

A mis padres y hermano



A Robert



A Miriam Cortes G.

A quien quiero como una hermana, por ser una gran amiga en todo momento, por acompañarme en estos últimos años de mi vida, y por compartir mis alegrías y tristezas. Gracias por tus consejos.

A mis todos mis amigos

R. Viridiana (Nubecilla), Evelyn A. (eve), Verónica J. (verito), Cristina (verde), Eduardo E. (Chanf), Omar (Grande), Balam Q. (Galy), Pedro (Piedra), Andrés G. (Andy), Ricardo (Mudo), Juan C. (Guango), Pedro (Peter), Carlos A. (Chacón), Hugo (Huguito). Por el equipo que formamos y por apoyarnos mutuamente en nuestra formación profesional, por su amistad, por compartir su tiempo conmigo, por esos momentos de trabajo y des estrés, porque son personas que fueron y serán parte de mi vida y que de alguna u otra manera me ayudaron a caminar siempre hacia adelante y por que hasta el momento, seguimos siendo amigos. Los quiero.

A mis amigos y compañeros de laboratorio

Alexis O. (aletzis), Carlos A. (charly boy), Rafael T. (rafa), Claudia R. (clau), Beatriz (bety), Diana, Claudia O. (super clau), Adriana, Andrea C. y Raúl. Por todos aquellos momentos dentro y fuera del laboratorio y todos esos días de travesuras y sonrisas que alegraron los días en el laboratorio. Mejores compañeros no pude haber tenido. Gracias.

*A la Universidad Nacional Autónoma de México
y en especial a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Por permitirme ser parte de una generación más.*



AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Patricia Rosas Saucedo

Gracias por su tiempo, por su apoyo así como por la sabiduría que me transmitió en el desarrollo de mi formación profesional por haber guiado el desarrollo de este trabajo y llegar a la culminación del mismo.

A los miembros del jurado:

Dra. María Esther Cruz Beltrán
Dra. Patricia Rosas Saucedo
Biól. Carlos Martínez Montoya
Dra. Leticia Morales Ledesma
Dra. Lucila Álvarez Barrera

Por su colaboración y sus importantes aportaciones, además de su disponibilidad, paciencia y orientación durante la revisión de esta tesis.

A la Dra. Lucila Álvarez Barrera y a la Unidad de Investigación en genética y toxicología Ambiental (UNIGEN), por su apoyo así como por los conocimientos que me transmitió en la realización de esta tesis.

A la MVZ. Adriana Altamirano y a el MVZ Román Hernández y al personal técnico del bioterio de la FES-Zaragoza por el mantenimiento y cuidado brindado a los animales utilizados en este proyecto.

A Alexis Paulina Ortega García y Carlos Alberto Álvarez Librado por su importante colaboración para la realización de la parte experimental de este proyecto y las intensas jornadas de trabajo.

A la M. en C. Ma. De la Luz Adriana Cabrera Prado, M. en C. Claudia C. Ortega Rodríguez y Biól. Rafael Tenorio Barrientos por cada uno de sus consejos y enseñanzas para la elaboración de esta tesis.

A cada uno de mis compañeros de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**EFFECTO DE LA INGESTA DIARIA DE PICOLINATO DE CROMO
SOBRE LA RESPUESTA OVULATORIA, LA TASA DE
FERTILIDAD Y EL DESARROLLO PRENATAL DE
LA PROGENIE DEL RATÓN ADULTO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA

NATALIA GABRIELA CHÁVEZ SALCEDO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

MÉXICO

2013



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**EFFECTO DE LA INGESTA DIARIA DE PICOLINATO DE CROMO
SOBRE LA RESPUESTA OVULATORIA, LA TASA DE
FERTILIDAD Y EL DESARROLLO PRENATAL DE
LA PROGENIE DEL RATÓN ADULTO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA

NATALIA GABRIELA CHÁVEZ SALCEDO

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Patricia Rosas Saucedo

**Realizada en el Laboratorio de Neuroinmunoendocrinología de la
Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción. Unidad
Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza. Facultad de
Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.**

MÉXICO

2013

ÍNDICE	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO.....	5
1. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario	5
2. Ovario.....	8
• <i>Características morfofisiológicas</i>	
• <i>Foliculogénesis</i>	
• <i>Atresia folicular</i>	
• <i>Esteroidogénesis</i>	
• <i>Ovulación</i>	
3. Ciclo estral.....	18
4. Infertilidad en la mujer.....	20
5. Toxicología reproductiva.....	22
6. Cromo.....	25
7. Picolinato de cromo.....	30
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
RESULTADOS.....	41
1. Respuesta ovulatoria del ratón adulto a la administración de eCG y hCG (Prueba de ovulación inducida).	
2. Efectos de la ingesta diaria de diferentes concentraciones de PicCr sobre la respuesta ovulatoria inducida por gonadotropinas.	
3. Estudio de los efectos de la ingesta diaria de PicCr sobre la fertilidad de las hembras adultas.	
4. Analizar las características morfológicas y esqueléticas de las crías nacidas de madres que fueron consumidoras de PicCr.	
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62

RESUMEN

El picolinato de cromo (PicCr) es un suplemento alimenticio que ha presentado un aumento indiscriminado en su consumo, principalmente por adultos jóvenes en edad reproductiva con el fin de quemar grasas y marcar músculos. Estudios realizados con diferentes modelos biológicos, describen al PicCr como agente clastogénico, mutagénico y citotóxico. En varones se alteran los parámetros seminales durante la ingesta de PicCr. La ingesta de este suplemento por ratones hembra gestantes, provoca anormalidades óseas en la descendencia.

Con base en lo anterior en este estudio se analizaron los efectos del PicCr sobre la respuesta ovulatoria y la fertilidad, así como la posibilidad de alteraciones en la progenie de hembras que fueron consumidoras, utilizando como modelo al ratón hembra adulto.

Para analizar los efectos de la ingesta diaria de diferentes concentraciones de PicCr sobre la respuesta ovulatoria, animales de tres meses de edad se dividieron en los siguientes grupos experimentales: testigo, aceite de maíz [vehículo] (Vh) y PicCr (0.12, 0.36, 0.60, 1.20 y 1.80 μg). Tanto el PicCr como el Vh se administraron por vía oral durante 40 días. Todos los grupos se sometieron a la prueba de ovulación inducida administrando eCG y hCG.

Los efectos del PicCr sobre la tasa de fertilidad se evaluaron administrando a cada grupo una de las siguientes concentraciones de PicCr 0.12, 0.60, 1.20 μg , además un grupo tratado con Vh y uno más de animales testigo. La ingesta fue de 90 días. Se colocaron dos hembras con un macho de fertilidad comprobada. La presencia del tapón espermático se consideró como día cero de preñez. Las hembras preñadas se sacrificaron a los 18 días de gestación. A la autopsia se abrió el útero y se contó el número de implantes, reabsorciones y fetos vivos y muertos.

Para analizar los efectos del PicCr sobre el desarrollo prenatal de la progenie, se evaluaron las características morfológicas y esqueléticas de las crías de madres que fueron consumidoras de PicCr. Los fetos obtenidos al día 18 de gestación, se pesaron individualmente y se evaluó la presencia de alteraciones morfológicas. Los fetos se procesaron para evidenciar las estructuras óseas. Se registró la presencia de

anormalidades esqueléticas (falta de osificación) en cabeza, extremidades superiores e inferiores, cola y esternebras.

Los resultados mostraron que la respuesta ovulatoria de los animales sometidos a la ingesta diaria de 0.60 y 1.20 μg de PicCr fue menor en comparación con el resto de los grupos experimentales. La tasa de fertilidad de las hembras que consumieron 0.60 y 1.20 μg de PicCr, disminuyó respecto al grupo tratado con Vh. El número de implantes fue similar entre los grupos tratados con PicCr y el Vh. La frecuencia de hembras que presentaron reabsorciones se incrementó en los grupos que fueron previamente tratados con 0.60 y 1.20 μg de PicCr, respecto al grupo Vh. El 100% de los fetos estuvieron vivos. El peso de los fetos de las madres que fueron consumidoras de PicCr disminuyó de manera dosis dependiente. Se observó un aumento significativo en la frecuencia de fetos con anormalidades esqueléticas en cabeza, extremidades, cola y esternebras, de madres que fueron previamente tratados con 0.12, 0.60 y 1.20 μg de PicCr, respecto al grupo Vh.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la ingesta prolongada de PicCr perjudica la salud reproductiva de la hembra y que sus efectos representan un riesgo en el desarrollo normal de las crías aún después de haber suspendido el consumo de este suplemento.

INTRODUCCIÓN

En la especie humana, la infertilidad es una condición que afecta del 15 al 20% de las parejas en edad reproductiva (ESHRE, 1996).

En los últimos años la incidencia de infertilidad a nivel mundial está en aumento, de tal forma que el estudio de la pareja infértil se ha enfocado a considerar diferentes factores de riesgo asociados con la infertilidad (Bentley, 2000).

La edad de la mujer es uno de los factores más importantes en una pareja con problemas de infertilidad. La edad promedio en la que una mujer desea quedar embarazada ha aumentado considerablemente, su educación así como la necesidad de un avance profesional constante, la han llevado a posponer su decisión sobre el embarazo. Elevados niveles de estrés físico o psíquico, así como la exposición a agentes químicos pueden interrumpir o desorganizar el balance hormonal entre el cerebro, la hipófisis y los ovarios. Esta interrupción puede generar un desequilibrio entre los estrógenos y la progesterona, e inducir cambios en la duración y regularidad del ciclo menstrual y de la ovulación (NIOSH, 1999).

La presión por conservar un peso corporal adecuado, ya sea por problemas de salud como la obesidad o peor aún por cumplir con esquemas de belleza, marca la tendencia a utilizar productos que promuevan la quema de grasa y el aumento de masa muscular, siendo uno de ellos el picolinato de cromo (PicCr).

El cromo (Cr) es un elemento mineral esencial que ha recibido atención considerable ya que se le atribuyen algunos efectos benéficos sobre la función biológica del ser humano, tales como acelerar el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y

proteínas. Esto ha propiciado la ingesta de PicCr, ya que tiene una mayor biodisponibilidad del mineral cromo y por lo tanto es el de mayor absorción.

Debido a la influencia del cromo en el metabolismo del azúcar y de las grasas, los investigadores han explorado su potencial para promover la pérdida de peso y mejorar la composición corporal (menos grasa y más músculo).

