col (2008), anatomopatológicamente las lesiones testiculares pueden ser clasificadas en degenerativas, inflamatoria y neoplásicas:

La degeneración (atrofia) testicular se caracteriza por una disminución en el tamaño de los testículos y de color amarillento; microscópicamente los túbulos seminíferos disminuyen de tamaño y se incrementa el tejido intersticial; si avanza la lesión se presenta una fibrosis intersticial y el epitelio germinal de los túbulos seminíferos se observa desorganizado, las columnas espermatogénicas no son evidentes, existe descamación degeneración y necrosis de células espermatogénicas con presencia de macrófagos, células gigantes con pignosis y en casos muy severos, las células son removidas encontrándose solo la membrana basal. Esta degeneración puede ser producida por varias causas, entre ellas una involución estacional normal, infecciones crónicas, condiciones medioambientales adversas, malnutrición, deficiencias de vitamina E y actuación de tóxicos como el cadmio, selenio, herbicidas, insecticidas y micotoxinas; en estos últimos casos es posible que la degeneración testicular sea causada por el efecto sistémico de la toxina y no como efecto directo de la toxina (Barnes y col 2008; Crespo y Shivaprasad, 2010).

Inflamación, orquitis bacteriana intratubular ocurre esporádicamente en machos adultos donde uno o ambos testículos pueden estar afectados y se observan agrandados, decolorados y con forma irregular; necrosis extensiva de los túbulos seminíferos y exudación se presenta al corte de su superficie. *Salmonella*, *E. coli*, *Pasteurella* y *Staphylococcus* son reconocidas como causales de orquitis bacteriana en aves. Microscópicamente la estructura tubular del testículo está preservada pero con extensa necrosis del epitelio seminífero con infiltración fibrinoheterofila de los túbulos afectados e intersticio adyacente; macrófagos, células gigantes y colonias bacterianas son abundantes. Orquitis granulomatosa puede ser causada por mycobacterias.

Neoplasias, tumores en testículos son poco comunes, sin embargo neoplasmas pueden ser observados en enfermedad de Marek, Leucosis

Linfoide, Leucosis Mieloide, seminomas, teratomas, tumores de células de Sertoli y tumores de células intersticiales. Neoplasias causadas por enfermedad de Marek, Leucosis Linfoide y Leucosis Mieloide pueden ser reconocidas por infiltrado intersticial de linfocitos pleomórficos, linfoblastos y granulocitos; los túbulos seminales usualmente están intactos pero con atrofia por compresión. Seminomas y teratomas se presentan en el epitelio del túbulo seminal y son clasificados como tumores de células germinales, típicamente ellos son benignos pero metástasis en otros órganos han sido descritos, usualmente son unilaterales (Barnes, y col. 2008).

Las características ultraestructurales de las células de Leydig de las aves de corral consisten en una célula de transición alargada, bien desarrollada con similitudes a los de la codorniz y mamíferos. Retículo endoplasmático rugoso y liso con gotas de lípidos y mitocondrias que poseen una serie de células poligonales que poseen mitocondrias con crestas tubulares (Rothwell 1973).

La rete testis en las aves de corral fueron estudiadas histológicamente con microscopio electrónico de transmisión; las aves tienen células epiteliales escamosas que varían entre altas y cúbicas y el contorno de las células varía de poligonal a alargada; microvellosidades cortas se concentraron en los bordes de las células. Características ultraestructurales la sugieren sólo secretora moderada. La rete testis de las aves está ampliamente irrigada; también presentan numerosos vasos linfáticos y nervios. Linfocitos intraepiteliales forman parte del epitelio de la rete testis y los macrófagos están presentes en grandes cantidades en la luz (Aire, 1982).

Los distintos canales de los epidídimos en aves de corral (*Gallus gallus*) fueron estudiados por Aire y Josling (2000) a nivel de microscopía electrónica de barrido y transmisión. La superficie epitelial de la rete testis era regular y cada célula presenta un único cilio, así como numerosas, o en algunas partes, muy pocas, microvellosidades cortas y regulares. Cada uno de los tipos I y II de las células no ciliadas de los conductos proximales y eferentes muestran

abundantes microvellosidades, moderadamente largas y regulares, y un cilio solitario; las células ciliadas exhiben mechones de cilios.

El Tipo III de células no ciliadas, los conductos de conexión y del epidídimo exhibió numerosas microvellosidades que eran intermedio en longitud entre los de la rete testis y las de los conductos eferentes. Secreción apocrina no parece ocurrir en el epidídimo de estas aves (Aire y Josling, 2000).

AFLATOXINAS

Las aflatoxinas son metabolitos fungales altamente tóxicos y carcinogénicos producidos por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Golbdlatt, 1969; Giambone y col., 1985; Harvey y col., 1993; Vaamonde, 1996; Qureshi y col., 1998). Casi todos los granos o alimentos para aves domésticas favorecen el crecimiento de estos hongos y de sus toxinas, teniendo mayor riesgo de contaminación el maíz y el maní. No todas las cepas del hongo *Aspergillus* son capaces de producir aflatoxinas e inclusive se encuentran diferencias en la cantidad producida entre cepas aflatoxigénicas (Medina y col., 1998).

El género *Aspergillus* agrupa alrededor de 180 especies, en general muy ubicuas, encontrándose en gran cantidad de sustratos tales como suelo, aire y alimentos. No tienen unas necesidades nutritivas específicas y por ello crecen en medios comunes como Sabouraud y el agar extracto de malta, las colonias son de crecimiento rápido, de apariencia aterciopelada y cuando maduran adquieren un color blanquecino, amarillo, verde azul o negro. La aspergilosis puede afectar varias especies de mamíferos vertebrados y al ser humano siendo las aves las más sensibles; la manifestación principal es la aspergilosis pulmonar, aunque también pueden provocar procesos alérgicos y micotoxicosis (Vadillo y col. 2002)



Figura 1. Maíz contaminado con hongo del género *Aspergillus*

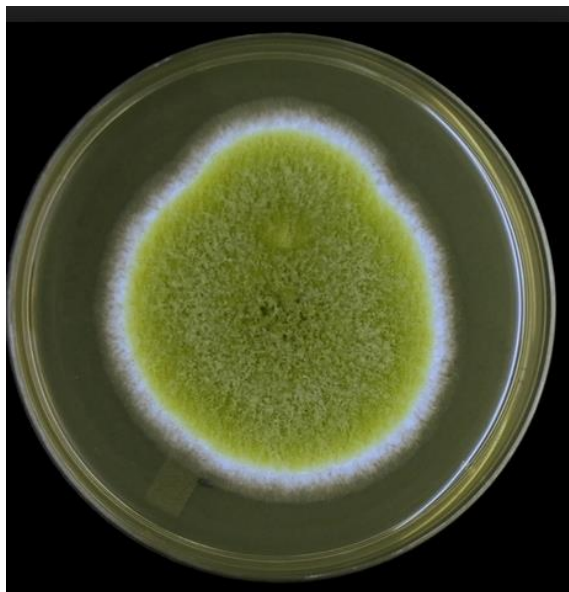


Figura 2. Colonia de *Aspergillus* en placa de agar

La invasión de los mohos productores de aflatoxinas causa cambios bioquímicos en el alimento que incluyen descomposición de las proteínas, degradación de los carbohidratos y del contenido de aceite (Martínez, 1997). Con relación al efecto deteriorativo del *Aspergillus flavus* en un ambiente competitivo, se encontró una reducción del contenido de proteínas del 3,15 % y

de un 4,6 % en el contenido de grasas durante un período de 21 días de almacenamiento (Martínez y Díaz, 1997).

Las aflatoxinas fueron reportadas por primera vez en Inglaterra a principio de la década de los años 60 cuando ocurrió un brote de una enfermedad que afectó a los pavos, llamada en ese momento “enfermedad X de los pavos” la cual se asoció con la ingestión de harina de maní que contenía una sustancia tóxica, posteriormente identificada como aflatoxina (Golbdlatt, 1969; Benjamin y Radlo, 1987 y Vaamonde, 1996).

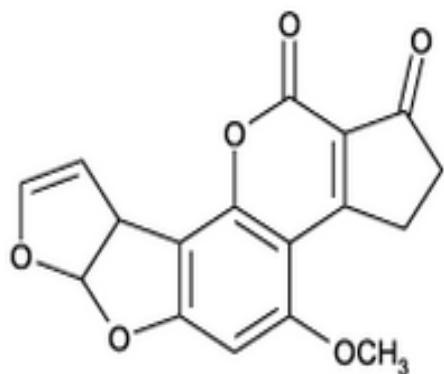
Dieciocho diferentes aflatoxinas han sido identificadas, sin embargo, solo se presentan en forma natural las Aflatoxinas B₁, B₂, G₁, y G₂, las otras son productos metabólicos del sistema microsomal (Leeson y col., 1995 y Vaamonde, 1996).

Las aflatoxinas son químicamente la fusión de dos anillos de hidrofuranos en conformación cis con varios radicales y los miembros, B₁ B₂, G₁ y G₂ son designados así por la reacción de color verde o azul con la luz fluorescente y sus valores cromatográficos, siendo la aflatoxina B₁ la más tóxica y su hepatotoxicidad es el efecto primario en casi todos los animales (Hoerr, 1995).

Formulas Estructuras y moleculares de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂

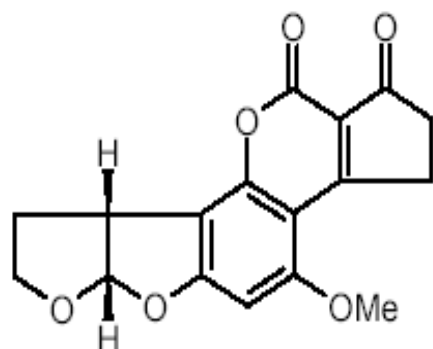
Aflatoxina B₁:

C₁₇H₁₂O₅



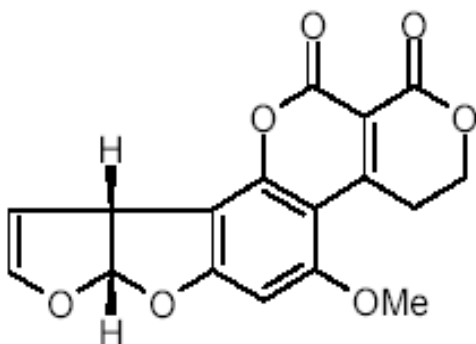
Aflatoxina B₂:

C₁₇H₁₄O₆



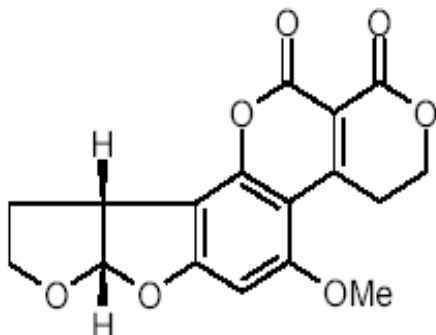
Aflatoxina G₁

C₁₇H₁₂O₇



Aflatoxina G₂

C₁₇H₁₄O₇



Mecanismo de acción de las aflatoxinas:

Debido a que las aflatoxinas son compuestos muy solubles son rápidamente absorbidas desde el sitio de exposición, generalmente tracto gastrointestinal, a la vía sanguínea, depositándose en los tejidos blandos, ocurriendo su mayor acumulación en el hígado y riñón.

El efecto en los ácidos nucleicos es el resultado de la interacción de la toxina con los sitios reactivos de la macromolécula, pudiendo ocurrir dos tipos de interacción: una unión débil, reversible, no covalente y otra irreversible, covalente, que conduce a la activación de metabolitos reactivos; esta formación requiere la activación metabólica por la enzima P-450 hepática o extrahepática, siendo los hepatocitos las células blanco de la acción tóxica de las aflatoxinas, probablemente debido a su alto contenido en citocromo P-450 en comparación con otros órganos. La biotransformación de la aflatoxina B₁ conduce a la formación de un variado número de productos metabólicos, particularmente derivados hidroxilados; de los metabolitos producidos por esta biotransformación, el B₁-8,9-epóxido es considerado el responsable del efecto carcinogénico debido a su habilidad para reaccionar con los sitios nucleofílicos de las macromoléculas, otros derivados hidroxilados derivados de la aflatoxina B₁ son en general

mucho menos tóxicos que el B₁ -8,9-epóxido, el cual para su formación requiere la presencia de carbonos C8-C9 de unión insaturada, lo cual significa que las aflatoxinas B₂ y G₂ son prácticamente atóxicas comparadas con las aflatoxinas B₁ y G₁ que si poseen estas uniones insaturadas de carbono (Lesson y col., 1995).

Según distintos autores, las reacciones básicas de biotransformación enzimática de las aflatoxinas que conducen a la formación de productos metabólicos pueden ser divididos en dos fases:

I fase: esta etapa de biotransformación ocurre principalmente en el hígado, donde la enzima citocromo P-450 está involucrada en los procesos de hidroxilación, demetilación y epoxidación de la Aflatoxina B₁, mientras que la enzima reductasa citosólica es responsable de la reducción de esta toxina.

Hidroxilación: derivados hidroxilados de aflatoxina B₁ son en general mucho menos tóxicos que los otros compuestos derivados de otros procesos; estos compuestos hidroxilados son: aflatoxinas M₁, Q₁ y B_{2a}. El hígado de pollo al metabolizar la aflatoxina B₁ produce pequeñas cantidades de M1 siendo su principal metabolito el B2a.

Demetilación: es una reacción mediada por una enzima microsomal formando un producto ferrólico a partir de aflatoxina B₁ llamado aflatoxina P₁, sin embargo, no hay evidencias de que esta biotransformación ocurra en las especies aviares.

Epoxidación: el producto resultante de la epoxidación de la B₁ es la aflatoxina 8,9-epóxido, la cual es altamente reactiva con sitios nucleofílicos del DNA, por lo cual se presume que sea responsable de los efectos carcinogénicos y mutagénicos de la aflatoxina B₁.

Reducción: la aflatoxina B₁ puede ser reducida a un compuesto llamado ciclopentanol aflatoxicol (RO); esta reacción no puede ser mediada por la enzima microsomal, sino por una enzima citosólica dependiente de NADPH (citoplasma reductasa), RO puede ser reoxidada a aflatoxina B₁ por una enzima deshidrogenasa microsomal; esto puede ser considerado como una vía de almacenamiento de la aflatoxina B₁ (Buck, W. y Osweiler G., 1981; Leeson y col., 1995)

II fase: los metabolitos producidos en la primera fase son conjugados con sustancias endógenas para facilitar su excreción, esta conjugación puede ocurrir con varios compuestos: ácido glucorónico (aflatoxinas M₁ y P₁), péptidos y aminoácidos (aflatoxina B_{2a}), sulfatos y grupos metilglutámico o acetilglutámico (aflatoxina 8,9-epóxido) (Leeson y col., 1995; Yabe y col. 1988))

La toxina y sus metabolitos conjugados son excretados principalmente a través de la bilis y en menor grado por los riñones y tracto gastrointestinal (Leeson y col., 1995).

Los efectos de la biotransformación enzimática de las aflatoxinas trae como consecuencias alteraciones en:

Síntesis proteica: su acción sobre la síntesis proteica es debida a las modificaciones que ocurren tanto en el DNA patrón como en la RNA polimerasa en la fase de traslación y su acción sobre el sistema ribosoma-polimerasa en la fase de traslación; estas acciones inhiben la síntesis proteica en el ámbito hepático y por lo tanto se tienen como consecuencias reacciones metabólicas que desencadenan una serie de síntomas variados (Meléndez, 1990), tales como los siguientes: deficiencias del sistema inmunológico por inhibición de la producción de inmunoglobulinas específicas, disminución del

complemento e interferón, supresión hematopoyética y anemia normocítica normocrómica por disminución significativa de los valores hemáticos; alteración del tiempo de coagulación por disminución del fibrinógeno, plaquetas y de los factores de coagulación V y VII, disminución de las proteínas séricas, siendo las albúminas el componente más sensible, disminuyen también las gammaglobulinas, lipoproteínas, pigmentos carotenoides, colesterol, triglicéridos, ácido úrico, calcio y deshidrogenasa lactato (Hoerr, 1995). Esta inhibición en la síntesis proteica conduce a disminución en la ganancia de peso y aumento de la conversión alimenticia; es posible que la mayoría de los efectos de las aflatoxinas sean debido a la inhibición de la síntesis proteica cuando muchos sistemas enzimáticos se ven limitados o disminuidos (Osuna, 1991).

Metabolismo de carbohidratos: las aflatoxinas, especialmente la B₁, disminuyen los niveles de glucógeno hepático debido a la inhibición de enzima como la glucógeno sintetasa.

Metabolismo de lípidos: se consideran que causan un aumento de los niveles de NADPH, necesarios para la síntesis de ácidos grasos en el hígado, e inhiben el transporte de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol (Meléndez, 1990), es así como se ha descrito una disminución del flujo biliar y de la concentración de sales biliares afectando la digestibilidad y absorción de la grasa y carotenoides, así como también de carbohidratos y proteínas. La inhibición de la síntesis de proteínas a nivel hepático impide el paso de triglicéridos a ácidos grasos libres, por lo tanto facilita la degeneración grasa hepática (Osuna, 1991; Lozano y Díaz. 2006).

Para proteger a los animales contra los efectos de las micotoxinas es absolutamente necesario contrarrestarlas mediante la alimentación; dos estrategias son consideradas efectivas para contrarrestar las micotoxinas relevantes en el área de la agricultura: la adsorción y la biotransformación, adsorción es la reducción de la biodisponibilidad de una micotoxina en el

tracto intestinal de los animales, la micotoxina es adsorbida o “secuestrada” por un mineral indigestible. La biotransformación, por otro lado, ofrece una solución biológica para desactivar la micotoxina por medio del uso de enzimas específicas (Starkl, V. 2005).

Rincón y col. (1999) exponen que la lucha contra las micotoxinas puede hacerse mediante métodos pasivos y activos. La lucha activa se orienta hacia la destrucción de la micotoxina pero se ha demostrado que los agentes destructores poseen efectos secundarios como la eliminación de nutrientes y residuos perjudiciales para la salud animal y humana, entre estos mecanismos tenemos: naturales (aumento de metabolismo y reducción de la absorción intestinal) mecanismos físicos (calor, uso de insecticidas, solventes, agentes químicos reactivos). Uso de enzimas y microorganismos. La lucha pasiva se realiza mediante el uso de sustancias químicas inertes con capacidad de absorber las moléculas de micotoxinas y es el más empleado dado a su inocuidad, entre estos absorbentes tenemos carbón activado, arcillas y aluminosilicatos.

La mayor concentración de aflatoxinas ocurre en los órganos comprometidos con la biotransformación de la toxina tales como hígado y riñón, encontrándose también en otros órganos como músculos, páncreas, piel, pulmones, bazo, sangre, molleja y cerebro (Leeson y col., 1995).

Las aflatoxinas producen gran variedad de efectos adversos en los animales tales como reducción de la productividad, incremento de las enfermedades debido a inmunosupresión, daño a tejidos y órganos, interferencia con la capacidad reproductiva y muerte de los animales.

En relación a los efectos de las aflatoxinas sobre la productividad estudios han demostrado que estas toxinas en niveles de 4 mg/kg producen una mortalidad embrionaria significativa de 26,19% (Pérez- Arévalo y col. 2007), así

como una disminución no significativa en la producción de huevos (Pérez y col. 2001).

En las aves la distribución de aflatoxinas en los tejidos es muy amplia y los estudios sobre sus metabolitos han confirmado la transferencia a órganos reproductores, lo cual puede traer como consecuencia disminución de la fertilidad e incubabilidad, mortalidad embrionaria y nacimiento de pollitos débiles.

La gravedad de la intoxicación dependerá de la especie animal, edad, cantidad de toxina ingerida y tiempo de exposición (Bueno, 1995), el Departamento de Alimentos y Drogas de U.S.A. (FDA) ha establecido como nivel mínimo de tolerancia en materias primas 0,02 mg/kg de Aflatoxina (Calvalheiro, 1983), igual nivel de tolerancia se establece en Venezuela según la norma COVENIN 1881-83 de alimento completo para aves. Especies tales como patos, pavos y faisanes son más susceptibles que los pollos, codornices japonesas y gallinas de guinea (Hoerr, 1995) y los animales jóvenes más que las aves adultas (Whiteman y Bickford, 1983). La dosis letal 50 (LD 50) en pollos está comprendida entre 6,5 y 16,5 mg/kg. de peso vivo (Leeson y col., 1995).

Existen dos formas distintas de intoxicación: aguda y crónica. En la forma aguda ocurre una lesión hepatotóxica aguda caracterizada clínicamente por depresión, anorexia, ictericia y hemorragia. La forma crónica resulta de la ingestión regular de bajas dosis de aflatoxina en la dieta, causando reducción de peso y en la ingestión de alimentos y aumento de la conversión alimenticia. El carcinoma hepatocelular y el hígado graso, son los principales efectos de una aflatoxicosis crónica (Leeson y col., 1995).