Además se ha mostrado que el PicCr ocasiona efectos deletéreos a nivel genético, lo que ha llevado a analizar la posibilidad de regular su uso (Vincent, 2004).

En los últimos años los efectos de la suplementación con PicCr sobre la composición corporal y parámetros seminales, han suscitado una fuerte polémica entre distintos investigadores (González y col., 2006; Rosas, 2009), pero poco se sabe sobre sus efectos en la función reproductiva en la hembra.

Dado que en años recientes ha aumentado el consumo de PicCr por adultos jóvenes en edad reproductiva, en este estudio se analizó el efecto de la ingesta diaria de PicCr sobre la respuesta ovulatoria, la tasa de fertilidad y el desarrollo prenatal de la progenie del ratón adulto.

MARCO TEÓRICO

1. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario

El hipotálamo controla al sistema nervioso autónomo y al sistema endocrino y de esta manera la homeostasis corporal. Se ubica en un área cerebral cuya vasculatura, así como la presencia de numerosas vías neurales convergentes y divergentes, le permiten realizar la integración de sus aferencias nerviosas y químicas que se originan en áreas extra hipotalámicas que generan los mecanismos que regulan las funciones neuroendocrinas (Snell, 1999; Yen, 2001).

El hipotálamo es una estructura bilateral que se localiza en la base del diencefalo y forma las paredes laterales y el piso del tercer ventrículo. En el hipotálamo las neuronas forman agrupaciones que reciben el nombre de núcleos. Tomando como referencia la distribución de éstos, el hipotálamo se divide en cuatro regiones: área preóptica, hipotálamo anterior, medio y posterior (Silverman y col., 1994; Palkovits, 2000).

La participación del hipotálamo en la función reproductiva es principalmente por intermedio de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), que es un decapeptido cuya secuencia de aminoácidos es pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂. Las neuronas que sintetizan GnRH (GnRHérgicas) no están organizadas en núcleos, su distribución es en redes laxas y difusas y su número es pequeño a diferencia de otros sistemas neuronales (aproximadamente 1500 en la rata) (Fink, 1986; Silverman y col., 1994).

Alrededor de dos tercios del total de las neuronas GnRHérgicas proyectan sus fibras hacia la eminencia media donde liberan la GnRH en los capilares que conforman el sistema portal hipotálamo-hipofisiario y de esta manera llega a la hipófisis (Merchenthaler y col., 1989; King y Rubin, 1995).

La hipófisis se ubica en una depresión del hueso esfenoides que en el humano recibe el nombre de silla turca. La hipófisis consiste de dos porciones que difieren notablemente: la neurohipófisis que libera vasopresina y oxitocina y la adenohipófisis, la cual produce varias hormonas entre las que se encuentran las gonadotropinas (hormona estimulante del folículo [FSH], hormona luteinizante [LH] y prolactina [PRL]), la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH), la hormona del crecimiento (GH) y la hormona estimulante de los melanocitos (MSH) (Gardner, 1981; Everett, 1994).

Las funciones ováricas son reguladas por diversas señales tanto hormonales como neuroendocrinas que se generan en diferentes regiones del sistema nervioso central y en el propio ovario. Estas señales son integradas por el hipotálamo, que en respuesta secreta GnRH, la cual estimula en la adenohipófisis la secreción de FSH y LH. La secreción de GnRH es pulsátil, cuya frecuencia y magnitud representan un código que determina la cantidad de gonadotropinas liberadas y la proporción entre ambas (De La Lastra y Leal, 1989) (Figura 1).

La FSH y la LH son glucoproteínas sintetizadas y secretadas por los gonadotropos de la adenohipófisis. Están compuestas por dos subunidades, la α que es común a FSH y LH y la β que al ser diferente les confiere su especificidad biológica (Bousfield y col., 2006).

Ambas gonadotropinas se vierten al torrente sanguíneo y llegan a su órgano blanco, el ovario. Bajo el estímulo de las gonadotropinas, la secreción de estrógenos por el ovario va en aumento hasta alcanzar la máxima concentración en la etapa preovulatoria y así incrementar y mantener la respuesta de la hipófisis a la GnRH. En estas condiciones ocurre la liberación prevulatoria de LH que conduce a la ovulación (Fink, 1986; Richards y Hedin, 1988).

Tras la expulsión del ovocito, el folículo se transforma en cuerpo lúteo. Los esteroides secretados por el cuerpo lúteo inhiben el eje hipotálamo-hipofisario desactivando la elevada liberación de FSH y LH, lo que impide el desarrollo de más folículos.

Los estrógenos producidos por el ovario causan inhibición de la secreción, tanto de GnRH como de FSH y LH, completándose así un circuito de retroalimentación hipotálamo-hipófisis-ovárico. Este efecto inhibitorio de los estrógenos se ve potenciado por la progesterona (Prieto y col., 2002; Sánchez, 2003).

Los estrógenos producidos por el ovario pueden tanto inhibir (retroalimentación negativa) como estimular (retroalimentación positiva) la secreción de GnRH.

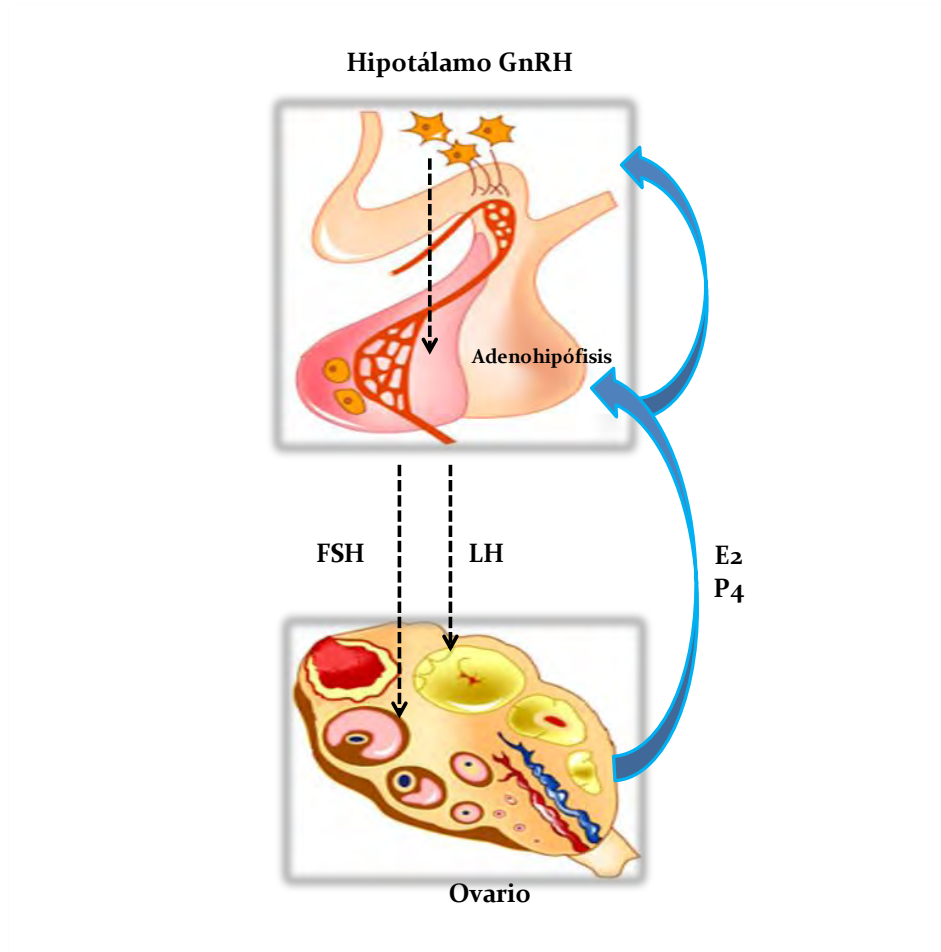


Figura 1. Esquema que muestra la regulación neuroendocrina de las funciones del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Tomado y modificado de Audesirk y Audesirk, 1997). Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), progesterona (P₄), estradiol (E₂).

2. Ovario

Características morfofisiológicas

El ovario es la gónada de la hembra, sus funciones son la producción de gametos viables (gametogénesis) y la producción de hormonas esteroides tales como

progesterona, andrógenos y estrógenos (esteroidogénesis) y peptídicas como inhibina, activina y relaxina (Goldfien y Monroe, 1988).

En la mayoría de las especies, el ovario es un órgano pareado situado por detrás del peritoneo y unido a la cara posterior del ligamento ancho por un pliegue del peritoneo llamado mesovario. Los ovarios están unidos al útero por el ligamento útero-ovárico y están en íntima relación con las trompas uterinas (trompas de Falopio u oviductos) (Goldfien y Monroe, 1988).

En el ovario se pueden distinguir tres zonas. La corteza, que es la zona ubicada en la periferia del ovario y consta de un estroma de tejido conectivo en el que se incluyen los folículos ováricos en diferentes etapas de desarrollo; la médula, que está situada en la porción central del ovario y se compone de tejido conectivo con abundantes vasos sanguíneos, vías linfáticas y fibras nerviosas; y el hilio, que es la región donde se encuentran la arteria y vena ováricas, los vasos linfáticos y las células intersticiales (Sánchez, 2003; Geneser, 2000; Gartner, 2003; Ross, 2007) (Figura 2).

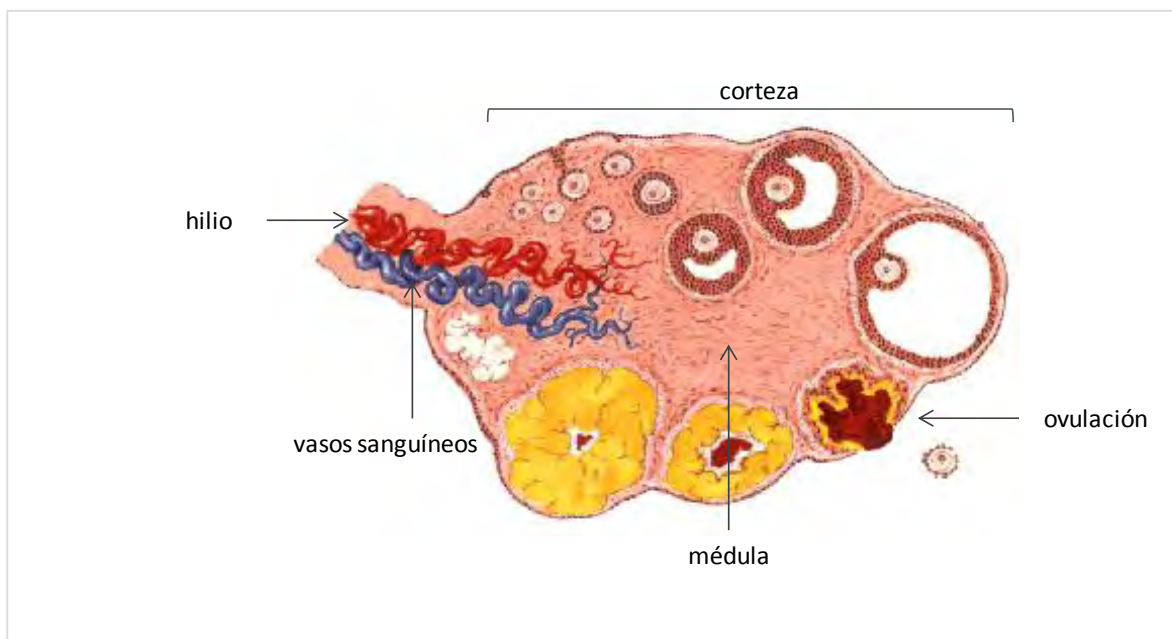


Figura 2. Esquema del ovario que muestra el desarrollo folicular que culmina en la ovulación y consecuente formación del cuerpo lúteo (Tomado y modificado de Yen y Jaffe's, 2009).

El folículo es la unidad anatómica y funcional del ovario, debido a que a partir de esta estructura se forman los tres compartimentos del ovario (Guyton, 1984; Ross y col., 1992; Audesirk y Audesirk, 1996; Geneser, 2000; Ross, 2007).

1. El folicular, formado por folículos en diferentes etapas de desarrollo que son primordiales, en crecimiento (primarios, secundarios) y preovulatorios.
2. El luteal o cuerpo lúteo, que se forma a partir de las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos que expulsaron al ovocito.
3. El intersticial o glándula intersticial, incluye tanto a las células tecointersticiales de los folículos en crecimiento, como a las células de la teca de los folículos que no llegaron a ovular (atrésicos).

Foliculogénesis

La foliculogénesis es el proceso mediante el cual se forman los folículos primordiales. Se inicia en el momento en que los ovocitos desnudos son rodeados por una capa de células foliculares y de una membrana basal que los separa del resto del ovario. En los roedores como la rata y el ratón, este proceso comienza y culmina en la primera semana de vida posnatal. Los ovocitos presentes en el momento del nacimiento permanecen detenidos en su desarrollo en la primera división meiótica (Ojeda y Urbanski, 1994; Peters, 1978; Ross, 2007).

Desde el punto de vista histológico los folículos ováricos pueden identificarse de acuerdo con su estado de desarrollo en:

Folículos primarios: La diferenciación de los folículos primordiales a primarios inicia cuando las células foliculares aplanadas se transforman primero en cúbicas y luego en cilíndricas y se dividen hasta formar una capa estratificada alrededor del óvulo, llamadas entonces células de la granulosa. Estas células proliferan de manera rápida por la acción sinérgica de la FSH y los estrógenos. A su vez la FSH estimula la síntesis de sus propios receptores en las células de la granulosa, lo que permite que el número de receptores vaya en aumento conforme el folículo madura. En un principio las células foliculares se encuentran en contacto directo con el ovocito pero después son separadas por una capa de mucopolisacáridos y glucoproteínas que sintetiza tanto el ovocito como las células foliculares y que conforman la zona pelúcida. En el momento en que las células de la granulosa forman tres o más capas alrededor del ovocito, se inicia la diferenciación de las células de la teca a partir de las células del estroma ovárico que rodean al folículo y que se ubican por fuera de la membrana

basal (Guyton, 1984; Domínguez y col., 1991; Lesson y Leeson, 1992; Greenwald y Roy, 1994; Ojeda y Urbanski, 1994) (Figura 3).

Folículos secundarios o antrales: Al aumentar de tamaño el folículo, en la teca se distinguen dos capas, una profunda muy vascularizada con células secretoras (teca interna) y una superficial con células de tejido conectivo (teca externa). Entre las células de la granulosa hay pequeñas zonas con líquido. Conforme las células de la granulosa continúan su multiplicación, hay mayor producción y acumulación de líquido en el interior de la capa de la granulosa, lo cual hace que se forme la cavidad folicular o antro. El antro, que está revestido por varias capas de células de la granulosa también se hace más grande. El ovocito y una parte de las células que lo recubren llamado *cumulus oophorus* son desplazados progresivamente hacia un lado de la cavidad folicular (Goldfien y Monroe, 1988) (Figura 3).

Folículo maduro o preovulatorio: Conforme el folículo crece adquiere mayor capacidad en la síntesis de hormonas esteroideas. Las células de la teca interna incrementan su función secretora aportando los andrógenos que sirven de sustrato en la síntesis de estrógenos por las células de la granulosa, lo que incrementa considerablemente la cavidad antral. (Goldfien y Monroe, 1988) (Figura 3).

En el ovario de la rata, los folículos alcanzan la etapa preovulatoria alrededor de los 17 ó 19 días después de haber iniciado el crecimiento. Las fibras de colágeno, células de tejido conectivo, sustancia fundamental y fibras musculares lisas de la teca externa forman una vaina fibrosa que al disgregarse en un punto cercano a la superficie del ovario, dan lugar a un orificio (estigma ovárico) por el cual saldrá el ovocito (Domínguez y col., 1991; Lesson y Leeson, 1992).

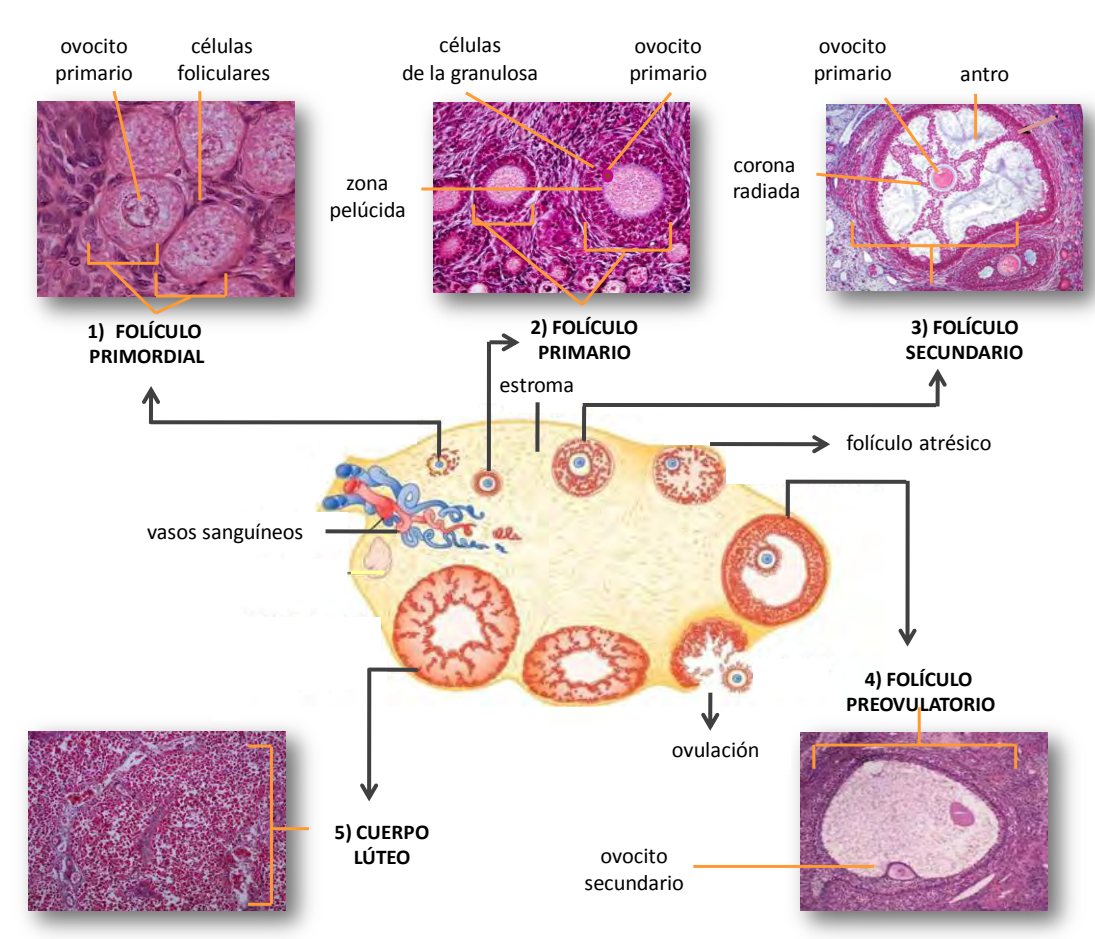


Figura 3. Esquema que muestra las características histológicas que distinguen a los folículos en sus diferentes etapas de crecimiento: primordial, primario, secundario y preovulatorio, así como el cuerpo lúteo (Tomado y modificado de: http://sosbiologiacelularytisular.blogspot.mx/2010_05_01_archive.html).

Atresia folicular

En el folículo ovárico, la atresia es un proceso natural, degenerativo, paulatino e irreversible, por el cual el folículo pierde su integridad y funcionalidad (Sharma RK,

2000; Chedrese J, 2003) La atresia ocurre en cualquier etapa del desarrollo folicular y es el destino de la gran mayoría de los folículos del ovario de los vertebrados (Hurwitz A, 1992).

En la atresia destacan algunos cambios morfológicos e histológicos como son la fragmentación nuclear en las células de la granulosa (núcleos picnóticos), desprendimiento de las células de la granulosa por la pérdida de la matriz intercelular (descamación), desprendimiento del complejo cúmulo-ovocito e hipertrofia de las células de la teca. Aunado a esto, los cambios bioquímicos que suceden son disminución en la síntesis de ADN en las células de la granulosa, pérdida de receptores a gonadotropinas y disminución en la síntesis y expresión de ARNm para aromatasas (Greenwald, 1989; Tilly, 1992).

Que un folículo ovule o sufra atresia, es determinado por el balance de señales que reciben sus células. Si el folículo mantiene su integridad y es seleccionado para la ovulación, el pico preovulatorio de LH desencadena una serie de eventos entre los que destacan el reinicio de la meiosis del ovocito y la diferenciación de las células de la granulosa y teca a células lúteas, formando el cuerpo hemorrágico y posteriormente el cuerpo lúteo. Si el óvulo no es fecundado, el cuerpo lúteo degenera (luteólisis) (Domínguez y col., 1991; Niswender, 2000; Demeestere, 2005).