No existe tratamiento específico para la aflatoxicosis, cuando se han producido lesiones hepáticas resultarán beneficiosas las dietas digeribles y pobres en grasas, los agentes lipotrópicos y evitar las causas de estrés. La proteína de la dieta aumenta la resistencia a la aflatoxicosis, tampoco existe un medio práctico para destruir la aflatoxina presente en los alimentos contaminados (Buck, W. y Osweiler G., 1981)

Un estudio realizado por Espada y col. (1992), donde evaluaron las lesiones producidas por aflatoxinas en pollos alimentados con aflatoxina B¹ vía oral en dosis de 0,2 y 3 mg/g de peso vivo durante 21 días, demuestra que el hígado es el principal órgano afectado produciéndose lesiones tales como: palidez, decoloración amarillenta, aumento de tamaño de la vesícula biliar y microscópicamente vacuolización de hepatocitos con infiltración grasa; en la Bolsa de Fabricio se presenta disminución del número de células en el centro de los folículos así como depleción celular; en riñones dilatación irregular de algunos túbulos proximales sin evidencia de degeneración celular y en el bazo, una marcada depleción de células linfoides. Otros órganos tales como pulmón, cerebro, proventrículo, duodeno, páncreas y miocardio, no presentaron lesiones que pudieran ser interpretadas como producidas por las aflatoxinas.

Huff y col. (1986) evaluaron el peso relativo de algunos órganos de pollos a los que se les suministró a través del alimento diferentes dosis de aflatoxinas concluyendo que las aflatoxinas inducen a un significativo incremento del peso de proventrículo, ventrículo, bazo, riñones y el hígado, este último por acumulo de lípidos en el órgano, así como disminución de los niveles albumina y proteínas totales, ácido úrico, triglicéridos colesterol y hemoglobina, mientras que Oguz y col. 2002, no encontraron diferencias significativas en los niveles de albumina y proteínas totales, ácido úrico y triglicéridos en pollos tratados con aflatoxina y zeolita sintética (clinoptilolite) utilizada como secuestrante de las aflatoxinas.

Ortatatli y col. (2005), evaluaron los cambios histopatológicos en hígado, riñón, bazo, timo y bolsa de Fabricio de pollos que consumieron alimento contaminado con aflatoxinas en dosis de 50 y 100 µg en combinación con clinoptilolite, observando lesiones solamente en hígado de animales tratados con dosis de 100 µg consistentes en degeneración hidrópica, cambios grasos, hiperplasia de ductos biliares y fibrosis periportal las cuales se presentaron en menor número y severidad en aves tratadas con combinación de aflatoxinas 100 µg con clinoptilolite. Las mismas lesiones hepáticas además de infiltrado linfocitario, obliteración de sinusoides hepáticos y necrosis de hepatocitos fueron reportadas por Pérez y col. (2012) en pollitos recién nacidos donde la toxina fue transmitida vida transovárica.

Arrieta y col. (2006), en un estudio sobre el efecto de la aflatoxina B₁ en dosis de 9,07 mg/kg sobre la morfología hepática y actividad de enzimas hepáticas séricas en pollos de engorde afirman que a pesar de la ausencia de cambios significativos en el peso hepático relativo y de lesiones macroscópicas, los hallazgos microscópicos, consistentes en: hepatocitos con vacuolas lipídicas e hídricas y núcleos conservados o con escasa necrosis individual, leve incremento de agregados linfoides y espacios portales engrosados con leve proliferación y dilatación de conductos biliares, y la disminución de enzimas hepáticas (ALT y AST), indican que las aves presentaron alteraciones hepáticas morfológicas y funcionales a pesar de la baja concentración de aflatoxina suministrada y también establecen que no existe un nivel seguro de aflatoxinas en los alimentos para aves, debido a que constituyen factores de riesgo al hacer a las aves susceptibles a otras enfermedades. Estos efectos hepatotóxicos causados por la aflatoxina B₁ se presentaron con menos severidad al adicionar en el alimento contaminado una mezcla de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* y selenio los cuales actúan como secuestrante de aflatoxina y como antioxidante respectivamente (Arrieta y col. 2008).

Diversos estudios han demostrado el efecto adverso de la aflatoxina sobre los aspectos reproductivos tanto en aves como en otras especies animales. Agnes y Akbarsha (2003), señalan que la aflatoxina B₁ produce disfunción de la espermatogénesis así como alteración de la función del epidídimo que compromete el proceso de maduración post-testicular de los espermatozoides en ratones blancos. En carnero se ha reportado una disminución de la motilidad espermática por efecto de aflatoxinas Tajik y col.(2007).

Clake y col. (1986), Clake y col. (1987) y Clarke y Ottinger (1988) administrando alimento contaminado con concentraciones de 10ppm y 20ppm de aflatoxinas a pollos durante tres semanas, concluyen que esta toxina disminuye la concentración de testosterona en plasma así como los pesos absolutos y relativos de los testículos.

Ortatatli y col. (2002) utilizando concentraciones de 5, 10 y 20ppm de aflatoxinas en el alimento de pollos durante 8 semanas con el objeto de determinar los cambios en testículos, epidídimos y niveles de testosterona en plasma concluyen que las aflatoxinas pueden suprimir total o parcialmente la espermatogénesis por anormalidad de espermatozoide y atrofia de testículos, encontrando en el examen microscópico que el diámetro de todos los túbulos seminíferos de las aves tratadas fue menor y el número de capas de células germinativas también disminuía e incluso en las aves tratadas con 20ppm solo pudieron observar células de Sertoli, mientras que el número de capas en grupo control fue de 8 a 10.

Un estudio sobre el efecto de las aflatoxinas sobre el rendimiento reproductivo de machos adultos leghorn realizado por Sharlin y col. (1980) donde utilizaron 20 µg/g de aflatoxinas en la dieta durante 5 semanas no encontraron en la fertilidad del semen obtenido al ser este inseminado en gallinas, aunque si reportan una disminución del volumen seminal probablemente debido a una disminución del consumo de alimento

presentado en las aves tratadas, así mismo observaron una disminución significativa del peso de los testículos e histopatológicamente en las aves tratadas no observaron cambios en el diámetro de los túbulos seminíferos pero sí una marcada disrupción de la organización del epitelio seminal con ausencias de paquetes de espermátides, una reducción del epitelio germinal y el lumen tubular con contenido de desechos celulares.

A diferencia de los resultados obtenidos por los autores antes expuestos, Hafez y col.(1982), en un estudio sobre los efectos de las aflatoxinas sobre los ovarios y testículos de aves adultas utilizando dosis de 10 ppm, solo encontraron lesiones en ovario consistente en arrugamiento de los folículos, separación de la membrana vitelina con desintegración, lisis de de la zona radiada, lisis del núcleo de los oocitos y vacuolas en membrana perivitelina, mientras que los testículos fueron observados completamente normales.

Contrarios a los resultados obtenidos por los autores antes mencionados sobre el efecto adverso de las aflatoxinas sobre el potencial reproductor en gallos, tenemos que trabajos realizados por Briggs y col. (1974) y Sharlin y col. (1981), concluyen que no existe diferencias significativas entre los grupos de gallos controles y los alimentados con pienso contaminados con aflatoxinas en cuanto a las características del semen, peso testicular y testosterona, utilizándose en ambos casos dosis de 20ppm de aflatoxinas.

Basándose en que es conocido el efecto adverso de las aflatoxinas sobre la fertilidad en diferentes especies sin ser conocido el mecanismo molecular asociado con esta disrupción, Austin y col. (2012) se plantean determinar cambios en el gen de expresión testicular debido a exposición de aflatoxina B₁ e investigar los tipos de células afectadas por la aflatoxina en ratones e infieren que la renina a nivel molecular es la responsable de los efectos adversos de la aflatoxina B₁.

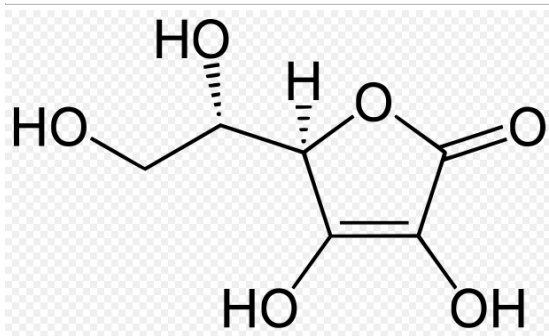
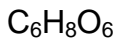
ÁCIDO ASCÓRBICO

Las vitaminas son micronutrientes orgánico esenciales, es decir requeridos en pequeñas cantidades y que no pueden ser sintetizados orgánicamente, necesarias para el funcionamiento normal del organismo. Ejercen muchas funciones metabólicas principalmente como coenzimas (Giuliodori, M. 2002). Generalmente no es necesaria la presencia de vitamina C en la ración de las aves, ya que éstas sintetizan la cantidad que requieren, el ácido ascórbico ayuda en el crecimiento embrionario, favorece el desarrollo óseo y estabiliza las grasas corporales de los pollitos (North, M. y Bell, D., 1993).

El ácido ascórbico fue designado hace más de 50 años como vitamina hidrosoluble C o factor antiescorbuto, su papel principal está relacionado con la formación y mantenimiento del material intercelular, colágeno y sustancias semejantes, como componentes básicos tanto de los huesos como de tejidos blandos, su deficiencia produce síntomas de escorbuto (inflamación, hemorragia y ulceración de las encías, fragilidad de vasos capilares). Interviene en funciones de hidroxilación, en especial de la hidroxiprolina, sustancia constituyente del colágeno necesario para el mantenimiento de materia intercelular. Esta vitamina es susceptible a la destrucción por oxidación, hecho que se ve acelerado por el calor; es más estable en los medios ácidos que en los alcalinos, no se encuentra en alimentos secos y se destruye casi en su totalidad por la cocción (Maynard y col. 1992).

El ácido ascórbico (vitamina C) es un compuesto incoloro, cristalino, hidrosoluble, de carácter ácido y fuertemente reductor, es termoestable en soluciones salinas pero se descompone fácilmente en presencia de álcalis y su destrucción se acelera en presencia de luz. Los frutos cítricos y los vegetales verdes son fuente de esta vitamina (Mc Donald y col, 2002).

Fórmula y estructura molecular del ácido ascórbico:



El ácido ascórbico se relaciona con varias conversiones metabólicas importantes tales como:

- Enzimas que catalizan las reacciones de oxidación y reducción (transporte de electrones).
- Mantiene la oxidación normal de la tirosina.
- Metabolismo normal del colágeno.
- Se necesita junto al ATP para la incorporación del hierro plasmático en la ferritina
- Como antioxidante protege las células frente a las lesiones oxidativas provocadas por los radicales libres.

Los antioxidantes son nutrientes que bloquean parte del daño causado por los radicales libres, los cuales son subproductos que resultan cuando el cuerpo transforma alimentos en energía.

La actividad más importante de la vitamina C, soluble en agua, es reducir la oxidación a nivel de las membranas celulares debido a su interacción

con el vitamina E, liposoluble. Además, también es capaz de reducir el nivel de otros radicales libres (Van-Dyck, S. y Adams, C. 2003).

La acumulación de estos subproductos con el tiempo es ampliamente responsable del proceso de envejecimiento y puede contribuir al desarrollo de varias condiciones patológicas tales como cáncer, enfermedad cardíaca y muchas condiciones inflamatorias como la artritis. Los antioxidantes también ayudan a reducir el daño corporal causado por los químicos y contaminantes tóxicos (Church y Pond, 1992; Mc Donald y col, 2002).

El ácido ascórbico puede ser administrado por vía oral, intramuscular, subcutánea e intravenosa. Por vía oral, la vitamina C se absorbe a través de un proceso de transporte activo. Su distribución es muy amplia, pero las mayores concentraciones se observan en los tejidos glandulares (Mc Donald y col, 2002).

La mayoría de las especies mamíferas y aviares pueden sintetizarlo a partir de la glucosa en cantidades suficientes, pero en ciertas condiciones como estrés por calor en las aves, las necesidades de ácido ascórbico son superiores a las aportadas por la síntesis tisular normal, resultando conveniente la suplementación de la ración (Mc Donald y col, 2002).

El efecto del ácido ascórbico en aves ha sido estudiado en varios aspectos; Erdogan y Col. (2005) indican que el ácido ascórbico suplementado en la dieta adverso del estrés oxidativo inducido por el cadmio sobre el rendimiento productivo en pollos. Malebane y col. (2010) indican que la suplementación de diferentes niveles de ácido ascórbico optimizan la conversión alimenticia, la rata de crecimiento y el peso vivo en pollos.

Maurice y col. (2004) llegan a la conclusión que el ácido ascórbico no reduce la producción de cáscaras rotas en gallinas viejas mientras que Young y Col. (2003) demuestran que el ácido ascórbico reduce el estrés que induce deterioro de la calidad de la carne de pollo. Moghaddam y col. (2009) demostraron que la suplementación de vitamina C en pollos de engorde vía

agua de bebida no solo reduce la hipertensión pulmonar sino también mejora la morfología intestinal bajo condiciones de hipoxia.

Otro trabajo que demuestra el efecto protector de la vitamina C, en este caso sobre la toxicidad del malation en los testículos de ratas fue conducido por Uzun y col. (2009) donde los cambios degenerativos en los túbulos seminíferos producidos por el malation tales como necrosis y edema, fueron reducidos por el uso de vitaminas C y E aunque no completamente. Otros autores (Nain y col., 2008) también estudiaron el efecto de las vitaminas C y E, en este caso sobre el efecto del estrés oxidativo involucrado en la patogénesis del “fallo cardiaco congestivo” concluyendo que la suplementación de vitamina C disminuye la incidencia de hipoxia y reduce la susceptibilidad de los pollos al “fallo cardíaco”; sin embargo la suplementación de vitamina E no mostró un impacto clínico en la incidencia del “fallo cardiaco congestivo”.

En relación al efecto protector de la vitamina C en casos de intoxicación con aflatoxinas tenemos que Domngang y Bassin (1981) en un estudio *in Vitro* sobre el metabolismo de aflatoxinas en hígado de ratas alimentadas con varios niveles de vitamina C, encontraron que la actividad de la O-demetilación en los casos de aflatoxicosis está directamente relacionada con el ácido ascórbico.

Sonmez y col. (2004) evaluaron el efecto del ácido ascórbico sobre la calidad del semen y niveles de testosterona en plasma de ratas concluyendo que la suplementación del ácido ascórbico mejora la calidad reproductiva de las ratas asociándolas con una alta fertilidad.

Los resultados obtenidos por Amakye-Anim y col. (2000) sugieren que el ácido ascórbico, en dosis de 1.000 ppm en la dieta de pollos, beneficia la respuesta de anticuerpos vacunales contra la “enfermedad de la Bolsa” y la ganancia de peso corporal. Contrario a estos resultados, Creel y col. (2001), suplementando con 75 mg de ácido ascórbico por Kg de alimento, no evidenciaron beneficios en la respuesta reproductiva de pollos comerciales.

En cuanto a la relación del ácido ascórbico con la aflatoxina B₁, ésta fue estudiada por Salem y Col. (2001) en conejos, demostrando que el ácido

ascórbico, en dosis de 20mg/Kg de peso vivo, disminuye la toxicidad de la aflatoxina B₁ cuando ésta se encuentra en concentraciones de entre 15 y 30 µg / Kg de peso corporal, efecto que favorecen la producción y reproducción de machos, mejorando así la concentración de testosterona en plasma, las características seminales, incremento del peso corporal y testicular reduciendo los efectos negativos de la aflatoxina B₁; similares resultados obtuvieron Netke y col (1997) quienes demostraron el efecto protector del ácido ascórbico sobre la anatomía microscópica, sistema microsomal y enzimas hepáticas en cerdos intoxicados con aflatoxinas.

Yousef y Col. (2003) demostraron que el ácido ascórbico y la vitamina E mejoran la calidad del semen y parámetros bioquímicos seminales en conejos machos.

MATERIAL Y MÉTODOS

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo este estudio y el análisis de las muestras obtenidas, el mismo fue dividido en dos etapas, donde la primera etapa consistió en la crianza de 100 pollitos hasta las 27 semanas de edad, la segunda etapa radicó en dos fase: fase A y fase B (Tabla 1); durante la fase A se aplicación seis tratamientos donde se combinaron dos dosis diferentes de aflatoxinas y una dosis fija de vitamina C durante diez días, posteriores a los cuales se realizó el sacrificio del 50% de las aves y se obtuvieron las muestras de semen y testículos para análisis de calidad de semen y evaluación morfológica de testículos. La fase B fue llevada a cabo trece días después donde se sacrificó el resto de las aves y se obtuvieron las mismas muestras para evaluar el efecto del tratamiento en el tiempo.

Tabla 1. Etapas y fases del experimento.

1 Etapa	2 Etapa	
De 1 día a 27 semanas	Fase A	Fase B
	10 días (aplicación de tratamiento)	13 días (postratamiento)

Lugar de estudio

El experimento se realizó en las instalaciones de la estación Local “El Lago” perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Zulia) ubicada en el Sector Los Haticos municipio San Francisco, Estado Zulia (fig. 1) y cuyas condiciones climatológicas son: temperatura promedio anual 27°C, humedad relativa promedio anual 70 %, precipitación promedio anual de 445 mm.

Un área de 4 por 6 metros, con piso de cemento, fue acondicionada para que funcionara como galpón provisional, se colocó concha de arroz en el piso y las paredes fueron cerradas con malla metálica, con las cuales también fueron divididos en 6 corrales el área interna, se colocaron dos tanque de agua y un comedero tipo tolva y un bebedero campana por corral.



Figura 3. Mapa del Estado Zulia con la ubicación de la Estación Local El Lago (INIA-Zulia) utilizada en el estudio.

I Etapa

Animales

Se utilizaron 100 pollitos bebe machos pertenecientes a la línea Isabrown de un día de nacidos, todos provenientes de la misma incubadora e

igual lote de reproductoras, los cuales se criaron hasta cumplir las 27 semanas de edad (Figura 2).



Figura 4. Instalación y crianza de los gallos utilizados en el experimento.

Alimentación

El alimento suministrado a las aves fue el recomendado por la guía de manejo para línea de aves Isabrown (Isabrown, 2005) el cual fue abastecido *ad libitum*, sus características se expresan en la Tabla 2. Este alimento fue adquirido de una fábrica conocida donde se aplicaron estrictos controles de micotoxinas y se elaboró con materias primas de excelente calidad.

Tabla 2. Plan de alimentación utilizado en la cría y levante de los gallos.

Edad	Kcal	% proteína bruta
0 a 4 semanas	2.950	20.5
5 a 10 semana	2.850	19
11 a 17 semanas	2.750	16
18 en adelante	2.750	16

Fuente: Guía de manejo para aves Línea Isabrown 2005

Vacunas aplicadas

Las aves recibieron programa de vacunación expresado en la Tabla 3.

Tabla 3. Programa de vacunación aplicado

Día de edad	Vacuna aplicada	Vía de aplicación
1	Enfermedad de Marek	Subcutánea
12	Enfermedad de Gumboro Enfermedad de Newcastle	Oral Ocular
22	Enfermedad de Newcastle Enfermedad de Gumboro Enfermedad Bronquitis Infecciosa	Ocular
28	Enfermedad de Newcastle (oleosa)	Subcutánea
45	Viruela Aviar Mycoplasmosis	Punción alar Subcutánea

Al cumplir las 20 semanas de edad las aves fueron divididas en 6 grupos de manera que al llegar a la semana 27 ya estuvieran adaptadas a sus correspondientes espacios y evitar así el estrés que esta separación produciría al iniciar los tratamientos.

Al finalizar la 1 etapa el lote presento una mortalidad del 2% y un peso promedio de 2.550 kg.

II Etapa

Tratamientos aplicados

Al cumplir las aves las 27 semanas de edad fueron escogidas al azar 12 aves por cada corral, los cuales fueron identificados con números 1, 2, 3, 4, 5 y 6, para un total de 72 gallos y se dio inicio a la aplicación de los tratamientos de la siguiente manera (Tabla 4):

Tabla 4. Tratamientos aplicados en la investigación.

Tratamiento	Dosis	
	Aflatoxinas (mg/kg de alimento)	Vitamina C (g/lit de agua de bebida)
1	0	0
2	0	1
3	0,02	0
4	0,02	1
5	5,0	0
6	5,0	1

El tratamiento fue aplicado durante 10 días, simulando el tiempo promedio de duración del alimento en los silos de las granjas antes de la llegada un nuevo pedido que puede o no estar contaminado con aflatoxinas y por tanto el tiempo generalmente utilizado para consumir alimento contaminado por parte de las aves. Los tratamientos fueron distribuidos en el galpón como se indica en la tabla 5.

Tabla 5. Distribución de los tratamientos dentro del galpón

Tanque 1	<p>1</p> <p>aflatoxinas 0 mg/k Vitamina C 0g/lt</p>	<p>3</p> <p>aflatoxinas 0,02mg/k Vitamina C 0g/lt</p>	<p>5</p> <p>aflatoxinas 5mg/k Vitamina C 0g/lt</p>
Tanque 2	<p>2</p> <p>aflatoxinas 0 mg/k Vitamina C 1g/lt</p>	<p>4</p> <p>aflatoxinas 0,02mg/k Vitamina C 1g/lt</p>	<p>6</p> <p>aflatoxinas 5mg/k Vitamina C 1g/lt</p>

De manera que los tratamientos 1, 3 y 5 (con 0g/lt de vitamina C), utilizaron un mismo tanque de agua de bebida y el 2, 4 y 6 (con 1g/lt de vitamina C) otro tanque diferente.

La dosis de aflatoxina que se suministró a las aves en el presente ensayo se fundamenta en la máxima aceptada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y por la Comisión Venezolana de Normas Industriales COVENIN 1881-83 para Alimento completo para aves, la cual regula que no deberá contener aflatoxinas en un nivel superior 0,02 mg/kg. Clarke y col. (1987) aplicaron dosis de 10 y 20 mg/kg con y Ortali y col. (2002) quienes utilizaron 5, 10 y 20 mg/kg de aflatoxinas, en ambos casos se observaron efectos con 10 mg/kg de aflatoxinas, de manera que se utilizó la dosis mínima aceptada y la dosis máxima utilizada en este trabajo se basó en la cantidad de aflatoxinas obtenida del cultivo utilizado.

Ácido ascórbico: El ácido ascórbico, proveniente de laboratorio Corpodrovecá® al 95% de pureza, se suministró en dosis de 1g/lt de agua bebida.

Preparación del alimento contaminado

Las aflatoxinas fueron obtenidas mediante cultivo de una cepa de *Aspergillus flavus* productora de aflatoxinas que fue donada por el laboratorio de Micotoxinas de la facultad de agronomía de la Universidad Central de Venezuela (Figura 3).



Figura 5. Cepa de *Aspergillus flavus* utilizada

Esta cepa fue sembrada de la siguiente manera: Se agregaron 10 ml de agua destilada estéril y se raspó la superficie del cultivo con aguja de siembra, luego se filtró la solución y se colectaron entre 4 y 5 ml que se diluyó en 9ml de agua destilada estéril (Figura 4) y se inoculó de 15 ml sobre un sustrato constituido por 10 kg maíz picado previamente esterilizado mediante autoclave distribuido en 5 envases de vidrio con 2kg de maíz cada

uno (3 ml del cultivo obtenido por frasco) (Figura 5), se esperó su crecimiento y se tomó dos muestras de cada envase que fueron llevadas al laboratorio para medir la concentración de aflatoxinas totales mediante prueba de Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Yousef y Carlstrom, 2006; Kunkle, R. Y Richard, J. 1998)



Figura 6. Siembra de la cepa de *Aspergillus flavus*



Figura 7. Contaminación de material a ser mezclado con el alimento.

Posteriormente el material contaminado se mezcló con el alimento a ser consumido por las aves en cantidades necesarias para lograr las concentraciones requeridas las cuales fueron posteriormente verificadas mediante pruebas de Elisa, preparándose 40 kg para cada una de las concentraciones de aflatoxinas (0,2 y 5mg/kg) estimándose un consumo de 130 gr/ave/día

Toma de muestras

La toma de muestras fue dividida en dos fases correspondientes a dos tiempos:

Fase A:

Al finalizar los diez días de aplicado el tratamiento, 6 gallos de cada grupo fueron retirados para ser pesados vivos (Figura 6) y sacrificados mediante sección de médula espinal y sangradas, inmediatamente luego del sacrificio se obtuvo una muestra de semen (post mortem) y los testículos fueron extraídos. Se tomaron muestras de la porción media de cada testículo y fueron fijados los testículos izquierdos en solución de Bouin y los derechos en formalina para ser procesados para histopatología y teñidas con hematoxilina-eosina de acuerdo con la técnica convencional.



Figura 8. Pesaje de los animales vivos.

Análisis de la calidad seminal

Evaluación del pH

Se realizó mediante la utilización de tiras reactivas universales de pH de marca MERCK de medición colorimétrica con escalas del 1 al 14.

Motilidad espermática

La motilidad y calidad de movimientos se valoraron mediante una gota de la muestra sobre un portaobjetos, previamente calentado en una platina térmica a 37°C, se colocaron cubreobjetos y se observaron al microscopio óptico (Globe®, LEM 1600, Alemania) con objetivo de 40X. La calidad del movimiento de los espermatozoides se valoró según la técnica mencionada por Martín-Rillo y col., (1996) para semen porcino basada en la siguiente clasificación de una escala de 0 a 5 (Tabla 6).

Tabla 6. Clasificación del movimiento espermático individual

0	No se observaron movimientos, necropermia.
1	Escaso movimiento, únicamente la cola tiembla ligeramente.
2	Espermatozoides con desplazamientos en círculos y algunos progresivos
3	Movimientos progresivos y sinuosos.
4	Movimiento progresivo rápido.
5	Movimientos progresivos muy rápidos

Vitalidad espermática

Se extrajo 10 µL del semen recién obtenido post mortem y se mezcló con una gota de igual volumen del colorante (eosina-nigrosina) en, en un portaobjeto temperado a 37°C ubicado sobre una platina termo-regulable

(Osaka®, modelo OK51, España), inmediatamente se homogenizó suavemente y se hizo un extendido fino (frotis), dejando secar por 30 minutos. Los frotis se observaron en el microscopio óptico (Globe®, LEM 1600, Alemania) con el objetivo de inmersión (1000X) y se cuantificó un total de 100 espermatozoides con el fin de valorar el porcentaje de espermatozoides vivos en la muestra seminal. La proporción de espermatozoides muertos con membranas plasmáticas permeables se tiñen, y sus cabezas se observaban de color rosado en sus diferentes tonalidades, que van desde el rojizo hasta el rosado pálido, en cambio, los espermatozoides vivos presentan las cabezas de color blanco y/o claros, lo cual es producto de que tienen sus membranas plasmáticas intactas, lo cual no permite el paso del colorante. (Swanson y Bearden, 1951).

Morfología espermática

Con el frotis realizado y coloreado con eosina-nigrosina para valorar la viabilidad espermática se cuantificó las morfoanomalías de la muestra seminal. Fueron evaluados 100 espermatozoides por muestra y clasificados según su apariencia en normales (sin defectos) y anormales, (con presencia de anomalías morfológicas). El resultado se expresa en porcentaje (%) de espermatozoides normales. El porcentaje de espermios anormales incluían: defectos de cabeza (número, tamaño y apariencia), defectos de la pieza intermedia (ubicación y apariencia), anomalías en el flagelo (número, forma y tamaño), presencia de gota citoplasmática proximal (GCP) y distal (GCD).

Evaluación macroscópica

Los testículos extraídos fueron pesados en balanza electrónica (Marca Denver Instrument Company Modelo: TR-8102D Precisión: 0,1) y luego fueron realizadas las mediciones de longitud, ancho y grosor, mediante el uso de un vernier, para obtener el volumen testicular. Los testículos derecho e izquierdo fueron pesados y medidos por separado (Figuras 7, 8 y 9).



Figura 9. Testículos de gallo antes de su extracción.



Figura 10. Pesaje de los testículos de gallo.

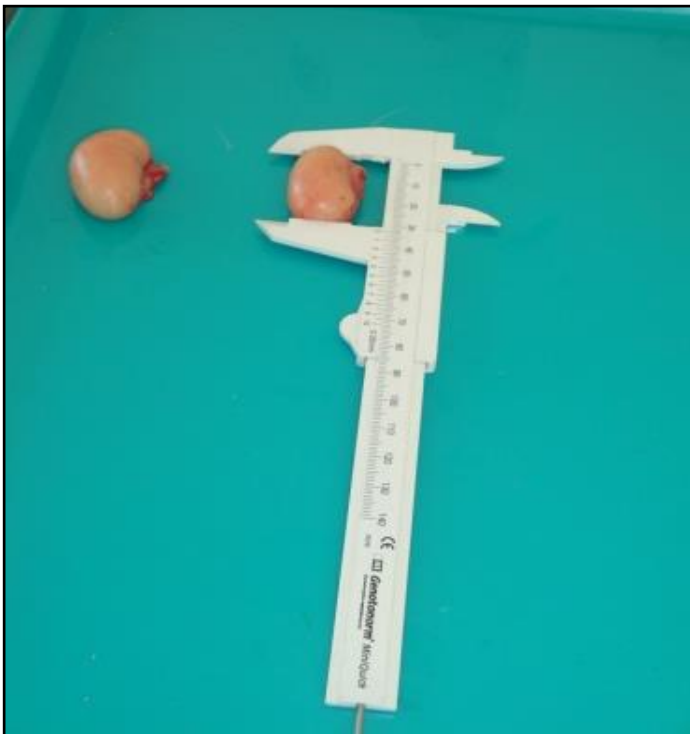


Figura 11. Medición de testículos de gallo mediante la utilización de un vernier.

Evaluación microscópica

Las muestras de testículos tomadas y fijadas en solución de Bouin (segmentos de testículos izquierdos) y en formalina (segmentos de testículos derechos) fueron procesadas para histopatología, incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina-eosina de acuerdo con la técnica convencional, posteriormente las secciones histológicas fueron vistas en microscopio óptico (Globe®, LEM 1600, Alemania) examinándose 40 túbulos seminíferos circulares por testículo para un total de 240 túbulos seminíferos por tratamiento donde se realizaron las siguientes observaciones:

- Contaje número de vacuolas en epitelio germinal.
- Número de túbulos seminíferos que presentaron descamación o disrupción del epitelio germinal.
- Contaje de capas o estratos de células germinales por túbulo seminífero.

Las muestras también fueron examinadas mediante el uso de un equipo de análisis computarizado de imágenes (Modelo Leco IA32. USA) mediante la orden de medición binaria de imagen realizándose las siguientes mediciones en 10 túbulos seminíferos circulares por testículo:

- Área total de túbulo seminífero.
- Área de luz del túbulo seminífero.
- Área de células germinales.
- Espacio intertubular.

Estas mediciones se expresan en milímetros cuadrados las dos primeras y en milímetros lineales la tercera.

Fase B:

Luego de ejecutada la Fase A las aves comenzaron a consumir alimento no contaminado y agua de bebida sin la presencia de vitamina C (Acido ascórbico) y trece días después de concluirse la aplicación del tratamiento, es decir el consumo del alimento contaminado con aflatoxinas y la vitamina C vía agua de bebida, se sacrificaran las 6 aves restantes de cada grupo y se repitió todo el proceso anteriormente expuesto en la Fase A de toma de muestras y análisis de las mismas. Se repite la toma de muestras después de este periodo con el objeto de evaluar el efecto del tratamiento cumplido un periodo de espermatogénesis, el cual según Froman y col. (2000) tiene una duración de 13 días.

Metodología Estadística

El diseño experimental correspondió a un completamente aleatorizado, utilizando un análisis de varianza y analizado por el método de los mínimos cuadrados; considerando como variables discretas independientes el efecto del tratamiento y como variables dependientes se estudió: Ph, motilidad, vitalidad y morfología espermática, pesos absolutos y relativos de los testículos, volumen testicular, vacuolas y descamación del epitelio germinal, numero de capas de células germinales por túbulo, área total de túbulos seminíferos, área de luz de túbulos seminíferos, área de células germinales por túbulos seminíferos y área intertubular. Los datos recopilados durante el ensayo fueron analizados a través del GLM (general lineal model) del paquete estadístico del SAS, El modelo aditivo lineal que describe el comportamiento de las variables en estudio, es el siguiente:

$$Y_{ij}: \mu + T_i + E_{ij}$$

donde:

Y_{ij}: Variable dependiente: Ph, motilidad, vitalidad y morfología espermática, pesos absolutos y relativos de los testículos, volumen testicular, vacuolas y descamación del epitelio germinal, número de capas de células germinales por túbulo, área total de túbulos seminíferos, área de luz de túbulos seminíferos, área de células germinales por túbulos seminíferos y área intertubular.

μ : Media general de las observaciones;

T_i: Efecto de la i-esimo tratamiento (i= 1-6); donde:

1 = Control,

2 = Tratamiento 2 (definir aquí),

3= tratamiento 3,

4= tratamiento 4,

5= tratamiento 5,

6= Tratamiento 6,

E_{ij}: error aleatorio, asumido normal e independientemente distribuido con media cero y varianza homogénea.

Cuando se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos se utilizaron las pruebas de significancia (lsmeans) para comparar las medias entre los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.-Análisis de la calidad seminal

Los datos obtenidos sobre el pH seminal oscilaron entre 8,32 y 8,51 y no se encontró diferencias significativas ($p>0,05$) en sus valores.

Los resultados sobre motilidad espermática, los cuales fueron medidos en una escala del 1 al 5, se encontraron entre 3,33 (tratamiento 5 de fase B) y el menor valor fue de 2,33 (tratamientos 3 de fase A) no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) ni entre tratamientos ni entre fases de tratamiento según se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Motilidad espermática.

Fase A		Fase B	
Tratamiento	Motilidad Error estándar	Tratamiento	Motilidad Error estándar
1	3,00 ± 0,33	1	3,12 ± 0,41
2	2,50 ± 0,37	2	2,50 ± 0,33
3	2,33 ± 0,33	3	3,16 ± 0,33
4	2,50 ± 0,33	4	2,75 ± 0,33
5	3,08 ± 0,33	5	3,33 ± 0,33
6	2,60 ± 0,37	6	2,58 ± 2,58

$p>0,05$ No significativo.

A pesar de no ser significativa la diferencia entre estos tratamiento y fases de tratamientos podemos observar en la figura 12, que en la fase B del experimento presentó una motilidad más alta que en la fase A, a excepción del tratamiento 2 donde el resultado fue igual en ambas fases (2,5), lo cual indicaría una mejoría de la motilidad en la etapa de recuperación de la intoxicación en caso de que se hubiese observado diferencias entre tratamientos.

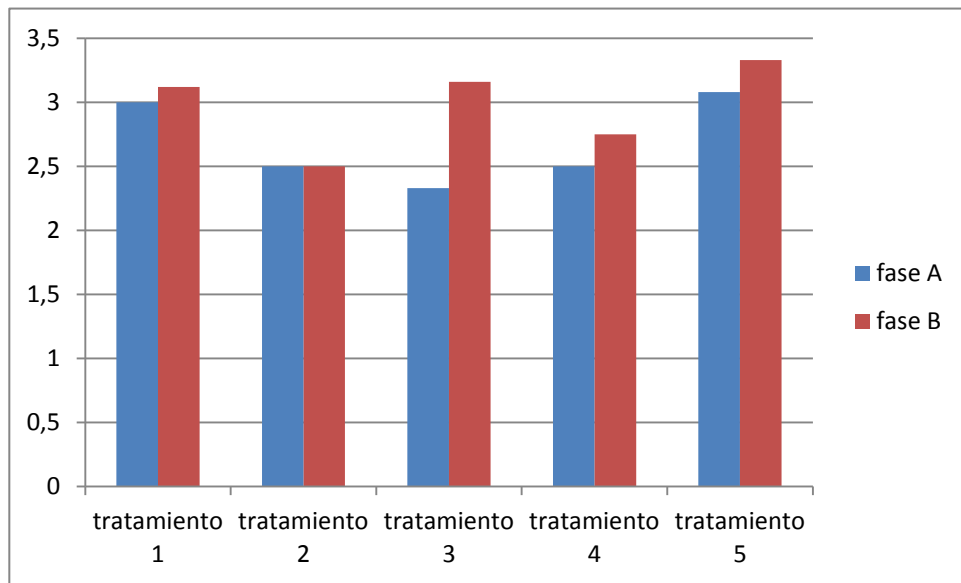


Figura 12. Motilidad espermática.

La vitalidad espermática no presento diferencias significativas entre fases de tratamiento, solo se observó diferencias significativa ($p < 0,05$) entre los grupos controles (1 y 2) y los tratamientos 5 y 6 de la fase A (Tabla 8), a pesar de esto la vitalidad disminuyo en todos los tratamientos, incluyendo los controles al compararse la fase A con fase B, como puede apreciarse en la figura 13, estos resultados son contrarios a los obtenidos en la motilidad espermática.

Tabla 8. Vitalidad espermática.

Fase A		Fase B	
Tratamiento	Vitalidad Error estándar	Tratamiento	Vitalidad Error estándar
1	51,00 ± 7,40 ^a	1	37,25 ± 9,07 ^{ab}
2	41,00 ± 7,40 ^a	2	35,00 ± 8,11 ^{ab}
3	33,50 ± 7,40 ^{ab}	3	25,66 ± 7,40 ^b
4	37,16 ± 7,40 ^{ab}	4	28,66 ± 7,40 ^b
5	29,66 ± 7,40 ^b	5	22,00 ± 7,40 ^b
6	24,83 ± 7,40 ^b	6	35,00 ± 7,40 ^{ab}

a-b letras distintas en la misma fila o columna presentaron diferencias significativas $p < 0,05$

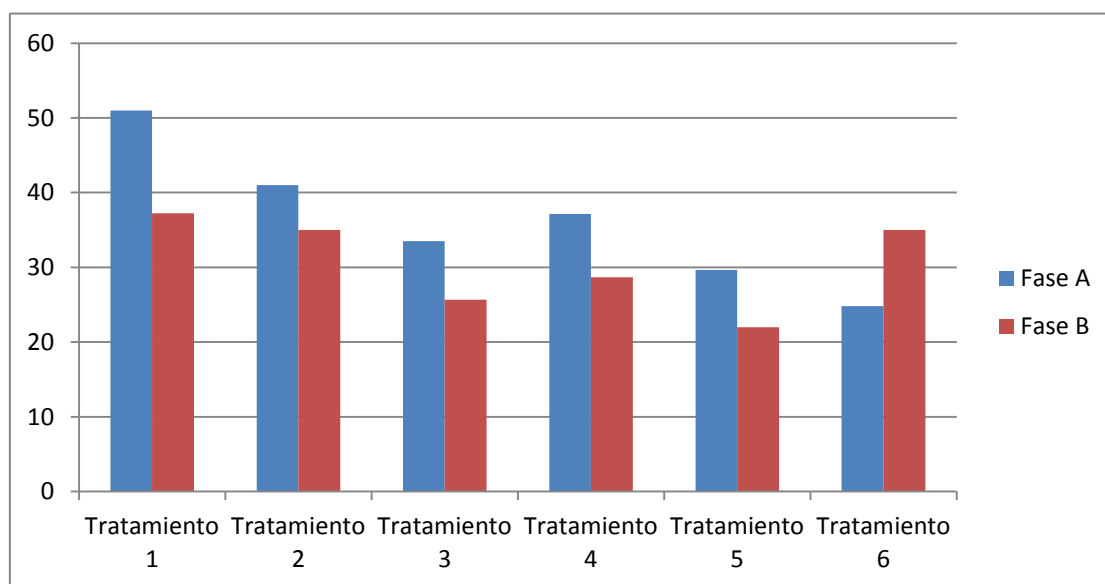


Figura 13. Vitalidad espermática.

En relación a las morfoanomalías espermáticas los resultados expresados no fueron acordes a los tratamientos aplicados, podemos apreciar en la tabla 9 las siguientes diferencias significativas ($p < 0,05$): en la fase A el tratamiento 3 fue diferente al 1 y al 4, en la fase B el tratamiento 2 fue diferente al 1, 3, 5 y 6, entre fases de tratamiento se encontraron diferencias en los tratamientos 1 y 2 (Tabla 9, Figura 14).

Tabla 9. Morfoanomalías espermáticas.

Fase A		Fase B	
Tratamiento	Anomalías Error estándar	Tratamiento	Anomalías Error estándar
1	9,50 ± 2,22 ^{bc}	1	2,00 ± 2,72 ^a
2	6,16 ± 2,22 ^{ab}	2	13,60 ± 2,43 ^c
3	3,00 ± 2,22 ^a	3	3,00 ± 2,22 ^a
4	9,66 ± 2,22 ^{bc}	4	8,33 ± 2,22 ^{abc}
5	6,16 ± 2,22 ^{ab}	5	4,83 ± 2,22 ^{ab}
6	8,50 ± 2,72 ^{abc}	6	3,16 ± 2,22 ^a

a-c letras distintas en la misma fila o columna presentaron diferencias significativas $p < 0,05$

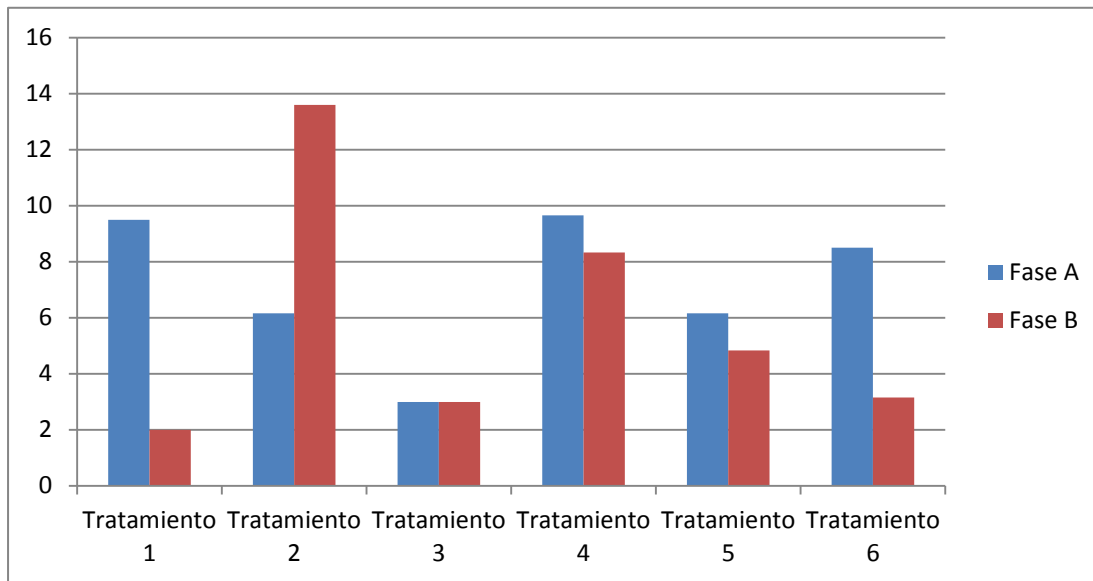


Figura 14. Morfoanomalías espermáticas.