Esteroidogénesis

Los esteroides son sintetizados a partir del colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL) que se encuentran en el plasma sanguíneo o el producido dentro de las células a partir de acetato (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Hinshelwood, 1999). Los principales esteroides producidos por el ovario son progesterona,

androstenediona, testosterona y estradiol. Las células de la teca y de la granulosa representan el sustrato anatómico de la síntesis de estas hormonas. Los intermediarios en la biosíntesis del estradiol por las células de la granulosa lo constituyen los andrógenos producidos por las células de la teca interna, la cual es estimulada por la LH (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

Las células de la teca presentan receptores a LH y las células de la granulosa a FSH y posteriormente a LH. La unión de la LH a su receptor estimula a la adenilato ciclasa que cataliza la síntesis de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) a partir de trifosfato de adenosina (ATP), lo cual activa la proteína cinasa A, que a su vez estimula la expresión de enzimas que participan en la biosíntesis de esteroides desde colesterol hasta andrógenos. En las células de la granulosa la unión de la FSH a su receptor desencadena la misma vía de señalización, con la diferencia de que además utiliza al fosfato de inositol como segundo mensajero encargado de activar a la proteína cinasa B, lo que incrementa la expresión de la enzima aromatasa (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Strauss y Williams, 2009).

En la mitocondria de la célula de la teca, el colesterol libre se transforma en pregnenolona por acción de la enzima P_{450} que escinde la cadena lateral del colesterol (P_{450SCC}). Una vez sintetizada la pregnenolona esta puede tomar dos rutas diferentes de biosíntesis: en la ruta Δ^4 la pregnenolona se convierte en progesterona mediante las enzimas 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HDS). La progesterona por medio de la enzima 17α -hidroxilasa es convertida a 17α -hidroxiprogesterona que a su vez es convertida en androstenediona por la C_{17-20} liasa. La androstenediona es transformada en testosterona por la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD) (Van Voorhis, 1999; Gore Langton y Amstrong, 1994; Yen y Adashi, 2001) (Figura 4).

En la ruta Δ^5 la pregnenolona es modificada por la enzima 17α -hidroxilasa en 17α -hidroxipregnenolona. Ésta por acción de la enzima C_{17-20} liasa se convierte en dehidroepiandrosterona (DHEA) que a su vez es transformada en androstenediona por acción de la enzima 3β -HDS y finalmente la androstenediona es transformada en testosterona por la enzima 17β -HSD (Felig y col., 1981; Gore Langton y Armstrong, 1994; Yen y Adashi, 2001) (Figura 4).

La mayor parte de los andrógenos que salen a la circulación sanguínea, atraviesan la membrana basal y llegan a la célula de la granulosa. La conversión de andrógenos a estrógenos es catalizada por la enzima P_{450} aromatasa; la androstenediona es aromatizada a estrona y la testosterona a 17β -estradiol. Parte del estradiol ingresa al fluido folicular y el resto sale al torrente sanguíneo por la vena ovárica (Gore-Langton y Armstrong, 1994) (Figura 4).

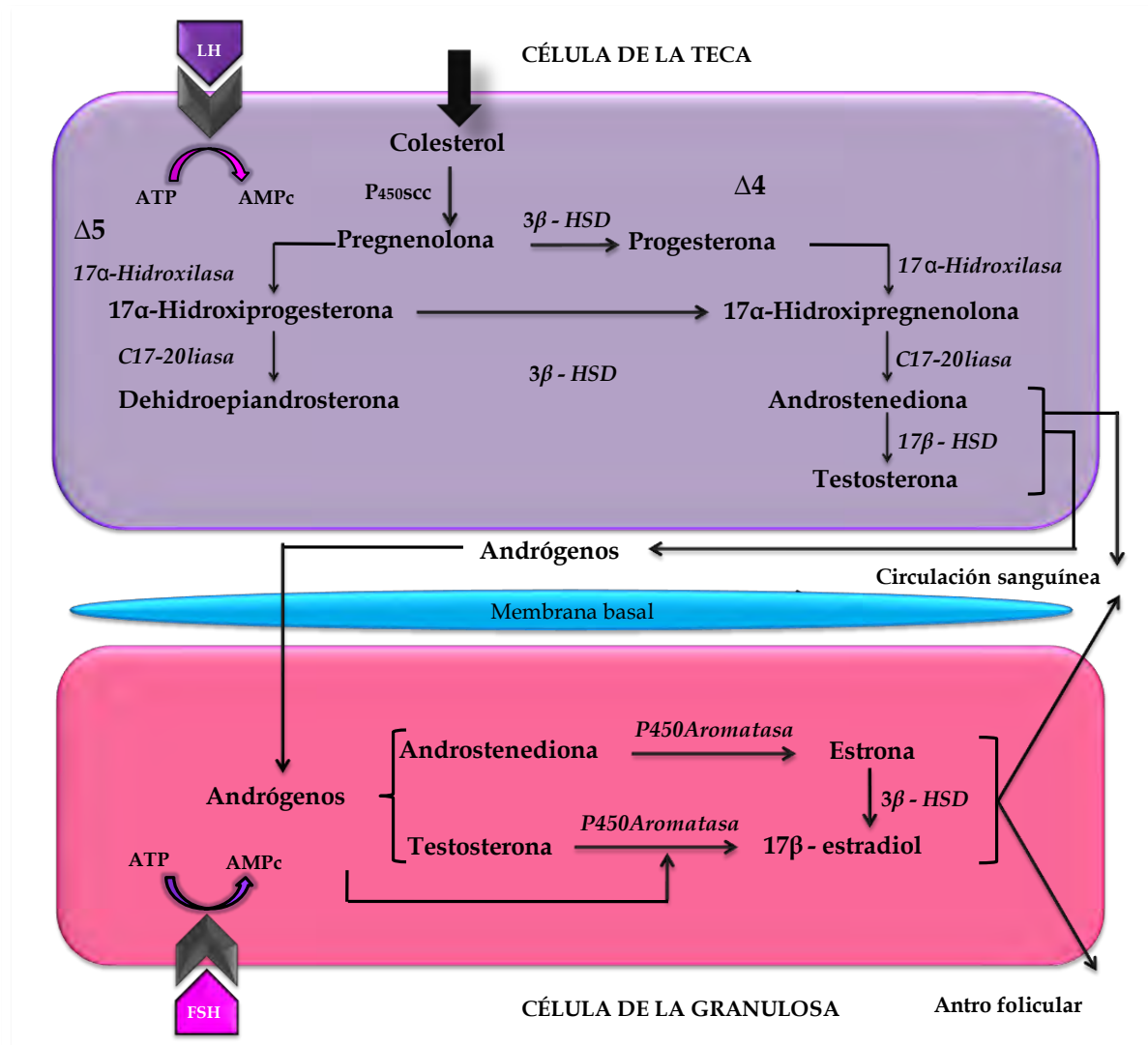


Figura 4. Biosíntesis de las hormonas esteroides (Tomado y modificado de Gore-Langdon y Armstrong, 1994). Hormona luteinizante (LH), hormona estimulante del folículo (FSH), trifosfato de adenosina (ATP), monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), P₄₅₀ que escinde la cadena lateral del colesterol (P₄₅₀sc). 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD), 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD).

Ovulación

La ovulación es la liberación del ovocito y es un proceso mediado por hormonas. En las últimas fases del desarrollo folicular los estrógenos, junto con las gonadotropinas coordinan la maduración del folículo preovulatorio y ejercen una acción de retroalimentación positiva sobre el eje hipotálamo-hipófisis que provoca la liberación de gonadotropinas que culminará con la ovulación. Las células de la granulosa ahora sintetizan progesterona, que aunada a la secreción de estradiol, incrementan el número de sus receptores a LH y en la hipófisis promueven la liberación preovulatoria de LH. Se produce un aumento de las concentraciones del AMPc tisular, lo que induce la liberación y activación de enzimas luteolíticas responsables de la ruptura de la pared folicular (Sánchez, 2003; Ross, 2007).

El ovocito expulsado es un ovocito secundario, ya que justo antes de salir culmina la primera fase de la meiosis e inicia la segunda división meiótica que se detiene en metafase. La segunda fase de la meiosis se reinicia sólo si el ovocito es fecundado (Ross y col., 1992; Espey y Lipner, 1994).

3. Ciclo estral

En la mayoría de las especies, la característica más relevante de la ciclicidad de la función ovárica durante la vida reproductiva, es la aparición de la conducta de celo o estro, de ahí el nombre de ciclo estral, en la cual la hembra acepta la monta y cópula. Esta conducta de estro coincide temporalmente con la ovulación (rata, ratón, hámster) (Tresguerres, 2003).

En el ratón, aproximadamente el 50% de las cepas presenta ciclos estrales irregulares (Ramírez, 1973). En la rata este ciclo está bien caracterizado, tiene una duración entre cuatro y cinco días y se divide en cuatro fases: estro, metaestro (diestro 1), diestro (diestro 2) y proestro (Tresguerres, 2003).

ESTRO: Es el periodo de celo en el que la hembra presenta patrones de conducta sexual característicos como la lordosis; acepta el acercamiento, la monta y la cópula con el macho. Como la ovulación ha sucedido pocas horas antes, los óvulos se encuentran en el oviducto. El folículo postovulatorio comienza a estructurarse como cuerpo lúteo mientras una nueva serie de folículos primarios comienza a desarrollarse. En la mucosa vaginal ocurren numerosas mitosis que desplazan a las capas más superficiales (epitelio escamoso y cornificado) que son exfoliadas en el frotis vaginal, lo que es el indicativo citológico de estro y señal probable de ovulación.

METAESTRO: Aparece al día siguiente del estro y tiene aproximadamente la misma duración que la fase de estro. La monta y la cópula ya no son permitidas. La secreción de progesterona por el cuerpo lúteo y la de estradiol por los folículos inhiben la secreción de gonadotropinas. La vascularización y la motilidad del útero están disminuidas. En el frotis vaginal se aprecia infiltración leucocitaria junto con algunas células cornificadas.

DIESTRO: Esta fase dura entre 60 y 70 h. Si no ocurrió la fecundación o no hubo cópula se da la regresión del cuerpo lúteo (luteólisis). La secreción de estradiol por los folículos en crecimiento sigue aumentando. El útero es pequeño, anémico y no contráctil. Presencia de cuerpos lúteos maduros. En la citología vaginal predominan los leucocitos.