Los resultados obtenidos sobre la vitalidad espermática y las morfoanomalías no son atribuibles a ninguno de los tratamientos aplicados ni a las fases de los tratamientos presumiéndose que sean debidos a un problema en la tinción donde la eosina-nigrosina no interactúo como era de esperarse con el semen de gallo y que la nigrosina tiñera en exceso los componentes del plasma seminal observándose una ligera tinción de espermatozoides vivos, creando un artificio.

Algunos autores tales como Tabatabaei y col., (2009), Masiel y col., (2008) y Onura, (1987), evaluaron la calidad de semen de gallos donde los primeros autores realizaron comparaciones entre líneas genéticas, los segundos en diferentes fotoperiodos y el tercero comparo animales sin castrar y animales semicastrados reportan motilidades entre 86,42 y 78,28 expresadas en porcentajes las cuales resultan ser comparativamente superiores a las obtenidas en la presente investigación lo cual podría deberse a la utilización de diferentes técnicas.

Agnes y Akbarsha (2003), en una evaluación sobre el efecto espermatotóxico de la aflatoxina B₁ en ratones blancos utilizaron dosis de 50,

100, 150, 200 y 250 μ /kg de peso vivo durante 45 días reportan una disminución en la motilidad en todos los tratamientos, siendo esta proporcionalmente menor el incrementarse los días de tratamiento control reportando disminución de 96,6 a 25,7% de motilidad, similares resultados obtuvieron Salem y col., (2001), quienes estudiaron el rol protector del ácido ascórbico (20 mg/kg de peso vivo) sobre el mejoramiento de la calidad del semen en conejos tratados con dosis de 15 y 30 μ /kg de peso vivo de aflatoxina B₁ durante 9 y 18 semanas observaron un decrecimiento significativo ($p < 0,05$) en la motilidad espermática dependiendo de la dosis de aflatoxinas y este efecto continuo durante periodo de recuperación a diferencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo donde no se encontró diferencias en los tratamientos aplicados sobre la motilidad espermática.

En relación a la utilización de la vitamina C, mientras que y col., (2004) en una evaluación del efecto de la suplementación de ácido ascórbico, en dosis de 500, y 250 mg/kg/día durante 8 semanas, sobre calidad de semen en ratas no encontraron cambios significativos en motilidad espermática. Yousef y col., (2003), en una investigación sobre el efecto de la suplementación de vitamina C en la calidad del semen en conejos en dosis de 1,5 g/l durante 12 semanas y concluyen que ésta si mejora la motilidad, al igual que Creel y col. (2001) quienes que el ácido ascórbico mejora la fertilidad en gallos, coincidiendo y col., (2004), con los resultados obtenidos en la presente investigación.

Tabatabaei y col., (2009), reportan vitalidad de 82 y 89% la cual en el presente trabajo no supero el 51% en ninguno de los tratamientos y las morfoanomalias o defectos morfológico entre 10 y 7% en gallos bajo condiciones normales, así mismo Onura, (1987), encuentra anomalías de 1,62%.

Salem y col., (2001) en conejos tratados con aflatoxina B₁ reportan un incremento ($p < 0,05$) de espermatozoides muertos y anormales, dependiendo de la dosis manejada, y este efecto continuo durante el periodo de recuperación, en los tratados con ácido ascórbico ambas mediciones fueron mejoradas, estos resultados coinciden con los de Agnes y Akbarsha, (2003),

quienes encontraron que la aflatoxina B₁ en ratones blancos donde también reportan un aumento de las anomalías espermáticas la cual se elevó a 47,6 % a los 45 días de tratamiento.

5.2.-Evaluación macroscópica

Los testículos de los gallos en todos los tratamientos aplicados se observaron, macroscópicamente, de color blanco brillante y muy vascularizados, al corte también se presentaron color blanco y de apariencia húmedo (Figura 15).

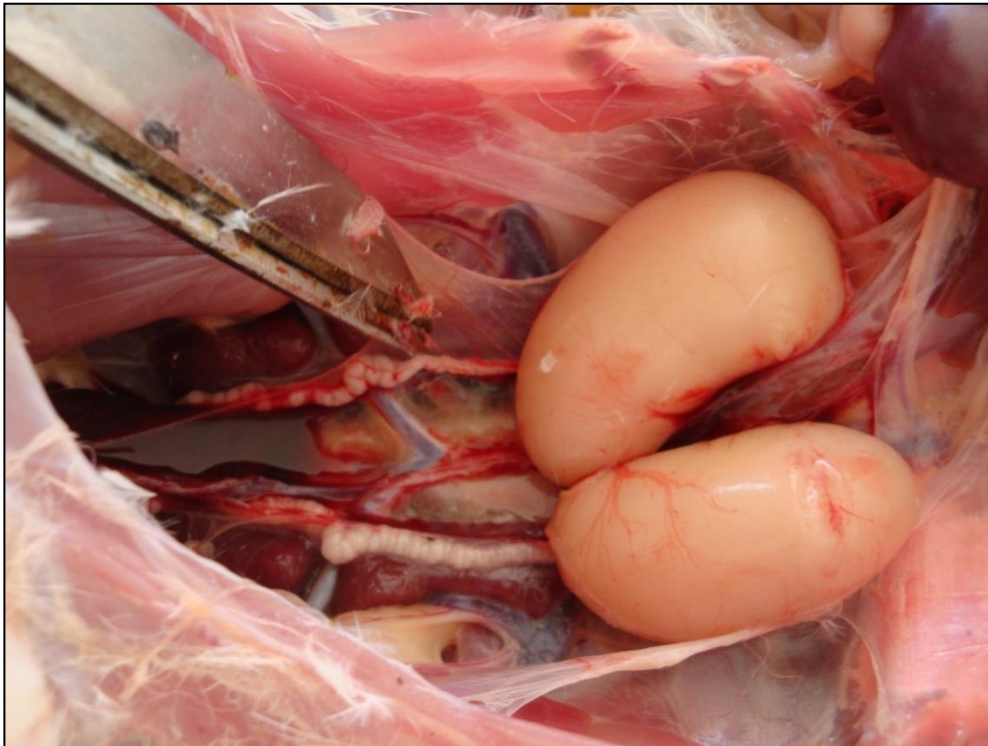


Figura 15. Testículos de gallos de aspecto normal.

Un ave perteneciente al grupo 2 fase A, mostro el testículo derecho lobulado, estos lóbulos no presentando la forma normal de habichuela sino redondeados, ambos lóbulos con un solo conducto excretor, el testículo izquierdo de forma normal (Figura 16).

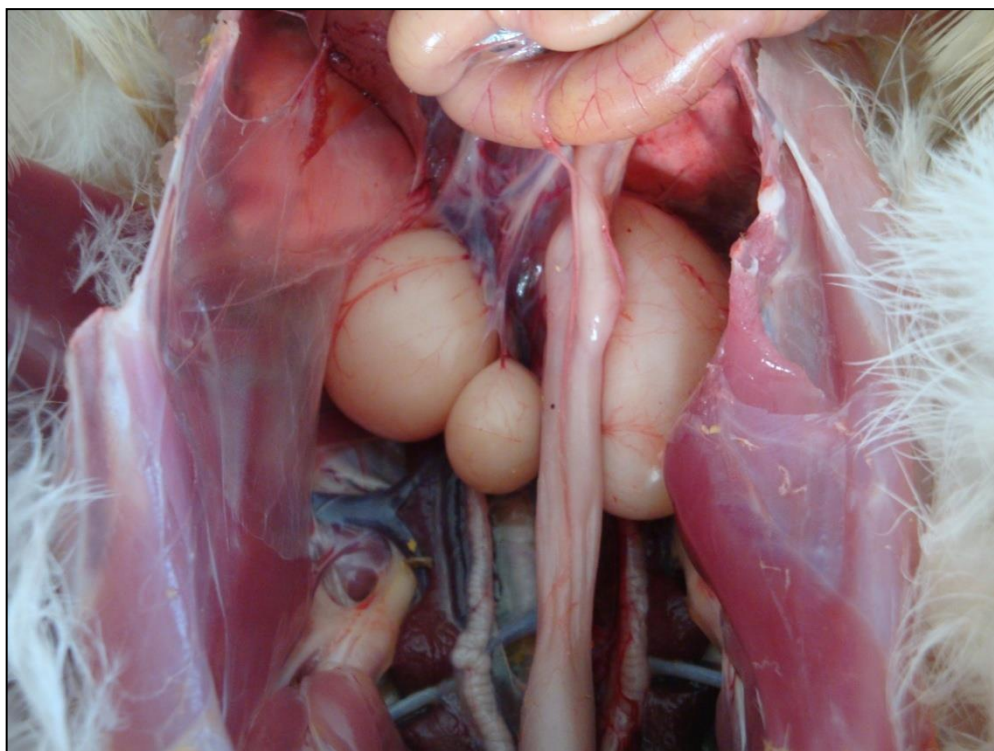


Figura 16. Testículo derecho lobulado y el izquierdo de forma normal.

En relación a los aspectos macroscópicos evaluados tales como peso vivo, pesos absolutos y relativos de los testículos izquierdo y derecho y volumen testicular, no se observaron diferencias significativa ($p > 0,05$).

El peso vivo obtenido se expresa en la tabla 10 y figura 17, sus valores estuvieron comprendidos entre 2,383 – 2,550 kg con un peso promedio de 2,490 kg.

Tabla 10. Peso vivo de las aves.

Fase A			Fase B		
Tratamiento	Peso vivo kg	Error estándar	Tratamiento	Peso vivo k g	Error estándar
1	2,585	± 89,02	1	2,383	± 89,02
2	2,533	± 89,02	2	2,508	± 89,02
3	2,400	± 89,02	3	2,550	± 89,02
4	2,461	± 89,02	4	2,475	±89,02
5	2,466	± 89,02	5	2,516	± 89,02
6	2,516	± 89,02	6	2,491	±89,02

p>0,05 No significativo

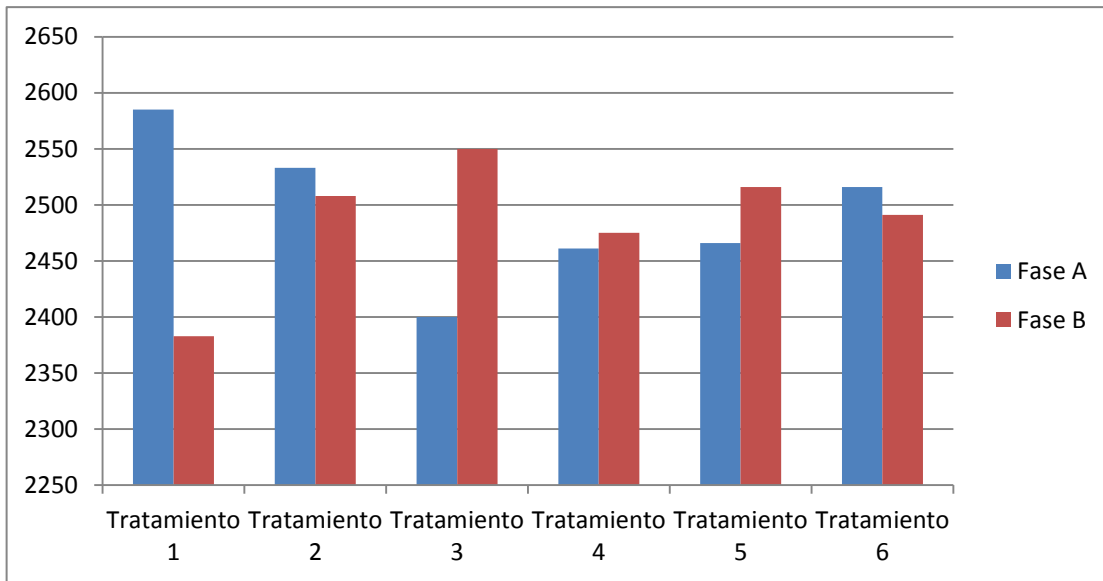


Figura 17. Peso vivo de las aves.

Los pesos absolutos variaron en un rango entre los 7,78 y 12,28 g mientras que los relativos entre 0,32 y 0,47 % del peso vivo del animal, lo cual también puede expresarse en gramos de testículo por cada 100 g de peso vivo del ave (Tabla 11), sin ser significativas estas diferencias (p>0,5).

Tabla 11. Comparación entre pesos absolutos y relativos de testículos izquierdo y derecho.

Fase A					Fase B				
	testículo izquierdo		testículo derecho			testículo izquierdo		testículo derecho	
Tratamiento	Peso Absoluto g	Peso relativo%	Peso absoluto g	Peso relativo%	Tratamiento	Peso absoluto g	Peso relativo%	Peso absoluto g	Peso relativo %
1	10,28	0,39	9,73	0,37	1	10,46	0,43	9,00	0,37
2	12,15	0,48	10,51	0,41	2	9,48	0,37	7,78	0,31
3	9,15	0,38	8,31	0,34	3	10,78	0,42	10,05	0,39
4	11,70	0,47	11,08	0,45	4	9,23	0,37	8,18	0,32
5	10,35	0,41	9,82	0,39	5	8,98	0,36	8,13	0,32
6	10,53	0,42	8,96	0,35	6	10,53	0,41	8,95	0,35

p>0,05 No significativo

En la figura 18 se muestra la comparación de los pesos absolutos de los testículos derechos e izquierdos por tratamientos y fases de la investigación donde se observa, como a pesar de no ser significativa la diferencia, el testículos izquierdos presenta un peso relativo ligeramente mayor que los derechos.

Resultados y Discusión

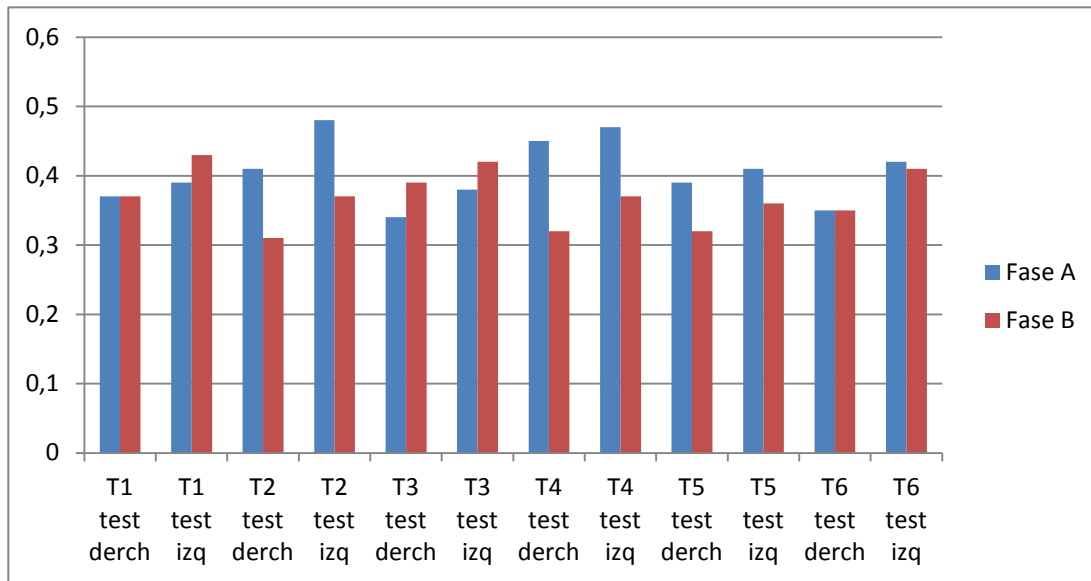


Figura 18. Comparación de los pesos relativos de los testículos derechos e izquierdos.

Los datos obtenidos sobre volumen testicular se expresa en la tabla 12 y concuerdan con los resultados de pesos absolutos y relativos de los testículos presentando un volumen ligeramente mayor los testículos izquierdo a excepción del tratamiento 5 en la fase A. la comparación de los volúmenes testiculares se expresan en la figura 19.

Tabla 12. Volumen testículos derecho e izquierdo.

Fase A				Fase B					
Tratamiento	Testículo izquierdo		Testículo derecho		Tratamiento	Testículo izquierdo		Testículo derecho	
	Volumen cm ³	Error estándar	Volumen cm ³	Error estándar		Volumen cm ³	Error estándar	Volumen cm ³	Error estándar
1	12,69 ± 2,00		11,95 ± 1,87		1	10,03 ± 2,00		10,03 ± 1,87	
2	16,30 ± 2,00		12,36 ± 1,87		2	12,92 ± 2,00		11,73 ± 1,87	
3	11,39 ± 2,00		11,19 ± 1,87		3	15,26 ± 2,00		14,63 ± 1,87	
4	15,25 ± 2,00		12,41 ± 1,87		4	14,22 ± 2,00		11,45 ± 1,87	
5	10,42 ± 2,00		11,86 ± 1,87		5	12,67 ± 2,00		12,29 ± 1,87	
6	14,23 ± 2,00		13,67 ± 1,87		6	14,36 ± 2,00		13,67 ± 1,87	

p>0,05 No significativo.

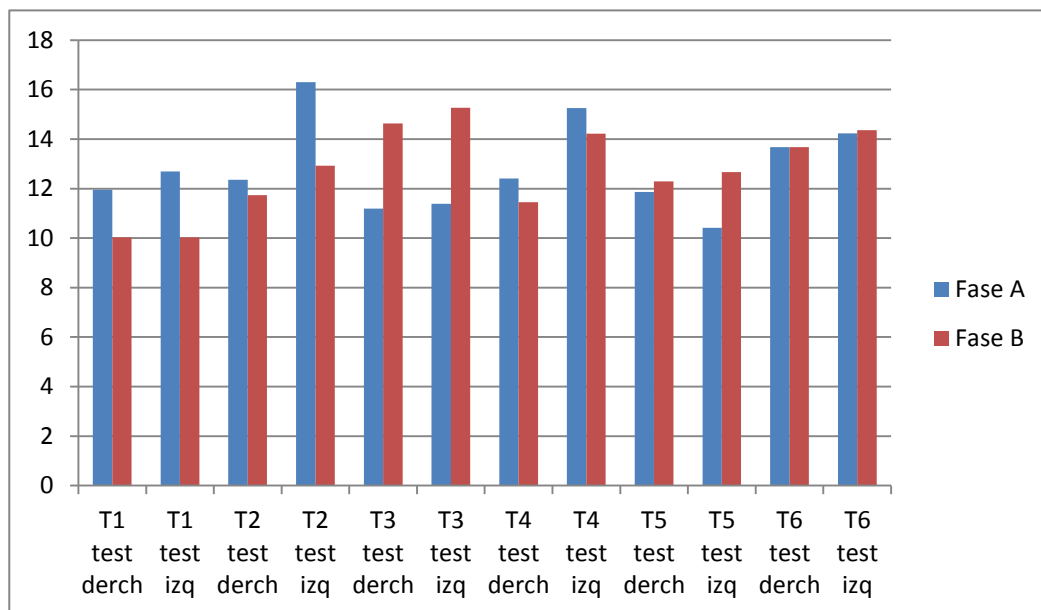


Figura 19. Comparación del volumen testicular de los testículos derechos e izquierdos.

Etehes (1996), reporta que el peso de ambos testículos puede alcanzar 25-35 g y que normalmente el testículo izquierdo es 0,5-3 g más pesado que el derecho, en el presente estudio aunque, los testículos no alcanzaron los pesos señalados, posiblemente sean referidos a líneas genéticas diferentes, si se observó, aunque sin significancia estadística ($p > 0,5$), un ligero aumento de los pesos absolutos, relativos y de volumen testicular de los testículos izquierdos.

Autores tales como Shalin y col., (1981) y Briggs y col., (1974), quienes trabajaron, los primeros, administrando aflatoxinas durante 8 semanas a dosis de 0 y 20 $\mu\text{g/g}$ y los segundos autores utilizando dosis de 20 μ de aflatoxinas por gramo de dieta durante 4 semanas en aves, coincidieron en la observación de una disminución del peso corporal, a diferencia de lo expresado en este trabajo donde no se encontró diferencia entre los pesos corporales, posiblemente debido a la duración del tratamiento. En cuanto a los pesos de los testículos estos autores antes mencionados, al igual que Clarke y col.,

(1986), no encontraron diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos lo cual coincide con los resultados obtenidos en esta investigación.