PROESTRO: Los folículos han adquirido el estadio de folículos preovulatorios y secretan grandes cantidades de estradiol. Esta hormona ejerce ahora un efecto estimulante (retroalimentación positiva) sobre la secreción de gonadotropinas. La LH induce la ovulación y la luteinización del folículo postovulatorio. El útero por acción del estradiol, se hace extremadamente contráctil y en la vagina aparecen células epiteliales nucleadas.

4. Infertilidad en la mujer

La fertilidad se define como la capacidad de concebir y procrear una especie, por lo que la infertilidad es la disminución de esta capacidad. La infertilidad, a diferencia de la esterilidad, no es un estado irreversible (Yen, 2001).

En la especie humana, la infertilidad es una condición que afecta del 15 al 20% de las parejas en edad reproductiva. Clínicamente se define como la incapacidad de concebir después de 12 meses de relaciones sexuales frecuentes en la fase fértil del ciclo menstrual sin medidas anticonceptivas (ESHRE, 1996; Yen, 2001).

En los últimos años la incidencia de infertilidad a nivel mundial está en aumento, de tal forma que en el estudio de la pareja infértil se están considerando diferentes factores de riesgo asociados con la infertilidad entre los que se encuentran los siguientes (Bentley, 2000).

1. Anovulación. Está presente aproximadamente en el 20% de las parejas. Se define como la condición en la cual el desarrollo y la ruptura folicular están alterados y por

lo tanto el ovocito no es liberado del folículo. La anovulación puede estar asociada a disfunción hipotalámica, hipofisaria u ovárica de etiología variable (Franks, 1991).

2. Síndrome del ovario poliquístico (SOPQ). Afecta del 6 al 10% de mujeres en edad reproductiva. Es el más común y el desorden endocrino menos entendido que causa infertilidad femenina. El SOPQ se caracteriza por periodos de anovulación, concentraciones variables de gonadotropinas, irregularidades en el ciclo menstrual, amenorrea, presencia de quistes foliculares, hiperandrogenismo e infertilidad (Barria y col., 1993, Rosa E-Silva y col., 2003).

3. Factor útero-tubárico-peritoneal. Se presenta en aproximadamente el 30% de las parejas. Las funciones de las trompas de Falopio están íntimamente ligadas a la integridad del epitelio ciliado responsable de la captación de ovocitos. La fertilización tiene lugar en el extremo de la sección ampular. Las trompas también participan en el desarrollo temprano del embrión y en su transporte a la cavidad uterina. Por consiguiente cualquier alteración anatómica o funcional de las trompas está asociada a infertilidad (Brugo-Olmedo, 2003).

4. Edad. La edad de la mujer es uno de los factores más importantes en una pareja con problemas de infertilidad. La edad promedio a la cual la mujer desea quedar embarazada ha aumentado considerablemente; su educación, así como la necesidad de un avance profesional constante, la han llevado a posponer su decisión sobre el embarazo, de tal forma que en la actualidad desean quedar embarazadas a una edad aproximada de 35 años, momento en el cual la fertilidad comienza a declinar (Brugo-Olmedo, 2003).

5. Factores ambientales y tóxicos. El aumento del estrés físico o psíquico, así como la exposición a agentes químicos pueden interrumpir o desorganizar el balance hormonal entre el cerebro, la hipófisis y los ovarios. Esta interrupción puede generar un desequilibrio entre los estrógenos y la progesterona, e inducir cambios en la duración y regularidad del ciclo menstrual y de la ovulación (NIOSH, 1999).

5. Toxicología reproductiva

La toxicología reproductiva estudia los efectos adversos producidos por agentes exógenos físicos (radiaciones), químicos (naturales o sintéticos) y biológicos (virus) en la reproducción (OMS, 1997; Bonilla y col., 2001).

Existen varios tipos de toxicidad (Bonilla y col., 2001; Branch, 2004; Altamirano y col., 2006):

- Toxicidad en órganos. Cuando los agentes alteran la función normal del sistema reproductor.
- Teratogenicidad. Capacidad de los diferentes agentes para causar malformaciones estructurales en el feto en desarrollo (Branch, 2004).
- Toxicología del desarrollo. Involucra las alteraciones producidas en la descendencia como resultado de los cambios en el sistema materno por la exposición a los diferentes agentes.

Dado que los agentes químicos están presentes en casi todos los medios en los cuales se desenvuelven las mujeres fértiles y las embarazadas, estos agentes juegan un papel preponderante en la etiología de las alteraciones reproductivas (Palmer, 1980; ECETOC, 1983; WHO, 1984; Khera, 1984).

El desarrollo de los embriones de los mamíferos es un proceso biológico complejo, en donde, a pesar de la delicada sincronización de los numerosos eventos, pueden ocurrir errores durante las diferentes etapas que preceden y proceden este proceso.

Alteraciones en la gametogénesis, fertilización, blastogénesis, embriogénesis o fetogénesis pueden originar alguna anomalía reconocible al nacimiento o algún tipo de defecto fisiológico o reproductivo detectable solamente tiempo después del nacimiento (Pimentel, 2006).

La aparición de malformaciones en el producto pueden tener su origen en alteraciones en los genes y cromosomas, pero también el desarrollo embrionario y fetal normal puede ser alterado por diversos factores externos. Éstos al inducir alguna anormalidad suelen ser causa de defectos congénitos y por ello se les ha denominado *teratógenos* (del griego *teratos*, “monstruo” y *genos* o *génesis*, “nacimiento u origen”) (Shepard, 1995). Por ello, la teratología es la disciplina científica que estudia las anomalías congénitas del embrión.

La embriogénesis de todos los mamíferos depende del sistema materno, de tal forma que el desarrollo y nacimiento del producto depende en gran parte del ambiente en el cual vive la madre. La edad y el estado físico y nutricional de la madre también son factores que determinan el crecimiento y desarrollo *in utero*. Cuando la integridad del sistema materno es modificada o perturbada se puede afectar indirectamente al producto (Pimentel, 2006).

En las figura 5 se observan algunas anormalidades esqueléticas tales como falta de osificación (cuando los huesos presentan una apariencia porosa) que se pueden presentar en cabeza, extremidades, cola y esternón (esternebras).

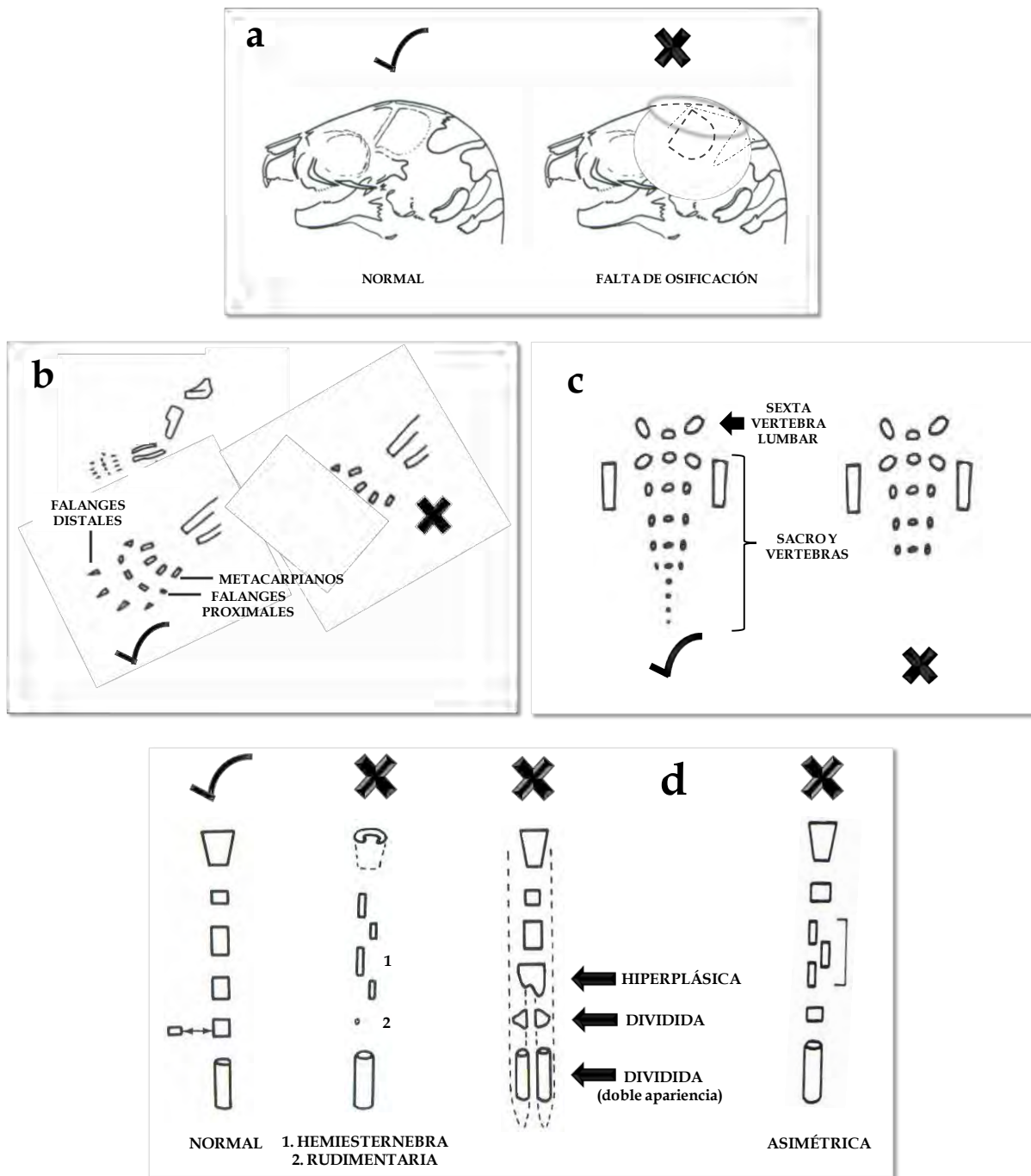


Figura 5. Esquema de algunas anomalías esqueléticas (falta de osificación) en fetos de ratón, que se pueden presentar en a) cabeza, b) extremidades, c) cola y d) esternones (Tomado y modificado de Taylor, 1985).

6. Cromo

El cromo (Cr) es un elemento mineral que químicamente existe en varios estados de oxidación desde -2 hasta +6. Los estados de oxidación más estables son el trivalente (3+) y el hexavalente (6+) (Jeejeebhoy, 1999; Armendariz-Anguiano y col., 2007).