Ortatatli y col., (2002), reporta atrofia testicular ($p < 0,01$) por efecto de aflatoxina en gallos, en todos los grupos tratados, los testículos los describen de color amarillo pálido o blanco grisáceo y menos vascularizados, lo cual no fue observado en esta investigación probablemente debido a que estos autores utilizaron dosis más altas de aflatoxinas (5, 10 y 20 ppm) y por un mayor periodo de tiempo (4 semana).

y col., (2004), en ratas no encontraron cambios significativos en cuanto a peso corporal ni peso de los testículos coincidiendo con los resultados expresados en esta investigación, mientras que Salem y col. ,(2001) hallaron que el peso corporal de conejos disminuyó dependiendo de la dosis de aflatoxina y con la dosis baja mejoro en el periodo de recuperación; el peso relativo de los testículos también decreció y su efecto continuo durante el periodo de recuperación aunque el ácido ascórbico causo un leve incremento a diferencia de los datos obtenidos en el presente trabajo.

5.3.-Evaluación microscópica

Una de las lesiones observadas consistió en la presencia de degeneración vacuolar en células del epitelio germinal, la cual constituye la primera manifestación de daño celular y representa segmentos de retículo endoplasmático distendidos, esta degeneración vacuolar es una lesión reversible y no letal (Kumar y col., 2009). La presencia de vacuolas resultó ser más numerosa en los túbulos seminífero de las aves tratadas con aflatoxinas y éstas vacuolas en algunos casos van uniéndose hasta formar espacios de mayor tamaño en el epitelio (Figuras 20, 21 y 22).

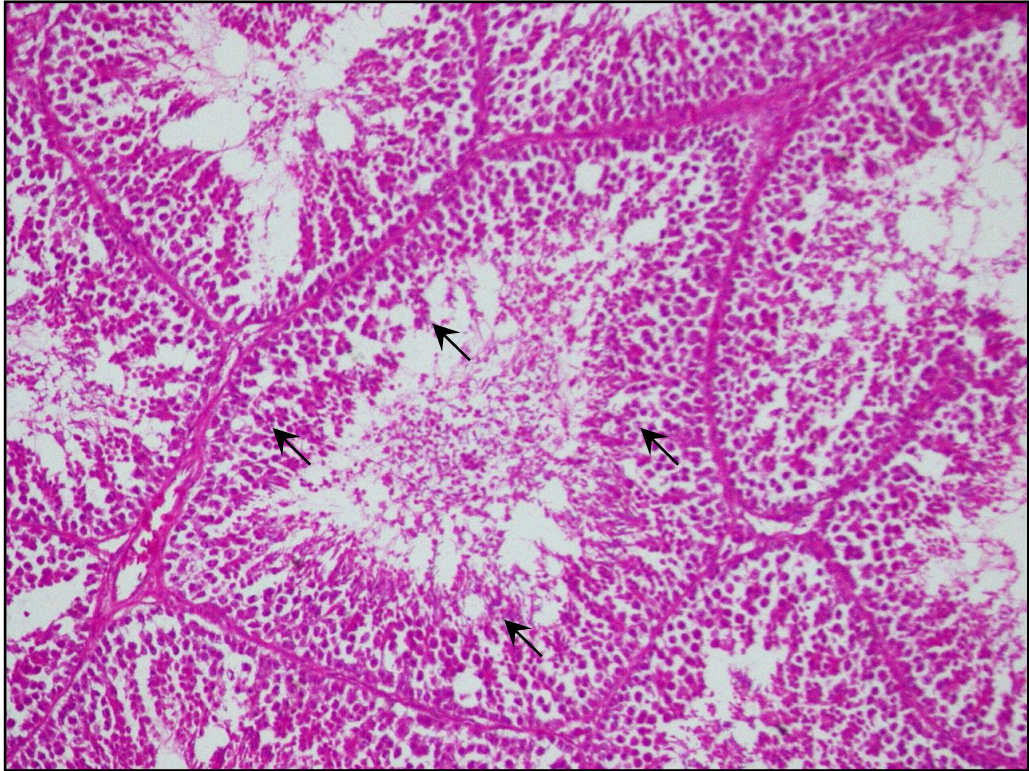


Figura 20. Obsérvese la presencia de vacuolas de varios tamaños y en diferentes zonas del epitelio germinal (flechas). Hematoxilina-Eosina.

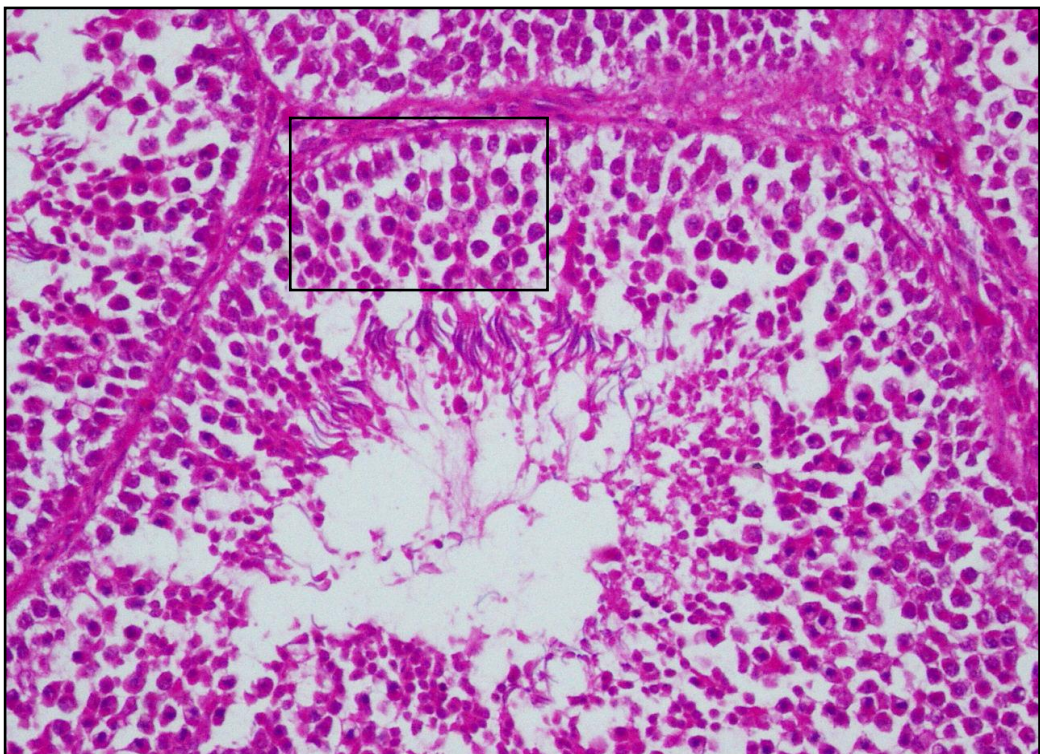


Figura 21. Obsérvese a mayor aumento la presencia de pequeñas vacuolas en diferentes zonas del epitelio germinal (recuadro). Hematoxilina-Eosina.

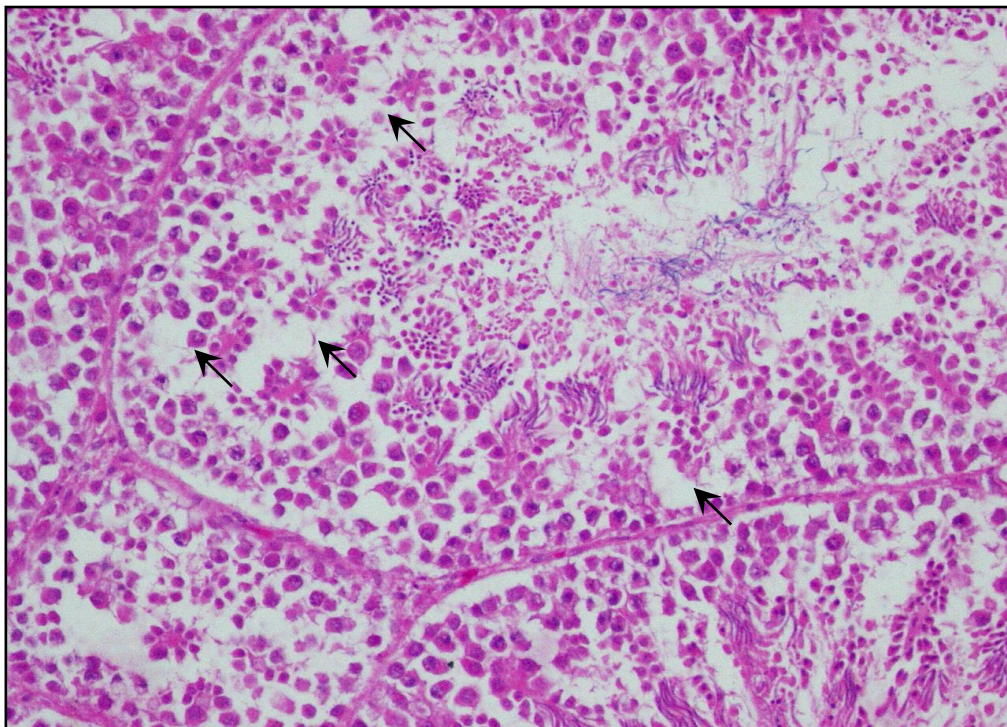


Figura 22. Obsérvese la presencia de vacuolas, que al unirse, permiten la formación de espacios en el epitelio germinal (flechas). Hematoxilina-Eosina.

La presencia de vacuolas observadas en el epitelio seminífero de los túbulos se expresa en la tabla 13 y puede apreciarse diferencias significativas ($p < 0,5$) entre los tratamientos 1 y 2 con los 3 y 4 y 5 y 6, mas no se observó diferencia entre las fases A y B, lo cual demuestra claramente que las aflatoxinas tuvieron un efecto negativo sobre el epitelio seminífero que fue proporcional a la dosis utilizada y que este efecto persistió en la fase B e incluso aumento el porcentaje de túbulos seminíferos con presencia de vacuolas, aunque no de manera significativa en la fase B (Figura 23).

Tabla 13. Número promedio de vacuolas por túbulos seminífero.

Fase A			Fase B		
Tratamiento	% Vacuolas/ Túbulo	Error estándar	Tratamiento	% Vacuolas/ Túbulo	Error estándar
1	11,33 ± 9,24 ^a		1	7,16 ± 9,24 ^a	
2	10,66 ± 9,24 ^a		2	9,50 ± 9,24 ^a	
3	45,50 ± 9,24 ^b		3	62,33 ± 9,24 ^{bc}	
4	57,00 ± 9,24 ^b		4	69,00 ± 9,24 ^{bcd}	
5	85,16 ± 9,24 ^{cde}		5	99,16 ± 9,24 ^e	
6	89,00 ± 9,24 ^{de}		6	127,16 ± 9,24 ^f	

a-f letras distintas en la misma fila o columna presentaron diferencias significativas p<0,05

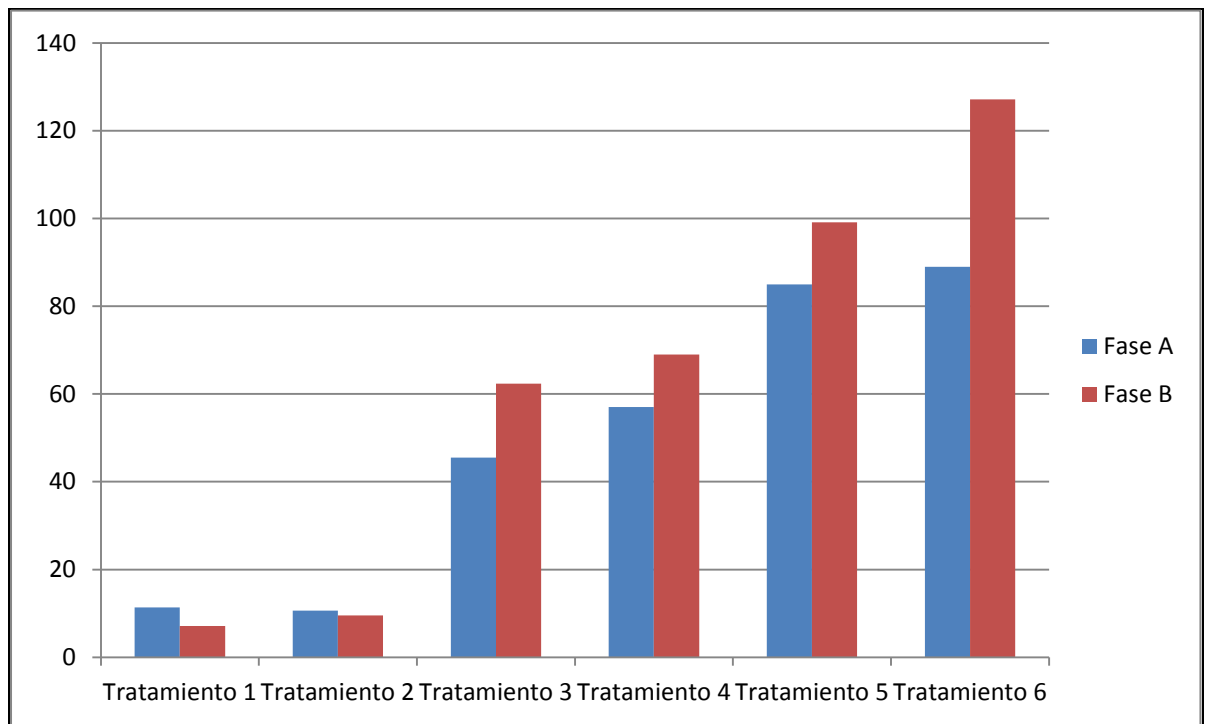


Figura 23. Número promedio de vacuolas por túbulos seminífero.

La descamación o disrupción del epitelio seminal ocurre como consecuencia del aumento de número y tamaño de las vacuolas produciendo una discontinuidad del patrón de las células germinales del epitelio seminífero, pudiendo observarse células de sertoli cerca de la membrana basal del túbulo (Figuras 24, 25 y 26)

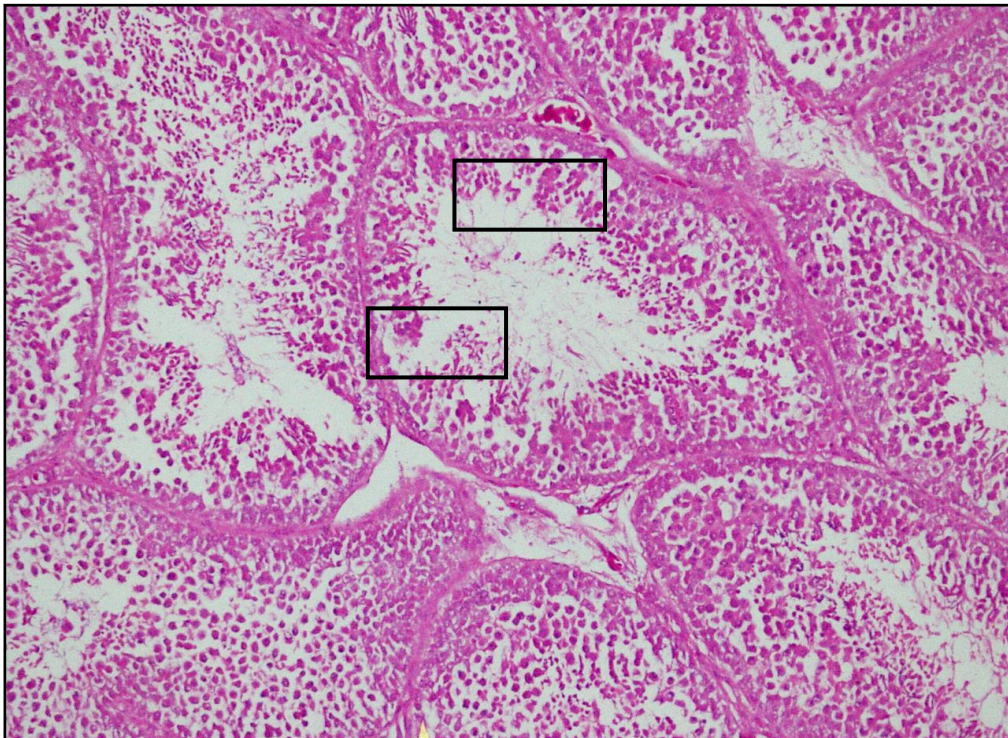


Figura 24. Nótese la pérdida de la arquitectura normal del epitelio germinal producida por los espacios formados debido al acumulo de vacuolas (recuadros) Hematoxilina-Eosina.

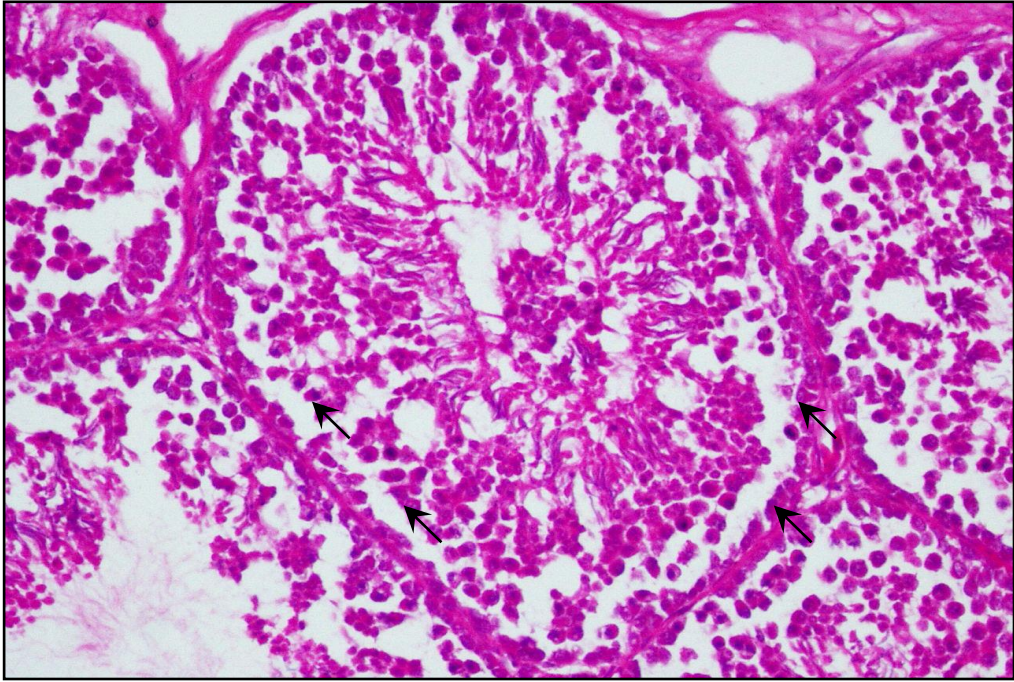


Figura 25. Obsérvese la disrupción o descamación del epitelio germinal (flechas) Hematoxilina-Eosina.

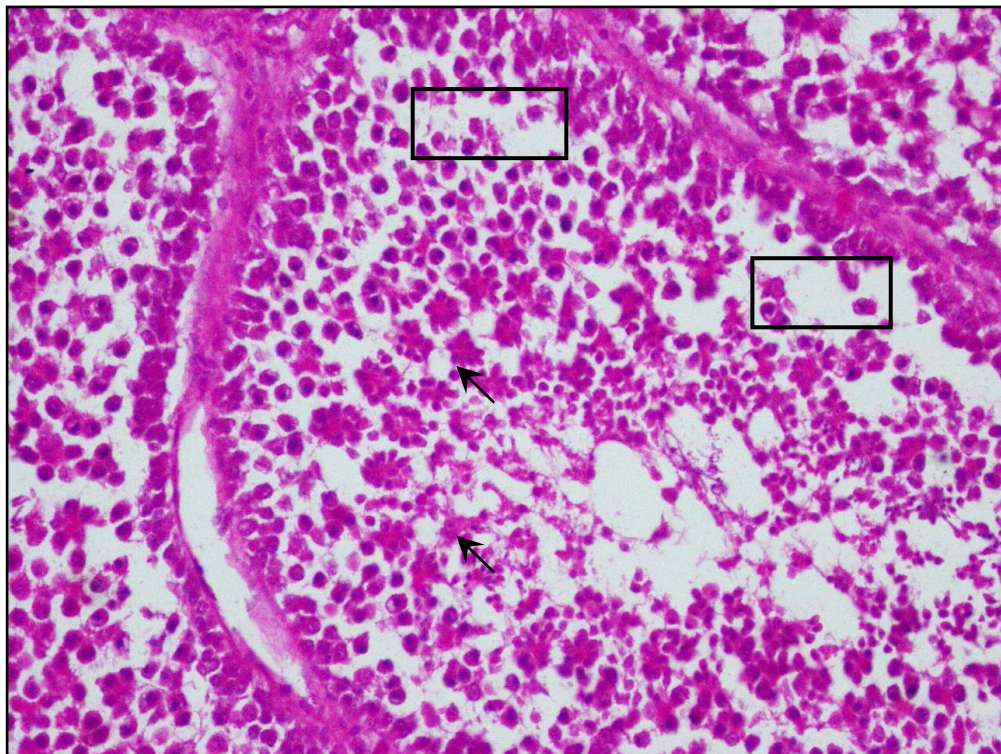


Figura 26. Obsérvese a mayor aumento la disrupción o descamación del epitelio germinal (recuadro) y la presencia de vacuolas (flechas). Hematoxilina-Eosina.

La presencia de túbulos seminíferos con descamación o disrupción del epitelio germinal también mostro un aumento proporcional a la dosis de aflatoxinas utilizadas (Tabla14), el cual se mantuvo en la fase B lo que sugiere que el efecto toxico residual persiste después de los 13 días de tratamiento, aunque si se observa una tendencia no significativa (Figura 27) a la disminución del porcentaje de túbulos seminíferos en la fase B; así mismo no se evidencio diferencias entre la utilización o no de la vitamina C.

Tabla 14. Porcentaje de túbulos seminíferos que mostraron descamación de su epitelio.

Fase A			Fase B		
Tratamiento	% TSD	Error estándar	Tratamiento	% TSD	Error estándar
1	2,16	± 1,68 ^a	1	2,16	± 1,68 ^a
2	1,83	± 1,68 ^a	2	2,00	± 1,68 ^a
3	16,66	± 1,68 ^{bc}	3	13,00	± 1,68 ^b
4	19,33	± 1,68 ^{cd}	4	18,50	± 1,68 ^{cd}
5	22,66	± 1,68 ^{de}	5	21,50	± 1,68 ^{de}
6	25,00	± 1,68 ^e	6	20,83	± 1,68 ^{cde}

TSD: túbulos seminíferos descamados.

a-b letras distintas en la misma fila o columna presentaron diferencias significativas $p < 0,05$

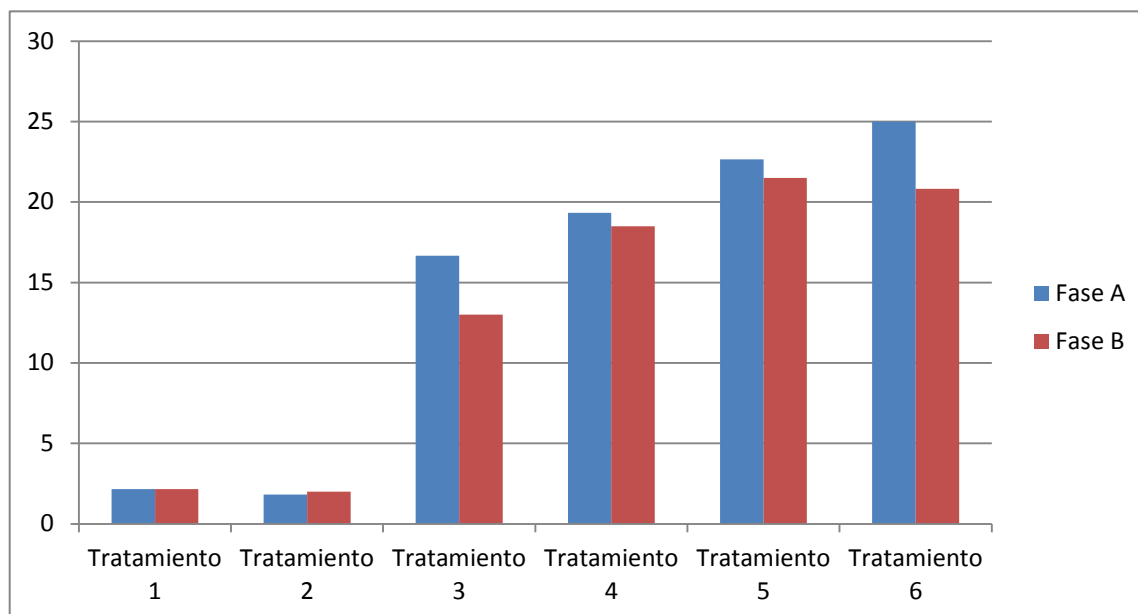


Figura 27. Porcentaje de túbulos seminíferos que mostraron descamación de su epitelio.

Las capas de células germinales formadas por espermatogonias, espermatocitos y espermátides resulto ir disminuyendo a medida que aumentaba la dosis aplicada de aflatoxinas, como consecuencia de la descamación del epitelio germinal (Figuras 28 y 29).

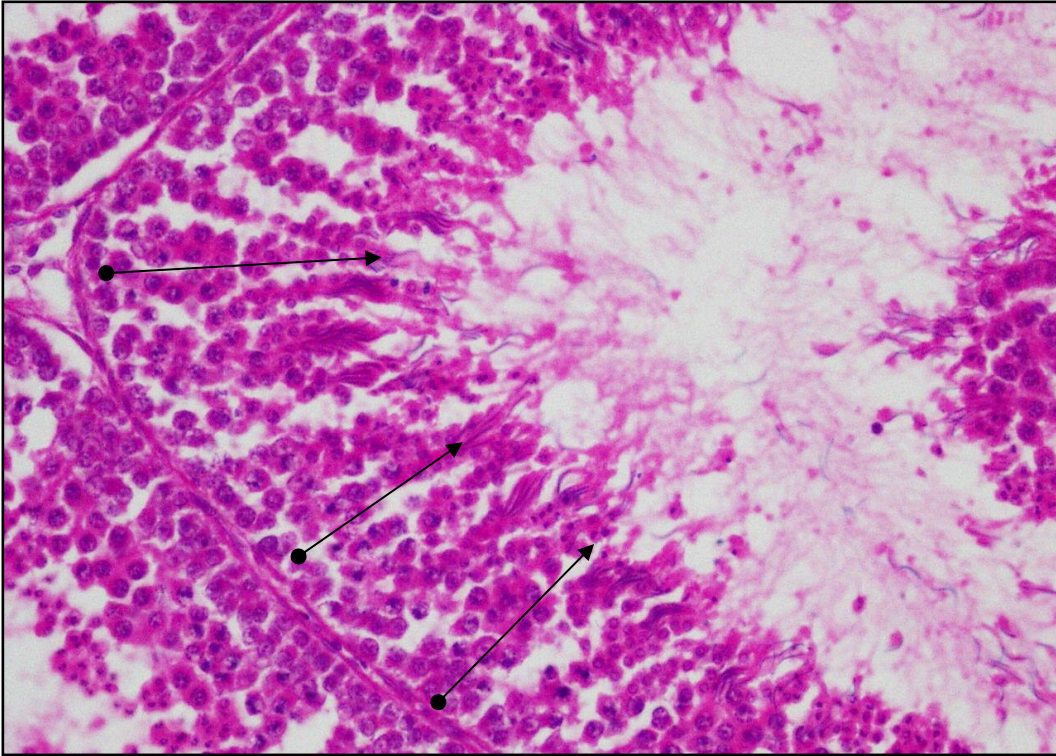


Figura 28. Obsérvese la distribución normal de las capas de células germinales en los túbulos seminíferos (flechas). Hematoxilina-Eosina.

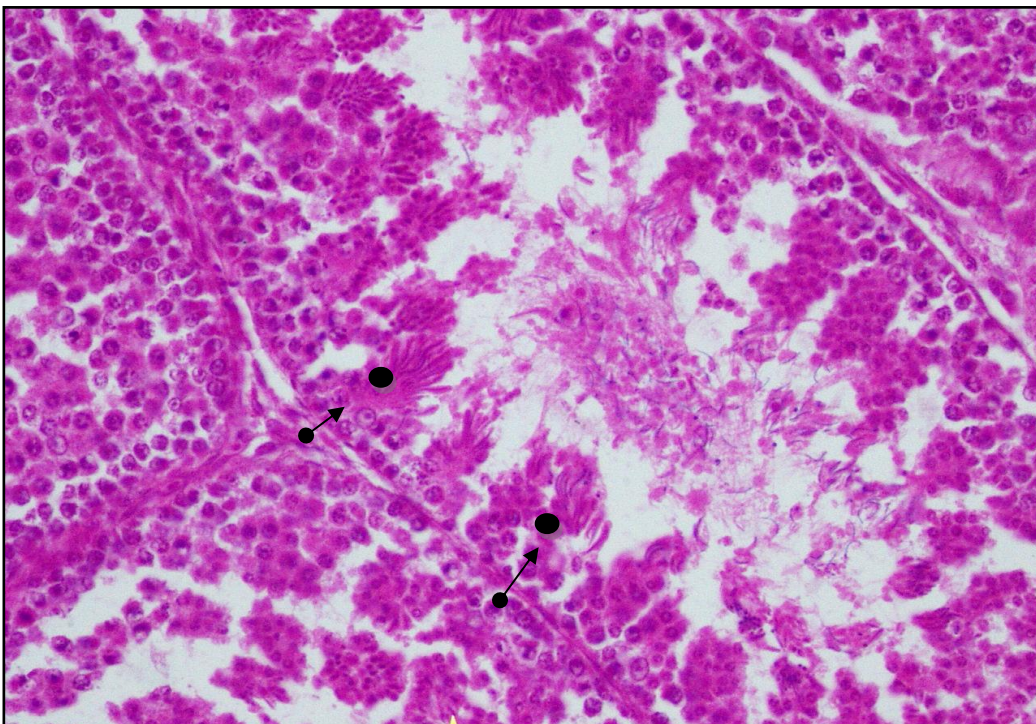


Figura 29. Obsérvese la disminución de las capas de células germinales en los túbulos seminíferos (flechas) con células de Sertoli cercanas a la membrana basal (círculos). Hematoxilina-Eosina.

El número de capas de células germinales por túbulo varió, en promedios, entre 6,58 y 8,58, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,5$); en la fase A los tratamientos 1 y 2 (controles) resultaron diferentes a los 3, 4, 5 y 6, y en la fase B el tratamiento 1 resultó diferente al resto de los tratamientos aplicados y el 2 fue igual al 3, 5 y 6. Entre las fases A y B se presentan diferencias entre los tratamientos 2 y 4 (Tabla 15).

Tabla 15. Numero de capas de células germinales por túbulo seminífero.

Fase A			Fase B		
Tratamiento	N° CCG	Error estándar	Tratamiento	N° CCG	Error estándar
1	8,58	$\pm 0,28^a$	1	8,51	$\pm 0,28^{ab}$
2	8,48	$\pm 0,28^{ab}$	2	7,20	$\pm 0,28^{cd}$
3	7,08	$\pm 0,28^{cd}$	3	7,23	$\pm 0,28^{cd}$
4	6,91	$\pm 0,28^d$	4	7,80	$\pm 0,28^{bc}$
5	6,71	$\pm 0,28^d$	5	6,76	$\pm 0,28^d$
6	6,78	$\pm 0,28^d$	6	6,58	$\pm 0,28^d$

N° CCG: número de capas de células germinales

a-c letras distintas en la misma fila o columna presentaron diferencias significativas $p < 0,05$.

Estos resultados demuestran, en general, un efecto negativo de las aflatoxinas en cuanto al número de capas de células germinales que persiste en la fase B del experimento (Figura 30) coincidiendo esto con los resultados del número de vacuolas y descamación de los epitelios seminíferos.

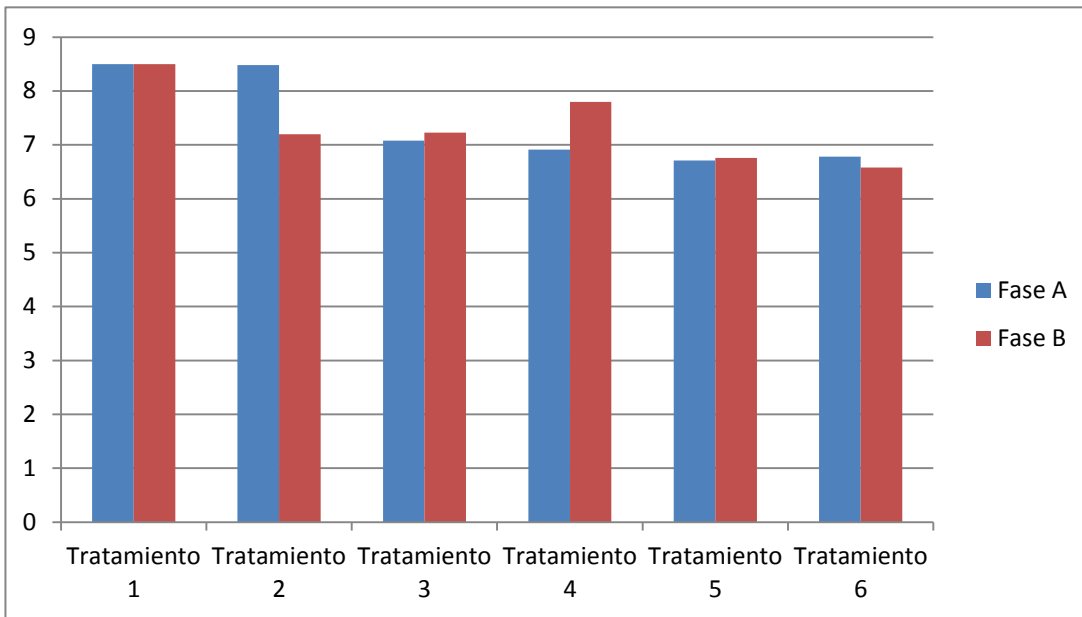


Figura 30. Número de capas de células germinales por túbulo seminífero.

Las mediciones realizadas del área externa e interna de los túbulos corresponden, la primera al área completa dentro del túbulo y la segunda a la luz del túbulo seminífero y están expresadas en mm^2 (Tabla 16), donde solo se observó diferencia significativa ($p < 0,05$) en el área interna de la fase A donde el tratamiento 1 resultó ser diferente al 3 y 4 mientras que el tratamiento 2 fue diferente al 3. Esta diferencia no es atribuible a los tratamientos aplicados.

Tabla 16. Áreas externa e interna de los túbulos seminíferos medidas en mm².

Fase A				Fase B					
Tratamiento	Área externa mm ²	Error estándar	Área interna mm ²	Error estándar	Tratamiento	Área externa mm ²	Error estándar	Área interna mm ²	Error estándar
1	0,080 ± 0,007		0,017 ± 0,002 ^{ab}		1	0,076 ± 0,007		0,020 ± 0,002 ^{abc}	
2	0,062 ± 0,007		0,013 ± 0,002 ^a		2	0,064 ± 0,007		0,019 ± 0,002 ^{abc}	
3	0,077 ± 0,007		0,030 ± 0,002 ^c		3	0,081 ± 0,007		0,023 ± 0,002 ^{bc}	
4	0,065 ± 0,007		0,024 ± 0,002 ^{bc}		4	0,071 ± 0,008		0,022 ± 0,003 ^{bc}	
5	0,069 ± 0,007		0,018 ± 0,002 ^{ab}		5	0,080 ± 0,008		0,018 ± 0,003 ^{ab}	
6	0,070 ± 0,007		0,018 ± 0,002 ^{ab}		6	0,074 ± 0,007		0,021 ± 0,002 ^{abc}	

a-c letras distintas en la misma fila o columna presentaron diferencias significativas p<0,05

En la tabla 17 se muestra la comparación de las áreas internas que representan a la luz de los túbulos seminíferos y del área celular correspondientes al epitelio germinal, esta última fue calculada al restar el área externa del área interna del túbulo.

Tabla 17. Áreas correspondientes al área celular (epitelio germinal) y área interna (luz de los túbulos seminíferos) medidas en mm².

Fase A				Fase B					
Tratamiento	Área celular mm ²	Error estándar	Área interna mm ²	Error estándar	Tratamiento	Área celular mm ²	Error estándar	Área interna mm ²	Error estándar
1	0,062 ± 0,006		0,017 ± 0,002 ^{ab}		1	0,056 ± 0,006		0,020 ± 0,002 ^{abc}	
2	0,049 ± 0,006		0,013 ± 0,002 ^a		2	0,044 ± 0,006		0,019 ± 0,002 ^{abc}	
3	0,046 ± 0,006		0,030 ± 0,002 ^c		3	0,058 ± 0,006		0,023 ± 0,002 ^{bc}	
4	0,040 ± 0,006		0,024 ± 0,002 ^{bc}		4	0,049 ± 0,007		0,022 ± 0,003 ^{bc}	
5	0,050 ± 0,006		0,018 ± 0,002 ^{ab}		5	0,062 ± 0,007		0,018 ± 0,003 ^{ab}	
6	0,052 ± 0,006		0,018 ± 0,002 ^{ab}		6	0,053 ± 0,006		0,021 ± 0,002 ^{abc}	

a-c letras distintas en la misma fila o columna presentaron diferencias significativas p<0,05

En la figura 31 observamos la comparación de las áreas correspondientes al epitelio germinal (área celular) y luz (área interna) de los túbulos seminíferos donde podemos observar que, el área interna en todos los casos es menor a las áreas de células germinales, esto no concuerda con los resultados obtenidos en el número de capas de celular germinales ya que a menor número de capas germinales deberíamos observar un área interna mayor y el área celular menor, esto podría deberse a que el equipo analizador de imágenes computarizado al determinar el área no considera los espacios ocupados por las vacuolas.

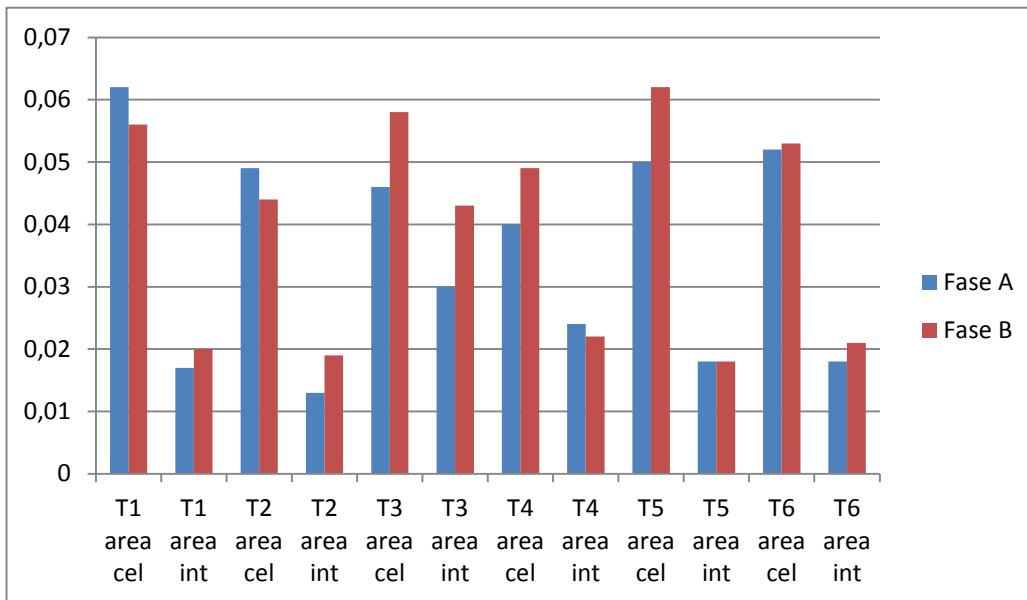


Figura 31. Comparación de las áreas correspondientes al epitelio germinal (área celular) y luz (área interna) de los túbulos seminíferos.

En relación al espacio intertubular, el cual fue medido en mm, se observó diferencias significativas ($p < 0,05$) en la fase A, tratamiento 2, quien resultado ser diferente a los tratamientos 1, 3, 4, y 6; y a su vez también diferente el tratamiento 2 en las fases A y B, las cuales no son atribuidas a los tratamientos aplicados (Tabla 18).

Tabla 18. Espacio intertubular medidos en mm.

Fase A			Fase B		
Tratamiento	Espacio Intert mm	error estándar	Tratamiento	Espacio Intert mm	error estándar
1	0,011	± 0,001 ^a	1	0,010	± 0,001 ^a
2	0,017	± 0,001 ^b	2	0,012	± 0,001 ^a
3	0,011	± 0,001 ^a	3	0,010	± 0,001 ^a
4	0,012	± 0,001 ^a	4	0,010	± 0,001 ^a
5	0,014	± 0,001 ^{ab}	5	0,010	± 0,001 ^a
6	0,012	± 0,001 ^a	6	0,013	± 0,001 ^{ab}

a-b letras distintas en la misma fila o columna presentaron diferencias significativas $p < 0,05$

En la figura 32 se representan de manera comparada los resultados sobre espacio intertubular observándose que en la fase A, a excepción del tratamiento 6 donde sus valores son similares, el espacio intertubular es mayor, lo cual podría indicar una recuperación de esta espacio en la fase B de la investigación, sin embargo en ningún caso fue observada una atrofia testicular la cual implicaría un aumento del espacio intercelular con una mayor presencia de tejido conectivo.