El Cr^{3+} está presente en el aire, el agua, la tierra y en numerosos alimentos. Es un elemento traza (nutrimento que el cuerpo necesita en concentraciones de una parte por millón y comprende menos del 0.01% del peso corporal) esencial, ya que su deficiencia en la dieta resulta en anormalidades en las funciones biológicas en las que participa y que se pueden prevenir o revertir con la ingesta de dicho elemento (Nielsen, 1984). Concentraciones más bajas o muy altas a la óptima pueden alterar estas funciones y comprometer la salud del organismo (Gómez y Magaña, 2004). En el humano, la ingesta diaria recomendable de Cr^{3+} es de 25 a 35 $\mu\text{g}/\text{día}$ (Food and Nutrition Board, 2002).

La cantidad de Cr^{3+} presente en los alimentos es variable (Tabla 1) y depende en gran medida, de las concentraciones de cromo en el entorno o durante el proceso de fabricación o ambos (Gómez y Magaña, 2003; Havel, 2004).

Cuadro 1. Contenido de Cr^{3+} en algunos alimentos (Tomado y modificado de Gómez y Magaña, 2003; Havel, 2004).

Alimento	Porción	Cromo por porción (μg)
Harina	1/3 taza	0.3 - 0.4
Huevo	1	< 0.5
Leche	1 taza	< 0.5
Naranja	1 mediana	0.5
Pollo	100g	0.5
Arroz	½ taza	0.6
Pescado	100 g	0.6 - 0.9
Vino tinto	100 ml	0.6 - 8.5
Jitomate	1 mediano	0.9
Pan Integral	1 rebanada	0.8 - 1.0
Pavo	100 g	0.9 - 1.7
Brócoli	100 g	0.9 - 16
Plátano	1 mediano	1.0
Manzana (no pelada)	1 mediana	1.4 - 7.5
Harina integral	100 g	1.7
Hojuelas de maíz	1 taza	2.6
Té o café	1 taza	8.0

El mecanismo de absorción del Cr^{3+} no se conoce con precisión, se cree que es por difusión pasiva o por una proteína transportadora. Se absorbe en el intestino delgado especialmente en el yeyuno, donde la presencia de ciertos agentes quelantes previene

su hidrólisis y precipitación. Dicho efecto podría ocurrir fácilmente en el medio intestinal por tener un pH prácticamente neutro. La absorción y metabolismo del Cr^{3+} también son afectados por otros metales, principalmente el zinc y el hierro (Borel y col., 1984).

Los órganos que almacenan grandes cantidades de Cr^{3+} son hígado, riñón, músculo, bazo, páncreas y hueso. Se excreta principalmente por la orina y en menor cantidad por el cabello, sudor y heces (Mertz, 1988; Dowling, 1990; Seaborn, 1990).

La importancia biológica del cromo se descubrió a finales de los años 50, cuando se observó en ratas de laboratorio con intolerancia a la glucosa, que la levadura (rica en cromo) suprimía la incapacidad de mantener las concentraciones normales de azúcar en la sangre (Schwarz y Mertz, 1959).

El Cr^{3+} está vinculado con la expresión o actividad del receptor a insulina (Striffer y col., 1993). Se ha propuesto que el transporte de iones Cr^{3+} se lleva a cabo mediante la proteína transferrina, como respuesta a incrementos en las concentraciones de insulina plasmática (Vincent, 2000).

Yamamoto y colaboradores en 1988 separaron y caracterizaron una proteína de bajo peso molecular llamada cromodulina, compuesta por cuatro aminoácidos (Gly-Cls-Glu-Asp). Vincent (2000) describe que la cromodulina se encuentra almacenada en el citosol de las células dependientes de insulina en forma de apocromodulina (forma inactiva de la cromodulina) y se activa al unirse a cuatro iones de Cr^{3+} . La acción primaria del cromo como complejo cromo-cromodulina es la amplificación de la señal de la insulina, lo que modifica la captura de la glucosa y el metabolismo de los lípidos (Anderson, 1997; Davis y col., 1997) (Figura 6).

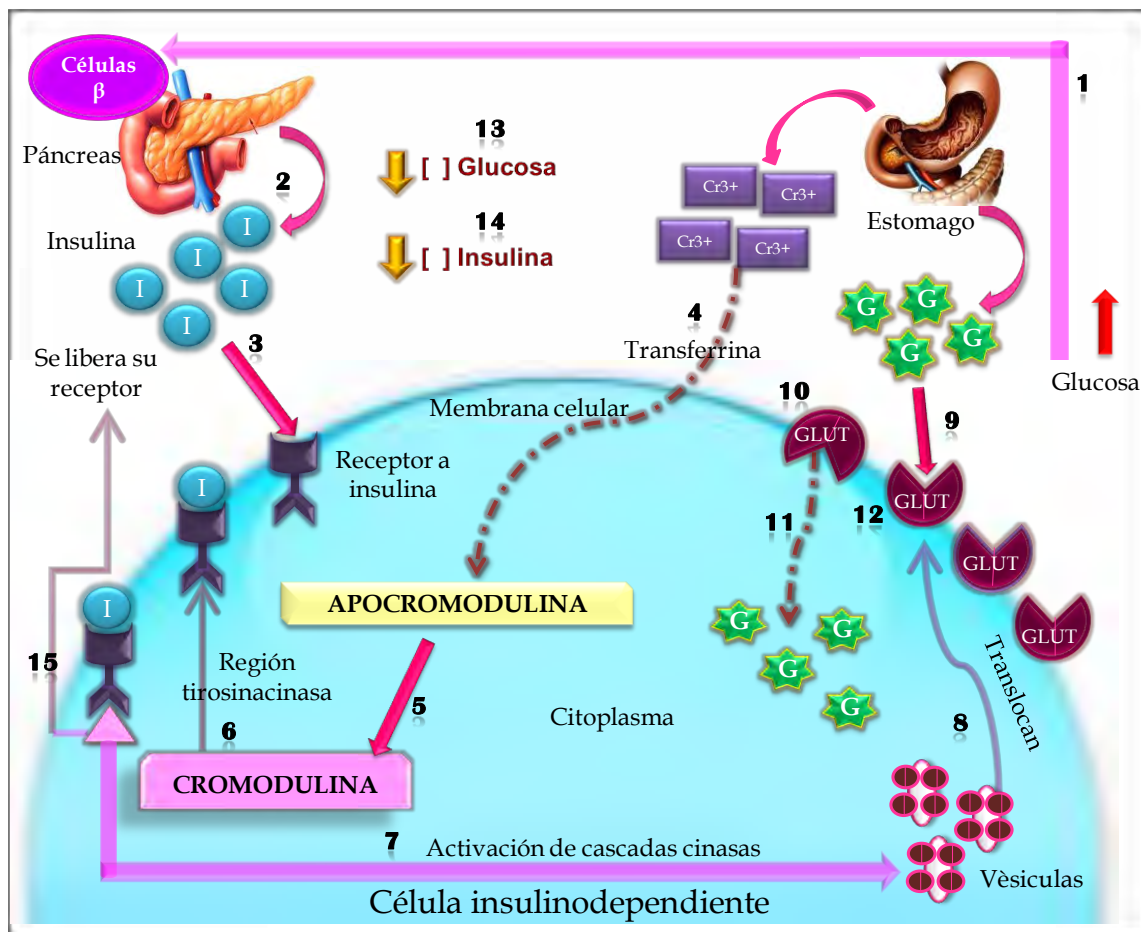


Figura 6. Posible mecanismo de acción del cromo proveniente de la dieta en las células, en la regulación de las concentraciones de insulina y glucosa sanguíneas (Tomado y modificado de Rosas, 2009).

1) Inicia con un aumento en la concentración de glucosa en la sangre, señal que llega a las células beta del páncreas. Éstas 2) responden secretando insulina al torrente sanguíneo, que posteriormente 3) se une a su receptor de membrana, 4) permitiendo la entrada a la célula del cromo existente en la sangre, mediante la proteína transferrina (como respuesta al incremento de la insulina plasmática) (Yamamoto y col., 1984; McLaren y Meguid, 1993; Vincent, 2000) ingresándolo por endocitosis, posteriormente es liberado para unirse a la apocromodulina (forma inactiva de la

cromodulina porque no tiene iones de cromo) y 5) se convierte en cromodulina (enlaza a cuatro iones de cromo), la cual 6) se une al receptor de insulina, e induce un cambio conformacional mediante un sistema de auto amplificación de la señal de la insulina por la activación de la región tirosina cinasa en la subunidad beta del receptor de insulina (en ausencia de la insulina la actividad tirosina cinasa permanece desconectada) (Roth y col., 1994; Anderson, 1997; Davis y Vincent, 1997; Vincent 2000; Cefalu y Hu, 2004; Wang y col., 2006). El receptor activado se autofosforila a otras proteínas, donde la más importante es la llamada sustrato del receptor de la insulina 1(IRS-1). La IRS-1 activa a dos vías intracelulares: a) la cascada de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) que intervienen en la regulación de la expresión genética de diversas proteínas, y b) la vía de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3 cinasa), la cual está involucrada en diversos efectos metabólicos, principalmente en la exocitosis de los GLUT. Esto 7) desencadena en consecuencia, una cascada de eventos moleculares, incluyendo, (Shepherd y Kahn, 1998; Vincent 2000, Clodfelder y col, 2001; Castrejon y col, 2007) la activación de la cascada de cinasas que producen 8) las translocación del GLUT intracelular de las vesículas hacia la membrana (ya que el 90% de las moléculas de GLUT se encuentran localizadas dentro de vesículas de depósito en ausencia de insulina y otros estímulos), incrementando momentáneamente el número de GLUT en la membrana de la célula. La glucosa 9) se une al transportador en la cara interna de la membrana, es entonces cuando 10) provocando un cambio en la conformación del transportador, quedando la glucosa y su sitio de unión localizados en la cara interna de la membrana, es entonces cuando 11) el transportador libera glucosa (repitiendo el ciclo) y en consecuencia, aumentando la velocidad del transporte de glucosa hacia el interior celular (de 10 a 20 veces), al haberse potencializado la acción de la insulina (Steele y col., 1977; Carruthers, 1990; Mastick y col., 2003; Cefalu y Hu, 2004; Gómez y Magaña, 2004; Wang y col., 2005). Al disminuir la concentración de glucosa en la

sangre, las células beta pancreáticas dejan de secretar insulina y 14) la concentración de insulina sanguínea disminuye, es entonces cuando 15) la cromodulina se libera del receptor y se revierten sus efectos (Vincent, 2000). Siendo éste, posiblemente un mecanismo importante en la homeostasis de la glucosa en personas sanas (Mastick y col., 1994; Figueroa, 2003).

Aunque es poco probable consumir cantidades perjudiciales de cromo en la alimentación, la fabricación de suplementos alimenticios con concentraciones variables de Cr^{3+} facilita la disponibilidad de este metal (Levina y Lay, 2008).

El Cr^{3+} en forma de quelato (Cr orgánico) es más fácilmente asimilado por el organismo (Chang y col., 1994, Hemken, 1997, Moreno, 2007), un quelato puede definirse como un complejo formado entre un agente quelante y un ión metálico (Langwinsky y Patino, 2002). Entre las formas de Cr orgánico más utilizadas están el cromo-levadura (Cr-Lev), el cromo metionina (Cr-Met) y el picolinato de cromo (PicCr) (Moreno, 1996).

7. Picolinato de Cromo

Debido a la influencia del cromo en el metabolismo del azúcar y de las grasas, se ha explorado su potencial para promover la pérdida de peso y mejorar la composición corporal (menos grasa y más músculo) (Ryan, 2003; Havel, 2004).

El Cr^{3+} está presente en numerosos suplementos alimenticios y multivitamínicos, generalmente se encuentra disponible en forma de sales como el PicCr y el cloruro de cromo (Cl_3Cr), entre otros. El Cl_3Cr se absorbe en menor cantidad que el PicCr, por lo

que este último permite una mayor biodisponibilidad del metal (Ryan, 2003; Havel, 2004).

El PicCr [Cr (C₆H₄NO₂)₃], es un compuesto que tiene un peso molecular de 418.30 y consta de tres complejos de ácido picolínico (AcPic) y un centro de Cr³⁺. El ácido picolínico es un derivado natural del aminoácido triptófano que facilita la absorción intestinal del Cr³⁺, se produce de forma natural en la leche materna y se encuentra en muchos alimentos comunes (Henderson y Swan, 1971; Rebello y col., 1982; Solorzano del Rio, 1998; Melvin, 2002; Cefalu y Hu, 2004) (Figura 7).

Teóricamente, los suplementos de Cr³⁺ benefician a los deportistas de alto rendimiento, ya que mejoran la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de los hidratos de carbono durante el ejercicio. El Cr³⁺ puede aumentar el efecto anabolizante de la insulina, lo que resulta en incremento de la masa magra y disminución de la masa grasa y el peso corporal. Dado el potencial de aplicación comercial de esta teórica posibilidad para los deportistas y la población en general, la mayoría de las investigaciones realizadas hasta la fecha se han centrado en el efecto de los suplementos de Cr³⁺ sobre la composición del organismo, utilizando en la mayoría de los estudios PicCr (Melvin, 2002).

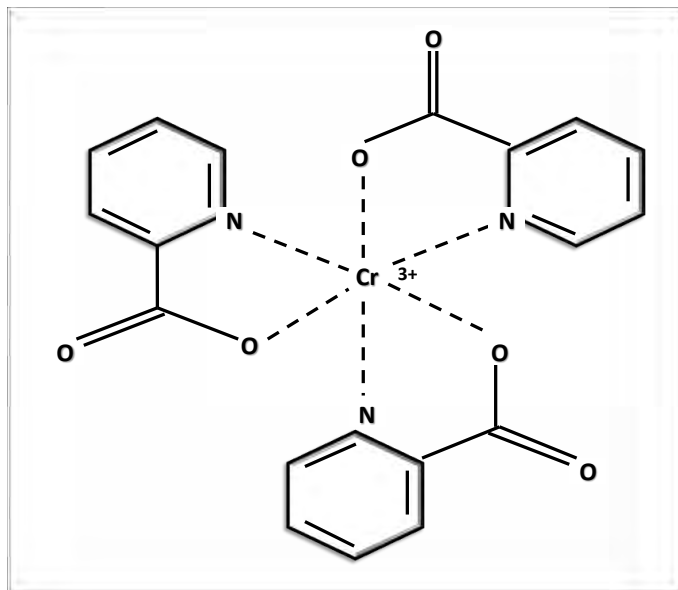


Figura 7. Estructura química del picolinato de cromo [Cr (C₆H₄NO₂)₃] (Tomado de Sung-II Kim, 2003).

Stearns y colaboradores (1995a, b) mencionan que en cultivos de células de ovario de hámster chino (CHO), la administración de PicCr, tiene un efecto clastógeno (rompimiento de los cromosomas) sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN).

Hepburn y colaboradores en el 2003, estudiaron el potencial genotóxico del PicCr utilizando como modelo biológico a la *Drosophila melanogaster* y observaron que la adición de PicCr en el alimento en dosis aproximadamente equivalente a la recomendada para humanos, provoca retraso en el estadio de pupa y eclosión, e incrementa tanto la tasa de mutaciones letales como la de hembras estériles.

Un estudio realizado en varones adultos jóvenes sanos sometidos a la ingesta diaria de 200 µg de PicCr (durante 21 días), mostró que el PicCr no modificó las

concentraciones de insulina y glucosa sanguíneas. En contraste se apreciaron efectos negativos en algunos parámetros seminales como disminución de la movilidad y vitalidad espermática y alteraciones en la morfología del espermatozoide. Parámetros que tienen un papel relevante en el diagnóstico del factor masculino, ya que se consideran decisivos en el éxito de los tratamientos de reproducción asistida, embarazo, gestación y umbrales de fertilidad (Cuapio, 2009).

También se han estudiado los efectos del PicCr durante la preñez utilizando ratones a los cuales se les suplementó la dieta con 200 mg de PicCr/Kg de alimento del día 6 a 17 de gestación. El análisis de la descendencia mostró que la ingesta materna de PicCr provoca alteraciones morfológicas en el desarrollo de los fetos tales como bifurcación en la segunda costilla (Bailey y col., 2006).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cromo trivalente es un micronutriente esencial en los seres vivos. En los humanos, este micronutriente se encuentra disponible en suplementos alimenticios como el picolinato de cromo, del cual ha habido un aumento indiscriminado en su consumo principalmente por adultos jóvenes en edad reproductiva, debido a su propiedad para quemar grasas y marcar músculos. Sin embargo se ha mostrado que la administración prolongada o excesiva de este suplemento provoca la acumulación del metal en el organismo, alcanzando concentraciones que pueden lesionar a los cromosomas. También se ha descrito en varones adultos jóvenes, que la ingesta semicrónica de PicCr altera los parámetros seminales y en ratones hembra preñados se ha observado que su consumo durante la gestación provoca defectos esqueléticos en la descendencia.

A la fecha no se conoce cuál es su efecto sobre la función reproductiva de la hembra, por lo que en el presente trabajo se utilizó como modelo al ratón hembra adulto para evaluar los efectos del PicCr sobre la capacidad ovulatoria y la fertilidad, así como las posibles repercusiones en el desarrollo prenatal de las crías nacidas de madres que fueron consumidoras de PicCr.

HIPÓTESIS

Si el consumo de picolinato de cromo es capaz de dañar parámetros que comprometen la salud reproductiva, entonces en la hembra del ratón la ingesta de este suplemento alterará la capacidad de respuesta ovulatoria, la fertilidad y el desarrollo prenatal de su descendencia.

OBJETIVOS

- Evaluar la respuesta ovulatoria del ratón adulto a la administración de gonadotropinas (prueba de ovulación inducida).
- Estudiar los efectos de la ingesta diaria de diferentes concentraciones de PicCr sobre la respuesta ovulatoria de ratones hembra estimulados con gonadotropinas.
- Analizar el índice de fertilidad de las hembras sometidas a la ingesta diaria de PicCr.
- Analizar las características morfológicas y esqueléticas de las crías nacidas de madres que fueron pretratadas con PicCr.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones hembra vírgenes adultas de tres meses de edad de la cepa CD1 mantenidas en condiciones convencionales de bioterio, con fotoperiodo de 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 5:00 a 19:00 h), 40% de humedad, 21 ± 2 °C de temperatura y libre acceso al agua y al alimento.

Administración oral del picolinato de cromo

Se utilizó el PicCr disponible comercialmente para consumo humano (General Nutrition Center, México [GNC]) en presentación de tabletas (550 mg) con 200 µg de PicCr cada una. Las tabletas se pulverizaron en un mortero para preparar las diferentes concentraciones utilizando como vehículo el aceite de maíz. Las concentraciones de PicCr se determinaron a partir de la dosis de 200 µg/día, que es la recomendada para consumo humano (peso corporal aproximado de 60 Kg) (National Research Council, 1989), lo que corresponde a 0.12 µg/día para un ratón adulto (peso corporal aproximado de 35 g). En el cuadro 2 se muestran las dosis administradas en un volumen de 50 µl de aceite de maíz por animal.

Cuadro 2. Concentraciones de PicCr empleadas durante el tratamiento.

N° de veces más a partir de la dosis recomendada	PicCr µg/50µl/ratón/día
Dosis recomendada	0.12
3	0.36
5	0.60
10	1.20
15	1.80

El tratamiento se aplicó por vía oral con la ayuda de un combitubo (eppendorf) de 2.5 ml acoplado a un repipeteador (eppendorf). La administración del compuesto se realizó diariamente entre las 10:00 y 11:00 h durante 40 días como mínimo, que corresponde en promedio a dos ciclos ováricos en el ratón.

Procedimiento de autopsia

Todos los animales se sacrificaron por decapitación en diferentes tiempos, según se indica en el diseño experimental. A la autopsia se disecaron los ovarios y el útero y se pesaron en balanza de precisión. En los oviductos se buscó la presencia de ovocitos, en cuyo caso se contaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Experimento 1. Respuesta ovulatoria del ratón adulto a la administración de eCG y hCG (prueba de ovulación inducida).

Con el fin de sincronizar la ovulación, las hembras se sometieron a una prueba de ovulación inducida por la administración secuencial de la gonadotropina coriónica equina (eCG) (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. USA) y la gonadotropina coriónica humana (hCG) (Sigma).

Se utilizaron 20 hembras adultas en diestro vaginal que se dividieron en cuatro grupos experimentales. Entre las 9:00 y 10:00 h a cada grupo se le inyectó por vía subcutánea una de las siguientes concentraciones de eCG 1.5, 2, 3 y 5 u.i., 54 h más tarde se inyectaron con 3 u.i. de hCG y se sacrificaron 20 h después. Se contó con grupo de animales de la misma edad que se sacrificaron cuando presentaron estro

vaginal precedido de proestro (intactos). Los animales se autopsiaron siguiendo el procedimiento descrito previamente.