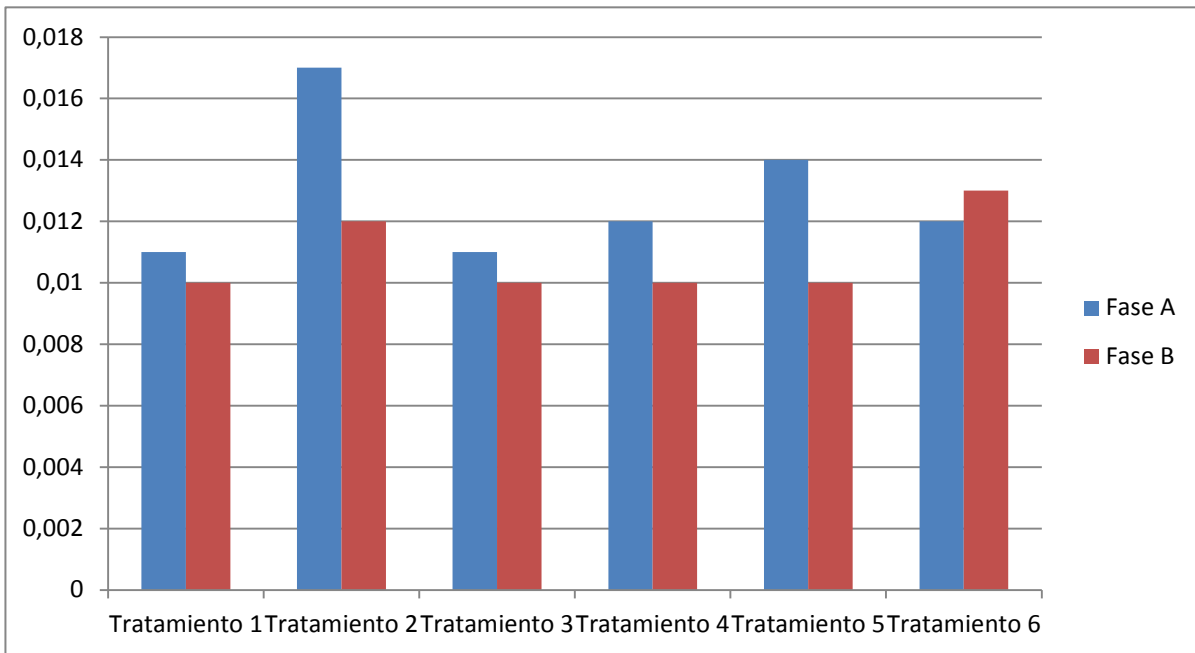


Figura 32. Espacio intertubular

Los efectos de las aflatoxinas producidos sobre la presencia de vacuolas, descamación del epitelio y disminución de capas de células germinales, en términos generales, continuaron en la fase B del tratamiento, es decir 13 días después de finalizado el consumo de alimento contaminado lo cual indicaría que el efecto de esta toxina altero el proceso de espermatogéne a pesar de haber sido posible la desintoxicación del animal, ya que Chen y col., (1984), no detectaron aflatoxinas en ningún tejido de pollos de engorde 4 días después de finalizado el consumo de alimento contaminado con aflatoxinas y Sawheney y col., (1973), reportan que el tiempo necesario para eliminar para eliminar las aflatoxinas del cuerpo de las gallinas ponedoras es de 66,82 horas.

A diferencia de la presente investigación, Briggs y col., (1974), no encontraron diferencias en las estructuras y desarrollo espermático con respecto al control en gallos con dosis de 20 µg/g durante 4 semanas y Hafez y col., (1982), evaluaron el efecto de las aflatoxinas en testículos de aves (dosis de 10 ppm por 3 semanas) sin conseguir alteraciones microscópicas en testículos.

Ortatatli y col., (2002) utilizando dosis de de 5, 10 y 20 ppm de aflatoxinas durante 4 semanas, encontraron que el estrato germinativo fue usualmente más fino y consistente en 2 a 4 capas de células germinales y en algunos casos en el epitelio seminal solo se encontró células de sertoli, en las aves control en la lámina epitelial de los túbulos seminíferos estaban compuestos por 8 a 10 capas de células germinales en diferentes estados de desarrollo de los espermatozoides así como descamación del epitelio germinativo, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación; mientras que los mismos autores reportan que algunos testículos mostraron engrosamiento de áreas intertubulares e incremento de células intersticiales e infiltración linfoides local lo cual no fue observado en el presente trabajo.

Sharlin y col., (1981), no encontraron cambios en el diámetro de los túbulos seminíferos de los testículos, una marcada disrupción en la organización del epitelio germinal y reducción del epitelio germinal, al igual que en la presente investigación.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Conclusiones

6.- CONCLUSIONES

- 1^a.- El pH seminal y la motilidad espermática de los gallos que ingirieron alimento contaminado con aflatoxinas a dosis de 0,02mg/kg y 5 mg/kg con y sin suplementación de ácido ascórbico en proporción de 1g/lit no estuvieron afectados por ninguno de los tratamientos ni por la fase de tratamiento.
- 2^a.- La vitalidad y morfoanomalias espermáticas presentaron diferencias significativa $p < 0,05$, las cuales no son atribuidas a los tratamientos aplicados sino a problemas con el colorante utilizado (eosina nigrosina) para su estudio.
- 3^a.- Los aspectos macroscópicos evaluados tales como peso vivo, pesos absolutos y relativos de los testículos izquierdo y derecho y volumen testicular, no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los gallos que ingirieron alimento contaminado con aflatoxinas a dosis de 0,02mg/kg y 5 mg/kg con y sin suplementación de ácido ascórbico en proporción de 1g en ninguna de las dos fases del tratamiento, aunque se observó un ligero aumento de los pesos absolutos, relativos y de volumen testicular de los testículos izquierdos sin significancia estadística ($p > 0.5$).
- 4^a.- Se observó degeneración vacuolar en el epitelio seminífero de los túbulos con diferencias significativas ($p < 0.5$) entre los tratamiento que fue proporcional a la dosis utilizada de aflatoxinas, en los grupos controles (1 y 2) vario entre 7,16 y 11,33 vacuolas por túbulo seminífero, los grupos que consumieron 0,02 mg/kg de aflatoxinas (3 y 4) presentaron 45,50 a 69,00 y los grupos que consumieron 5 mg/kg de aflatoxinas (5 y 6) 85,16 a 127,16. Este efecto persistió en la fase B y demuestran que las aflatoxinas tuvieron un efecto negativo sobre el epitelio seminífero y que este efecto se mantuvo 13 días después de finalizar el consumo de la toxina.

- 5^a.- La presencia de túbulos seminíferos con descamación o disrupción del epitelio germinal mostro un aumento proporcional a la dosis de aflatoxinas utilizadas ($p < 0.5$): en los grupos controles (1 y 2) vario entre 1,83 y 2,16 túbulos seminíferos que presentaron descamación, los grupos que consumieron 0,02 mg/kg de aflatoxinas (3 y 4) presentaron 13,00 a 19,33 y los grupos que consumieron 5 mg/kg de aflatoxinas (5 y 6) 20,83 a 25,00. Se observó una tendencia no significativa ($p > 0,05$) a la disminución del porcentaje de túbulos seminíferos con descamación en la fase B; así mismo no se evidencio diferencias entre la utilización o no de la vitamina C.
- 6^a.- Como consecuencia de la descamación del epitelio germinal las capas de células germinales formadas por espermatogonias, espermatocitos y espermátides fueron disminuyendo a medida que aumentaba la dosis aplicada de aflatoxinas: en los grupos controles (1 y 2) vario entre 7,29 y 8,58 capas de células germinales por túbulos seminíferos, los grupos que consumieron 0,02 mg/kg de aflatoxinas (3 y 4) presentaron 6,91 a 7,80 y los grupos que consumieron 5 mg/kg de aflatoxinas (5 y 6) 6,58 a 6,78. No se encontró diferencias entre las fases A y B de tratamiento ni entre la utilización o no de la vitamina C.
- 7^a.- La vitamina C (ácido ascórbico) a dosis de 1 g/lit no causo ningún efecto positivo sobre el desempeño reproductivo en gallos ni sobre la toxicidad de las aflatoxinas suministradas a dosis de 0,02mg/kg y 5 mg/kg durante 10 días.
- 8^a.- Las aflatoxinas suministradas a dosis de 0,02 mg/kg y 5 mg/kg durante 10 días no causaron alteraciones en la calidad seminal ni en los aspectos macroscópicos tales como peso y volumen testicular, pero si a nivel histológico los cuales persistieron posterior a los 13 días de finalizado el consumo de alimento contaminado con aflatoxinas, lo cual indica que fue afectado el proceso de espermatogénesis.

Recomendaciones

RECOMENDACIONES

Recomendaciones

7.- RECOMENDACIONES

- Realizar las evaluaciones de calidad semen con semen obtenido por eyaculación (masaje abdominal) de aves vivas y no obtenido post mortem para así poder evaluar otros parámetros como volumen seminal y concentración espermática.
- Realizar otros estudios con diferentes tiempos de duración y comprobar si la dosis sugerida (0,02 mg/k) por la Norma Covenin 1881-83 para Alimento Completo para Aves resulta ser inocua para las aves.
- Evaluar diferentes dosis y tiempos de aplicación de vitamina C sobre el desempeño reproductivo en gallos.
- Realizar estudios similares donde se evalúen niveles hormonales, tales como testosterona, en gallos.
- Evaluar la morfología ultraestructural del testículo de gallos tratados con aflatoxinas.
- Evaluar otros antioxidantes, como la vitamina E sola o en combinación con la vitamina C, sobre los efectos negativos de las aflatoxinas en el desempeño reproductivo de los gallos.

RESUMEN

8.- RESUMEN

Introducción y objetivos.-

Las micotoxinas son sustancias químicas tóxicas elaboradas como metabolitos secundarios por los hongos toxigénicos y entre ellas encontramos a las aflatoxinas. Los efectos producidos por esta toxina sobre los órganos reproductores de gallos, representan un importante problema para la industria avícola, ya que involucra la proliferación y perpetuidad de la especie. Como un aporte a la posible solución del mismo, se realizó una investigación de tipo experimental que tuvo como objetivo evaluar el efecto de las aflatoxinas sobre aspectos fisiológicos y morfológicos reproductivos en gallos (*Gallus gallus*) así como el efecto detoxificador de la vitamina C sobre los mismos.

Material y Métodos.-

Para llevar a cabo este estudio, el mismo fue dividido en dos etapas, la 1ª etapa consistió en la crianza de 100 pollitos hasta las 27 semanas de edad, provenientes de un mismo lote de reproductoras; en la 2ª etapa, las aves fueron divididas en 6 grupos de 12 aves cada uno, para un total de 72 gallos, y fue realizada en dos fase: fase A y fase B; durante la fase A se aplicaron seis tratamientos consistentes en la administración de dos dosis diferentes de aflatoxinas (vía alimento) y una dosis fija de vitamina C (vía agua de bebida) durante diez días, de la siguiente manera:

Tratamiento 1: 0 mg/kg aflatoxina 0g/litro de vitamina C; tratamiento 2: 0 mg/kg aflatoxina 1g/litro de vitamina C; tratamiento 3: 0,02 mg/kg aflatoxina 0g/litro de vitamina C; tratamiento 4: 0,02 mg/kg aflatoxina 1g/litro de vitamina C; tratamiento 5: 5,0mg/kg aflatoxina 0g/litro de vitamina C y tratamiento 6: 5,0 mg/kg aflatoxina 1g/litro de vitamina C.

Finalizada la aplicación de los tratamientos se sacrificó la mitad de las aves de cada grupo (6 aves por grupo) para obtener las muestras de semen postmortem, con el fin de hacer un análisis de calidad de semen, para lo cual, los testículos fueron extraídos, pesados y medidos. Se tomaron muestras de

cada testículo y fueron fijados en solución de Bouin y en formalina para ser procesados para histopatología. Luego de ejecutada la Fase A, las aves comenzaron a consumir alimento no contaminado y agua de bebida sin la presencia de vitamina C. Trece días después, fueron sacrificadas el resto de las aves (fase B) y se repitió la toma de muestras y análisis de las mismas, para evaluar el efecto del tratamiento cumplido un periodo de espermatogénesis.

Resultados y discusión.-

Se evaluó pH, motilidad, vitalidad y morfoanomalías espermáticas, peso corporal, peso y volumen testicular y microscópicamente fue evaluado número de vacuolas en epitelio germinal, número de túbulos seminíferos que presentaron descamación del epitelio germinal, número de capas de células germinales por túbulo seminífero, mediante microscopia óptica, y área total de túbulo seminífero, luz del túbulo seminífero, área de células germinales y espacio intertubular, mediante el uso de un equipo de análisis computarizado de imágenes (Modelo Leco IA32. USA). El pH, motilidad, vitalidad y morfoanomalías espermáticas, peso corporal, peso y volumen testicular no estuvieron afectados por ninguno de los tratamientos ni por la fase de tratamiento.

Sin embargo si se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) en la presencia del número de vacuolas (en controles varió entre 7,16 y 11,33 vacuolas por túbulo seminífero; los grupos que consumieron 0,02 mg/kg de aflatoxinas presentaron 45,50 a 69,00 y los grupos que consumieron 5 mg/kg de aflatoxinas 85,16 a 127,16) y descamación del epitelio germinal (grupos controles varió entre 1,83 y 2,16 túbulos seminíferos que presentaron descamación, los grupos que consumieron 0,02 mg/kg de aflatoxinas presentaron 13,00 a 19,33 y los grupos que consumieron 5 mg/kg de 20,83 a 25,00).

Este efecto persistió en la fase B y demuestran que las aflatoxinas tuvieron un efecto negativo sobre el epitelio seminífero. Como consecuencia de la descamación del epitelio germinal, las capas de células germinales fueron disminuyendo a medida que aumentaba la dosis aplicada de aflatoxinas (grupos controles vario entre 7,29 y 8,58 capas de células germinales por

túbulos seminíferos, los grupos que consumieron 0,02 mg/kg de aflatoxinas presentaron 6,91 a 7,80 y los grupos que consumieron 5 mg/kg de aflatoxinas 6,58 a 6,78). No se encontró diferencias entre las fases A y B de la 2 etapa del tratamiento.

SUMMARY

Summary

9.-SUMMARY

Introduction and objectives.-

Mycotoxins are toxic chemicals produced as secondary metabolites by toxigenic fungi, among which are aflatoxins. The effects of this toxin on reproductive organs of roosters are a major problem for the poultry industry, since it has direct impact on the proliferation and perpetuation of species. In order to contribute to the solution of this problem an experimental trial that aimed to evaluate the effect of aflatoxins on reproductive physiological and morphological aspects in roosters (*Gallus gallus*) and the detoxifying effect of vitamin C was carried out.

Material and Methods.-

This study was divided into two stages. The 1st stage consisted of raising 100 chicks from the same breeder flock up to the 27 weeks of age; the 2nd stage was concerned with dividing into 6 groups of 12 birds each a total of 72 roosters. This stage was subdivided into phase A and phase B; during phase A six treatments were applied in the administration of two different doses of aflatoxins (orally administered with food) and a fixed dose of vitamin C (orally administered with drinking water) for ten days, as follows:

Treatment 1: 0 mg/kg aflatoxin 0 g/lit vitamin C; treatment 2: 0 mg/kg aflatoxin 1 g/lit vitamin C; treatment 3: 0.02 mg/kg aflatoxin 0 g/lit vitamin C; treatment 4: 0.02 mg/kg aflatoxin 1 g/lit vitamin C; treatment 5: 5.0 mg/kg aflatoxin, 0 g/lit vitamin C and treatment 6: 5.0 mg/kg aflatoxin 1 g/lit vitamin C.

After treatment application, 50% in each group (6 birds per group) were euthanized for postmortem sperm samples in order to analyze semen quality. The testes were removed, weighed and measured. Samples were taken from each testis and fixed in formaldehyde and Bouin's to be processed for histopathology. After phase A, the animals were fed with uncontaminated food and drinking water without vitamin C. After thirteen days, the remaining of both groups were euthanized (phase B) and repeated sampling and analysis was carried out in order to evaluate the effect of treatment once a period of spermatogenesis had been covered.

Results.-

pH, motility, sperm vitality, morphologic abnormalities, body weight, testicular weight and volume were evaluated. Microscopically, the number of vacuoles in germinal epithelium, the number of seminiferous tubules with germinal epithelium desquamation as well as the number of germ cell layers per seminiferous tubule were evaluated. Seminiferous tubule total area, seminiferous tubule lumen, and germ cell area intertubular space were evaluated by using computerized image analysis (Model Leco IA32. USA). PH, motility, sperm vitality morphologic abnormalities, body weight, testicular volume and weight were not affected by any treatment.

However, significant difference ($p < 0.05$) was found in the presence of the number of vacuoles (in control groups it ranged between 7.16 and 11.33 vacuoles by seminiferous tubule; the groups which consumed 0.02 mg / kg aflatoxin presented from 45.50 to 69.00 and groups who consumed 5 mg/kg of aflatoxin, from 85.16 to 127.16) and desquamation of the germinal epithelium (control groups varied between 1.83 and 2.16 seminiferous tubules showing desquamation, groups which consumed 0.02 mg / kg aflatoxin showed 13.00 to 19.33 and the groups which took 5 mg / kg, from 20.83 to 25.00).

This effect persisted in phase B and this demonstrates that aflatoxins had a negative effect on the seminiferous epithelium. As a result of germinal epithelial desquamation, germ cell layers decreased as the aflatoxin dose increased (in control groups the germ cell layers of seminiferous tubules varied between 7.29 and 8.58, the groups that consumed 0.02 mg/kg of aflatoxin showed between 6.91 and 7.80 and the groups which took 5 mg/kg of aflatoxins between 6.58 and 6.78). No differences were found between phases A and B of the 2nd stage of treatment.

Summary

AGRADECIMIENTOS

Summary

10.-AGRADECIMIENTOS

A La Universidad del Zulia y La Universidad de Córdoba por la oportunidad de participar en el programa de Doctorados en Conjunto.

A los profesores Dr. Miguel Ángel Sierra y Dr. Aniceto Méndez por su invaluable colaboración y apoyo en la realización de esta tesis.

Al Médico Veterinario José Delgado y a la empresa PROTINAL Zulia por la donación de las aves utilizadas en la investigación.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Zulia) en la persona de la Dra. Gladys Molero por haber cedido las instalaciones donde se desarrolló el ensayo.

Al Laboratorio de Micotoxinas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela en la persona del Profesor Claudio Mazzani por la donación del cultivo utilizado en la investigación.

Al Laboratorio Biolab C.A. en la persona de la Dra. Nayda Urdaneta por la gran colaboración del cultivo y contaminación base del alimento utilizado en esta investigación.

A la Planta de Alimentos Balanceados Granja la Rosa por la colaboración en la fabricación del alimento y contaminación del material base utilizado durante el ensayo.

AL Profesor Armando Quintero jefe del Laboratorio de Andrología de la facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia por su colaboración en el procesamiento de las muestras.

Summary

Al Laboratorio de Morfofisiología de la facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia por permitirme utilizar sus instalaciones.

A mis compañeros de trabajo, Profesor Vicente Vila, Gladys Hidalgo, José Manuel Rodríguez y Mariela Mavárez por su valiosa colaboración durante la ejecución de la fase experimental.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

10.-AGRADECIMIENTOS

A La Universidad del Zulia y La Universidad de Córdoba por la oportunidad de participar en el programa de Doctorados en Conjunto.

A los profesores Dr. Miguel Ángel Sierra y Dr. Aniceto Méndez por su invaluable colaboración y apoyo en la realización de esta tesis.

Al Médico Veterinario José Delgado y a la empresa PROTINAL Zulia por la donación de las aves utilizadas en la investigación.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Zulia) en la persona de la Dra. Gladys Molero por haber cedido las instalaciones donde se desarrolló el ensayo.

Al Laboratorio de Micotoxinas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela en la persona del Profesor Claudio Mazzani por la donación del cultivo utilizado en la investigación.

Al Laboratorio Biolab C.A. en la persona de la Dra. Nayda Urdaneta por la gran colaboración del cultivo y contaminación base del alimento utilizado en esta investigación.

A la Planta de Alimentos Balanceados Granja la Rosa por la colaboración en la fabricación del alimento y contaminación del material base utilizado durante el ensayo.

AL Profesor Armando Quintero jefe del Laboratorio de Andrología de la facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia por su colaboración en el procesamiento de las muestras.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Morfofisiología de la facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia por permitirme utilizar sus instalaciones.

A mis compañeros de trabajo, Profesor Vicente Vila, Gladys Hidalgo, José Manuel Rodríguez y Mariela Mavárez por su valiosa colaboración durante la ejecución de la fase experimental.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

11.- BIBLIOGRAFÍA

- AGNES V. F. y AKBARSHA, M. A. 2003. Spermatotoxic effect of aflatoxin B₁ in the albino mouse. *Food acahem Toxicol.* 41(1) pp. 119-130.
- AIRE, T. 2002. Morphology changes in the efferent ducts during the main phases of the reproductive cycle of birds. *J. Morphol.* 253 (1) pp. 64-75.
- AIRE, T. 2000. Active spermiphagy in the initial part of the proximal efferent duct of the epididymis of normal domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Res Vet Sci.* 68 (2) pp. 135-140.
- AIRE, T y JOSLING, D. 2000. Ultrastructural study of the luminal surface of the ducts of the epididymis of gallinaceous birds. *Onderstepoort J Vet Res.* 67(3) pp.191-199.
- AIRE, T. 1997. The structure of the interstitial tissue of the active and resting avian testis. *Onderstepoort J Vet Res.* 64(4) pp. 291-299.
- AIRE, T. 1982. The rete testis of birds. *J Anat.* 135 (1) pp. 97-110.
- AMAKYE-ANIM, J., LIN, T. L., HESTER, P. Y., THIAGARAJAN, D., WATKINS, B. A. y WU, C. C. 2000. Ascorbic acid supplementation improved antibody response to infectious bursal disease vaccination in chickens. *Poult Sci.* 79 (5) pp. 680-688.
- ARRIETA, D., PÉREZ, M. HERNÁNDEZ, J., OVIEDO, M., MIRANDA, S. y LUENGO. A. 2008. Efecto del Consumo de Cultivo de Levaduras *Saccharomyces Cerevisiae* y/o Selenio en Pollos de Engorde Expuestos a Bajos Niveles de Aflatoxina B₁ en la Dieta. 2: Morfología Hepática. *Rev. Cientif. FCV-LUZ.* XVIII (1) pp. 93-102.
- ARRIETA, D., PÉREZ-ARÉVALO, M., GÓMEZ, C., MOLERO, G., NOVOA, E., RINCÓN, H. y ASCANIO E. 2006. Efecto del alimento contaminado con aflatoxina B₁ (0,07 mg/kg) sobre la morfología hepática y actividad enzimática sérica (AST y ALT) en pollos de engorde. *Rev. Cientif. FCV-LUZ.* XVI (1) pp. 39- 47.
- AUSTIN, K., COCKRUM, R., JONS, A. ALEXANDER, B. y CAMMACK, K. 2012. Renin mRNA is upregulated in testes and testicular cells in response to treatment with aflatoxin B₁. *Theriogenology.* 77(2) pp. 331-337.
- BAHR, J. M. y BAKST, M. R. 1989. Aves. En: Reproducción e inseminación artificial en animales. 5^a ed. (Ed. E. S. E. Hafez). Editorial Interamericana. México. pp. 419-422.

- BARNES, H. J., FLETCHER, O. J. y ABDUL-AZZ, T. 2008. Reproductive Sistema. En: Avian Histophotology. Editado por Fletcher, O. J. 3ª ed. Publisher by American Association of Avian Pathologists. pp. 349-368.
- BENJAMIN, y RADLO, J. 1987. Nuevos Adelantos en la Detección de Micotoxinas. Industria Avícola. 34 (11) pp. 18-26.
- BRIGGS, D. M., WYATT, R. D. y HAMILTON P. B. 1974. The effect of dietary aflatoxina on semen characteristics of mature broiler breeder males. Poul Sci. 53 (6). pp. 2115-2119.
- BUCK, W. y OSWEILER G., 1981. Toxicología veterinaria clínica y diagnóstica. 2ª ed. Editorial Acribia. Zaragoza. España. pp. 319-329.
- BUENO, L. 1995. Algunos Aspectos de Interés sobre Mohos Toxigénicos y su Importancia en el Deterioro de los Alimentos. 2ª parte. Rev Cubana Cs. Vet. 24 (2) pp. 33-39.
- CALVALHEIRO, A. 1983. Aflatoxinas y Aflatoxicosis: Revisión. Rev. Avicultura. 27 (1 y 2) pp. 77-81.
- CHURCH, D. C. y POND, W. G. 1992. Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales. Vitaminas liposolubles. 3ª ed. Editorial Limusa. México. pp. 253-254.
- CLARKE, R. N. y OTTINGER, M. A. 1988. Factors related to decreased testosterone concentrations in the peripheral circulation of the maturing male chicken (*Gallus domesticus*) fed aflatoxin. Anim Reprod Sci. 18 (1) pp. 25-34
- CLARKE, R. N., DOERR, J. A. y OTTINGER, M. A. 1987. Age-related changes in testicular development and reproductive endocrinology associated with aflatoxicosis in the male chicken. Biol Reprod. 36 (1) pp. 117-124.
- CLARKE, R. N., DOERR, J. A. y OTTINGER, M. A. 1986. Relative importance of dietary aflatoxin and feed restriction on reproductive changes associated with aflatoxicosis in the maturing white leghorn male. Poul. Sci. 65 (12) pp. 2239-2245.
- COVENIN 1881-83. Norma Venezolana Covenin 1983. Alimento Completo para Aves. Comisión Venezolana de Normas Industriales Ministerio de Fomento, Venezuela.
- CREEL, L. H., MAURICE, D. V., LIGHTSEY, S. F. y GRIMES, L. W. 2001. Stability of dietary ascorbic acid and the effect of supplementation on

- reproductive performance of broiler breeder chickens. *Br. Poult Sci.* 42 (1) pp. 96-101.
- CRESPO, R. y SHIVAPRASAD H. L. 2010. Decrease of fertility in a broiler breeder flock due to testicular atrophy. *Avian Dis.* 54(1) pp.142-145.
- DOMNGANG, F., y BASSIR, O. 1981. Studies on the in vitro metabolism of aflatoxin B₁ and G₁ in the liver of rats fed at various levels of vitamin C. *Biochem Pharmacol.* 30 (24) pp. 3317-3322.
- EIJK, C. 2003. Las nuevas tecnologías mejoran la eliminación de las micotoxinas. *Avicultura profesional.* 21 (1) pp. 17-20.
- ERDPGAN, Z., ERDOGAN, S., CELIK, S. y UNLU, A. 2005. Effects of ascorbic acid and cadmium induced oxidative stress and performance of broilers. *Biol. Trace Elem Res.* 104 (1) pp. 19-32.
- ESPADA, Y., DOMINGO, M., GOMEZ, J. y CALVO, M. 1992. Pathological lesions following an experimental intoxication whit aflatoxin B₁ in broiler chickens. *Res Vet Sci.* 53 (3) pp. 275-279.
- ETEHES, R. J. 1996. Reproducción aviar. Editorial Acribia, Zaragoza. España. pp 339.
- FROMAN, D. P., KIRBY, D. J. y PROUDMAN, J. A. 2000. Reproducción en Aves de Corral: macho y hembra. En: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7^a ed. (Ed. E. S. E. Hafez y B. Hafez). Mc Gram-Hill Internacional. México pp. 243-248.
- GARNER, D. L. y HAFEZ, E. S. E. 2000. Espermatozoides y plasma seminal. En: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7^a ed. (Ed. E. S. E. Hafez y B. Hafez). Mc Gram-Hill Internacional. México pp. 99
- GIAMBRONE, J., DIENER, U. L., DAVIS, N. D., PANANGALA, U. S. y HOERR, F. J. 1985. Effects of Aflatoxin on Young Turkeys and Broiler Chickens. *Poult. Sci.* 64 (9) pp.1678-1684.
- GIULIODORI, M. 2002. Aspectos farmacológicos de la nutrición en: Farmacología y terapéutica veterinaria de Botana, L.; Landoni, F. y Martin-Jiménez T. Editorial McGraw-Hill Internacional. Madrid. pp. 664-667.
- GOLDBLATT, T. A. 1969. Aflatoxin, Scientific Background, Control and Implications. Academic Press. New York. pp. 2-10.

- GONZÁLEZ-MORÁN, M. G. y SORIA-CASTRO, E. 2010a. Histological and stereological studies on Leydig cell in the of *Gallus domesticus* from pre-hatching to sexual maturity. Anim Reprod Sci. 120 (1-4) pp. 129-135.
- GONZÁLEZ-MORÁN, M. G. y SORIA-CASTRO, E. 2010b. Changes in the tubular compartment of the testis of *Gallus domesticus* during development. Br Poult Sci. 51(2) pp. 296-307.
- HADGES, R. D. 1974. The histology of the fowl. Academic Press INC. London. pp. 300-325.
- HAFEZ, H., MEGALLA, S., ABDEL-FATTAH, H. y KAMEL, Y. 1982. Aflatoxin and aflatoxicosis. II. Effects of aflatoxin on ovaries and testicles in mature domestic fowls. Mycopathologia. 77(3) pp.137-139.
- HARVEY, R. B., KUBENA, L. F., ELISSALDE, M. H. y PHILLIPS, T. D. 1993. Efficacy of Zeolitic Ore Compounds on the Toxyty of Aflatoxin to Growing Broiler Chickens. Avian Dis. 37 (1) pp. 67-73.
- HOERR, F. J. 1995. Micotoxicosis. En: Enfermedades de las Aves. 9ª ed. (Ed. B. W. Calnek). Editorial Manual Moderno. México. pp. 1104-1109.
- HUFF, W., KUBENA, L., HARVEY, R., CORRIER, D y MOLLENHAUER, H. 1986. Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. Poult. Sci. 65 (10) pp. 1891-1899.
- ISABROWN. 2005. Guía de Manejo. Service production et assistance technique. Francia. pp. 2-8.
- JANSSEN, S., KIRBY, J., HESS R., RHOADS, M., BUNICK, D., BAILEY, K. PARSONS, C., WANG, H. y BAHR, J. 2000. Identification of epididymal stones in diverse rooster populations. Poult. Sci. 79 (4) pp. 568-578.
- JORDAN, F. y PATTISON, M. 1998. Enfermedades de las aves. Capítulo 33. Enfermedades micóticas. 3ª ed. Editorial Manual Moderno. México. pp. 247-248.
- KART-HEINZ, W. y DIETER, H. 1994. Sistema reproductor masculino. En: Histología Veterinaria de Dieter, H, 2ª ed. Editorial Acribia S. A. Zaragoza, España. pp. 245-266.
- KING, A. S. 1982. Sistema Urogenital de las Aves. En: Anatomía de los Animales Domésticos. Tomo II. 5ª ed. (Ed. Robert Getty). Salvat Editores. Barcelona, España. pp. 2112-2118

- KUNKLE, R. y RICHARD, J. 1998. Mycoses and Mycotoxicoses. En: laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. American association of avian pathologists. 4^a ed. Pennsylvania. USA. pp. 92-99.
- LEESON, S., DÍAZ, G. J. y SUMMERS, J. D. 1995. Poultry Metabolic Disorders and Micotoxins. Universities Books. Canadá. pp. 249-293.
- LEESON, T., LEESON, R. y PAPARO, A. 1988. Texto /atlas de histología. Capítulo 16. Interamericana McGraw-Hill. México. pp. 635-667.
- LOZANO, M. y DIAZ, G. 2006. Microsomal and cytosolic biotransformation of aflatoxin B₁ four poultry species, Br Poult Sci. 51. 47(6) pp. 734-741.
- MALEBANE, I., NGAMBI, J. NORRIS, D y MBAJIORGU, C. 2010. Effect of dietary ascorbic acid supplementation level on productivity, mortality and carcass characteristics of chickens. Trop. Anim Health Prod. 42(8) pp. 1711-1718.
- MARTÍNEZ-MORENO, C. G., PALMA, L., CARRANZA, M., HARVEY, S., ARÁMBULO, C. y LUNA, M. 2011. Cellular and intracellular distribution of growth hormone in the adult chicken testis. Gen Comp Endocrinol. 172 (3) pp. 344-357.
- MARTÍNEZ, A. 1997. Microbiótica Fúngica y Niveles de Aflatoxina y Fumonisinias en Oleaginosas y Cereales en Venezuela. 2do. Congreso Latinoamericano de Micotoxicología. Universidad Central de Venezuela. Maracay. Venezuela. pp. 92-93.
- MARTÍNEZ, A. y DÍAZ, G. 1997. Incidencia de Aflatoxinas en Maní y Semillas Comestibles. 2do. Congreso Latinoamericano de Micotoxicología. Universidad Central de Venezuela. Maracay. Venezuela. pp. 82-83.
- MARTÍN-RILLO, S., MARTÍNEZ, E., GARCÍA-ARTIGA, C. y DE ALBA, C. 1996. Boar semen evaluation in practice. Reprod. Domest. Anim., 35 (3) pp. 519-526.
- MAURICE, D., LIGHTSEY, S. y TOLER, J. 2004. Ascorbic acid biosynthesis in hens producing strong and weak eggs shells. Br. Poult. Sci. 45 (3) pp. 404-408.
- MAYNARD, L., LOOSLI, J., HINTZ, H y WARNER, R. 1992. Nutricio animal. Capítulo 11 Las vitaminas. 7^a Ed. Editorial McGraw-Hill. México. pp. 67-369.

- MCDANIEL, C. 1996. Factors affecting fertility. Georgia Poultry Conference. The classic center, Athens, Georgia. Octubre del 15 al 16. pp.54- 56.
- MC DONALD, P., EDWARDS, N. A., GREENHALGH, J. F., y MORGAN, C.A. 2002. Nutrición Animal. Capítulo 5 Vitaminas. 6^a ed. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp. 88-89.
- MEDINA, J. C., FIERRO, J. A, MUÑOZ, J. y RIVERA, L. 1998. Actualidades sobre Problemas Causados por Micotoxinas. Curso de Enfermedades Digestivas de las Aves. ANECA. México. pp. 79- 78.
- MOGHADDAM, A., HASSANPOUR, H. y MOKHTARI, A. 2009. Oral supplementation with vitamin C improves intestinal mucosa morphology in the pulmonary hypertensive broiler chicken. Br Poult Sci. 50 (2) pp.175-180.
- NAIN, S., WOJNAROWICZ, C., LAARVELD, B y OLKOWSKI, A. 2008. Effects of dietary vitamin E and C supplementation on heart failure in fast growing commercial broiler chickens. Br Poult Sci. 49 (6) pp. 697-704.
- NETKE, S., ROOMI, M. W., TSAO, C. y NIEDZWIECKI, A. 1997. Ascorbic acid protects Guinea Pigs from acute aflatoxin toxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 143 (2). pp. 429-435.
- NORTH, M. y BELL, D. 1993. Manual de producción avícola. Capítulo 26 Vitaminas, minerales e ingredientes menores. 3^a ed. Editorial Manual Moderno. México. pp. 529-544.
- OGUZ, H., KURTOGLU F., BIRDANE, V. y BIRDANE, Y. 2002. Evaluation of biochemical characters of broiler chickens during dietary aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. Res Vet Sci. 73 (1) pp. 101-103.
- ORTATATLI, M., OGUZ, H., HATIPOGLU, F. y KARAMAN, M. 2005. Evaluation of pathological changes in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. Res Vet Sci . 78 (1) pp. 61-68
- ORTATATLI, M., CIFTCI, M. K., TUZCU, M. y KAYA, A. 2002. The Effects of aflatoxin on the reproductive system of roosters. Res Vet Sci. 72 (1) pp. 29-36.
- OSUNA, O. 1991. Micotoxinas. Problemas de Salud Pública, Efectos en Aves. Método de Análisis y Nuevos Tratamientos. Seminario de Actualización, Nutrición y Patologías Asociadas a Nutrición de Aves. SOVVEA. Venezuela. pp. 1- 26.

- PERALTA, M., MIAZZO, R. y VIVAS, A. 2003. Efecto de la furazolidona sobre las funciones espermatogénica y endocrina de testículos de pavo (*Meleagris gallipavo*). RIA. 32(2) pp. 63-78
- PÉREZ-ARÉVALO M., BRACHO-BRACHO, J., ASCANIO, E. y ARRIETA-MENDOZA D. 2012. Lesiones en pollitos recién nacidos causadas por aflatoxina B₁ transmitida vía transovárica. Rev. Científ. FCV-LUZ / Vol. XXII.(3) pp. 217-224.
- PÉREZ-ARÉVALO M., ASCANIO, E., BRACHO, J., ROMÁN, R., ARRIETA-MENDOZA, D. y RINCÓN, H. 2007. Mortalidad embrionaria en pollitos causada por aflatoxina B₁ transmitida vía transovárica. Rev. Científ FCV-LUZ. XVII. (3): pp. 275-279.
- PÉREZ, M., SOTO, J, ROMÁN, R., ANGULO, I., ARRIETA D. y VALERIS, R. 2001. Efectos de la aflatoxina B₁ sobre la producción de huevos de consumo. Científ. FCV-LUZ. XI. (4) pp. 337-341.
- PIEBIGER, T. 1942. Histología y anatomía microscópica comparada de los animales domésticos. Editorial Labor S. A. 7ª ed. Barcelona, Madrid. pp 292-303.
- QURESHI, M. A.; BRAKE, J., HAMILTON, P. B., HAGLER, W. M. y NESHEIM, S. 1998. Dietary Exposure of Broiler Breeders to Aflatoxin Results in Immune Dysfunction in Progeny Chicks. Poult. Sci. 77 (6) pp. 812-819.
- REQUENA, F., SAUME, E. y LEÓN A. 2005. Micotoxinas: riesgo y prevención. Zootecnia Tropical. 23 (4) pp. 393-410.
- RINCON, C., BORREL, S. y BORREL, J. 1999. Métodos de lucha contra micotoxinas. XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura. Museo de la Nación. Perú. Del 21 al 24 de septiembre. pp 414-417.
- ROSENSTRAUCH, A., ALLAN, A. y FRIEDLANDER, M. 1994. Spermatozoa retention by Sertoli cells during the decline in fertility in aging roosters. Biol Reprod. 50 (1) 129-136.
- ROSPIGLIOSI, J. y FIGUEROA, E. 2003. Desarrollo anatomo-histológico del testículo del nacimiento a la madurez de la codorniz (*Coturnix coturnix*) variedad japonesa. Rev Inv Vet Perú. 14 (1) pp.74-78.
- ROTHWELL, B. 1973. The ultrastructure of Leydig cells in the testis of domestic fowl. J Anat. 166 (2) 245-253.
- SALEM, M. H., KAMEL, K. I., YOUSEF, M. I., HASSAN, G. A. y EL_NOUTY, F. D. 2001. Protective Role of ascorbic acid to enhance semen quality of

- rabbits treated with sublethal doses of aflatoxin B₁. *Toxicology*. 162 (3) pp. 209-218.
- SHARLIN, J. S., HOWARTH, B. R., THOMPSON F. N. y WYATT, R. D. 1981. Decreased reproductive potential and reduced feed consumption in mature white leghorn males fed aflatoxin. *Poult. Sci.* 60 (12) pp. 2701-2708.
- SHARLIN, J. S., HOWARTH, B. R. y WYATT, R. D. 1980. Effects of dietary aflatoxin on reproductive performance of mature white leghorn males. *Poult. Sci.* 59 (6) pp. 1311-1315.
- SHUAIB, F., EHIRI, J., ABDULLAHI, A., WILLIAMS, J. y JOLLY, P. 2010. Reproductive health effects of aflatoxins: a review of the literature. *Reprod Toxicol.* 29 (3) pp. 262-270.
- SONMEZ, M., TURK, G., y YUCE, A. 2004. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male wistar rats. *Theriogenology*. 63 (7) pp.2063-2072.
- STARKL, V. 2005. Micotoxinas: Desactivación usando absorción o biotransformación. XIX Congreso Latinoamericano de Avicultura. Centro de convenciones Atlapa. Panamá. Del 4 al 7 de octubre. p. 25.
- SWANSON, E.W. y BEARDEN, H.I., 1951. An eosin-nigrosin stain for differentiating live-dead bovine spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 10 (2) 981-987
- TABATAEI, S., BATAVANI, R. A. y TALEBI, A. R. 2009. Comparison of semen quality in indigenous and ross broiler breeder roosters. *J Anim Advanc.* 8 (1) pp. 90-93
- TAJIK, P., MIRSHOKRAEE, P. y KHOSRAVI, A. 2007. Effects of different concentrations of aflatoxin B₁ on ram epididymal and ejaculatory sperm viability and motility *in vitro*. *Pak J Biol Sci.* 10 (24) pp.4500-4504.
- TIBA, T., SHIMIZU, Y., KITA, I y TSUBOTA, T. 1993. Regularities and irregularities in the structure of the seminiferous epithelium in the domestic Fowl (*Gallus domesticus*). *Anat Histol Embryol.* 22 (3) pp. 254-263.
- UZUN, F., KALENDER, S., DURAK, D., DEMIR, F. y KALENDER, Y. 2009. Malathion-induced testicular toxicity in male rats and protective effect of vitamins C and E. *Food Chem Toxicol.* 47 (8) pp.1903-1908.
- VAAMONDE, G. 1996. Micotoxinas. en: *Toxicología de los Alimentos*. 2^a. ed. (Ed. A. A. Silvestre). Editorial Hemisferio Sur. Argentina. pp. 153-193.

- VADILLO, S., PÍRIZ, S. y MATEOS, E. 2002. Manual de microbiología veterinaria. McGraw Hill Interamericana. Madrid. pp. 548-549.
- VAN-DYCK, S. y ADAMS, C. 2003. Dietary antioxidants antiradical active nutriens. Intern Poul Production. 11 (1) pp.15-19.
- WHITEMAN, C. y Y BICKFOD, A. 1983. Manual de Enfermedades de las Aves. pp. 160- 163.
- YABE, K., ANDO, Y. y HAMASAKI, T. 1988. Biosynthetic relationship among aflatoxins B₁, B₂, G₁ y G₂. Appl Environ Microbiol. 54 (8) pp. 2101-2106.
- YOUNG, J., STAGSTED, J., JENSEN, S., KARLSSON, A. y HENCKEL, P. 2003. Ascorbic acid, α – Tocopherol, and oregano supplements reduce stress-induced deterioration of chicken meat quality. Poul. Sci 82 (8) pp. 1343-1351.
- YOUSEF, A. y CARLSTROM, C. 2006. Mohos y levaduras. Capítulo 3. En: Microbiología de los alimentos: manual de laboratorio. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. pp. 45-64.
- YOUSEF, M. I, ABDALLAH, O. A. y KAMEL, K. I. 2003. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. Anim. Sci Reprod. 76 (1-2) pp. 99-111.

Bibliografía