Experimento 2. Efectos de la ingesta diaria de diferentes concentraciones de PicCr sobre la respuesta ovulatoria inducida por gonadotropinas.

Se utilizaron hembras adultas que se dividieron en seis grupos experimentales. A cada grupo se le administró por vía oral una de las siguientes dosis de PicCr 0.12, 0.36, 0.60, 1.20 y 1.80 µg. Como grupo de comparación se utilizaron animales de la misma edad que sólo recibieron aceite de maíz (vehículo [Vh]). La ingesta de PicCr o Vh se continuó por un promedio de 40 días. Todos los animales se pesaron cada tercer día hasta el momento del sacrificio.

Cuatro días antes de finalizar el tratamiento se inició la toma de frotis vaginales y cuando se presentó la citología característica de diestro, se inició la prueba de ovulación inducida administrando 1.5 u.i. de eCG y 54 h después 3 u.i. de hCG, concentraciones determinadas en función de la cuota ovulatoria que caracteriza a la especie (Reyes, 2010) (experimento anterior). Se contó con un grupo de animales de cuatro meses de edad que únicamente se sometieron a la prueba de ovulación inducida (testigos). Todos los animales se sacrificaron 20 h después de la administración de hCG y se autopsiaron siguiendo el procedimiento antes descrito.

Experimento 3. Estudio de los efectos de la ingesta diaria de PicCr sobre la fertilidad de las hembras adultas.

Se utilizaron hembras adultas sometidas a la ingesta diaria de PicCr (0.12, 0.60 y 1.20 µg) o Vh durante 90 días, momento en el cual se les realizó una prueba de fertilidad,

que consistió en colocar dos hembras con un macho de fertilidad comprobada. A las hembras se les revisó diariamente la vagina (promedio de 7 días) en busca del tapón espermático (TE), cuya presencia se consideró como día uno de preñez.

Al día 18 de preñez, las hembras se sacrificaron por dislocación cervical. A la autopsia se expuso el útero y se abrió para contar el número de implantes, reabsorciones y fetos vivos y muertos. Se contó con un grupo de hembras que sólo se sometieron a la prueba de fertilidad (testigo).

Experimento 4. Analizar las características morfológicas y esqueléticas de las crías nacidas de madres que fueron consumidoras de PicCr.

Los fetos obtenidos de hembras sometidas a la ingesta diaria de PicCr (0.12, 0.60 y 1.20 μ g) o Vh durante 90 días y testigo (experimento anterior), se removieron del útero, se pesaron individualmente en balanza digital y se examinaron bajo el microscopio estereoscópico para identificar la presencia de alteraciones morfológicas.

La mitad de los fetos de cada camada se fijaron en etanol al 70% (Sigma) por 24 h. Posteriormente se desviceraron, se aclararon en una solución de KOH al 1% (Sigma) (aproximadamente tres cambios) y se tiñeron colocándolos por 48 h en una solución de rojo de alizarina al 1% disuelto en KOH al 1%. Transcurrido este tiempo los fetos se lavaron con una solución 1:4 de glicerina pura (Sigma) más KOH al 1% hasta eliminar el exceso de colorante (Mengola y col., 2001). Los fetos ya transparentados se revisaron bajo el microscopio estereoscópico para identificar y registrar la presencia de anomalías esqueléticas tales como falta de osificación (cuando los huesos presentan una apariencia porosa) en cabeza, extremidades superiores e

inferiores, cola y esternebras; estas últimas se clasificaron en asimétricas, bifurcadas, divididas, fusionadas, hemiesternebras, hiperplásicas y rudimentarias.

Análisis estadístico

El peso corporal y de los órganos y el número de ovocitos liberados se expresaron como la media $\pm$ e.e.m.

El número de ovocitos liberados se analizó con la prueba de U de Mann Whitney. La tasa de animales ovulantes (TAO) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{TAO} = \frac{\text{Número de animales que ovulan}}{\text{Número total de animales}} \times 100$$

Y se comparó utilizando la prueba de probabilidad exacta de Fisher para proporciones. El peso corporal y de los órganos se analizó por la prueba de “t” de Student. Se consideraron como significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor a 0.05.

RESULTADOS

1. Respuesta ovulatoria del ratón adulto a la administración de eCG y hCG (prueba de ovulación inducida).

Los resultados muestran que en los ratones adultos de 3 meses de edad tratados con eCG (independientemente de la concentración), seguida de 3 u.i. de hCG, la ovulación se presentó en el 100% de los animales 72 h después de la administración de eCG. No obstante que la tasa de animales ovulantes entre el grupo intacto y los tratados con gonadotropinas fue igual, el número de ovocitos liberados fue significativamente más alto en la mayoría de los grupos estimulados con gonadotropinas. El análisis de correlación de Pearson mostró la existencia de una relación directamente proporcional ($r=0.90$, $p=0.03$) entre la concentración de eCG y la cuota ovulatoria (Tabla 1).

Tabla 1. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media $\pm$ e.e.m. del número de ovocitos liberados y peso de ovarios y útero de ratones adultos inyectados con diferentes concentraciones de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados 20 horas más tarde y sin tratamiento (intactos).

Parámetros	Intactos	1.5 u.i	2 u.i.	3 u.i.	5 u.i.
Número de animales	5	5	5	5	5
TAO	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Número de ovocitos	11.2 $\pm$ 0.4	15.2 $\pm$ 0.9 *	14.4 $\pm$ 2.0	28.5 $\pm$ 6.5 *	30.0 $\pm$ 2.6 *
Peso de ovarios (mg)	30.4 $\pm$ 2.3	26.2 $\pm$ 0.5	41.1 $\pm$ 4.0 *	34.0 $\pm$ 3.9	47.7 $\pm$ 6.8 *
Peso de útero (mg)	185.2 $\pm$ 17.4	178.2 $\pm$ 20.2	160.5 $\pm$ 17.9	173.7 $\pm$ 7.6	183.4 $\pm$ 20.9

* $p<0.05$ vs Intactos (prueba de U de Mann-Whitney).

El peso de los ovarios de los animales tratados con 2 y 5 u.i. de eCG+ hCG mostró un incremento significativo aunque no directamente proporcional a la concentración de eCG administrada. El peso del útero no se modificó de manera significativa independiente de la concentración de eCG.

2. Efectos de la ingesta diaria de diferentes concentraciones de PicCr sobre la respuesta ovulatoria inducida por gonadotropinas.

En la figura 8 se muestra que el peso corporal de los animales sometidos a la ingesta diaria de PicCr durante 40 días no se modificó respecto al peso inicial en ninguno de los grupos experimentales.

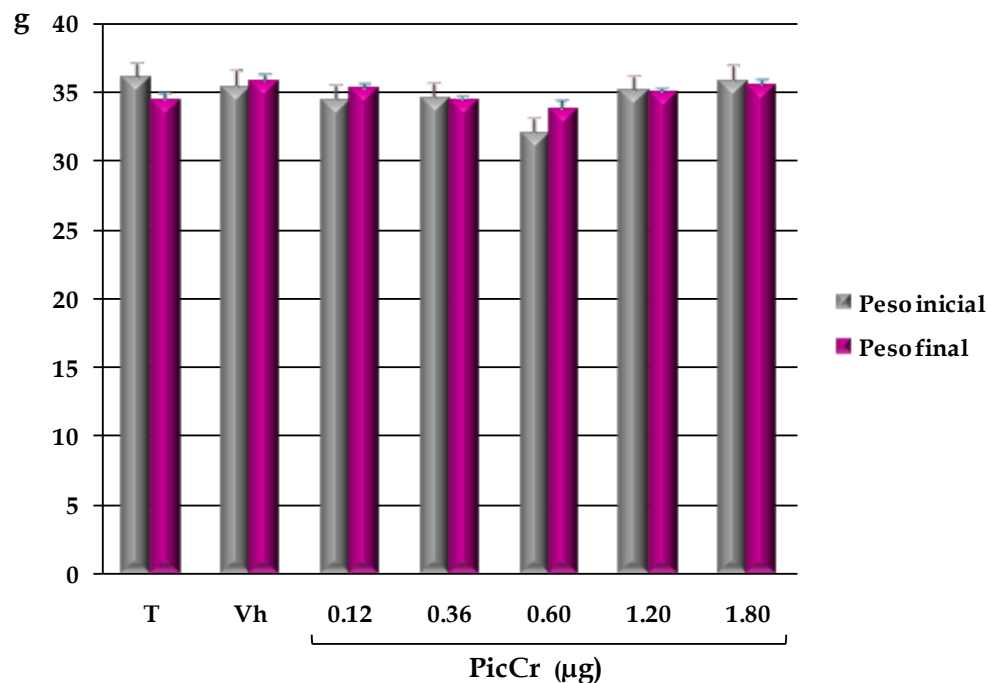


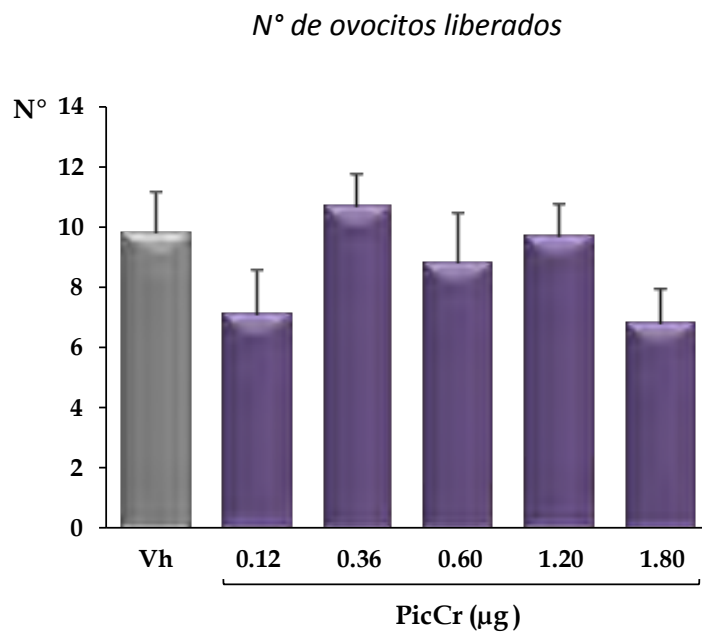
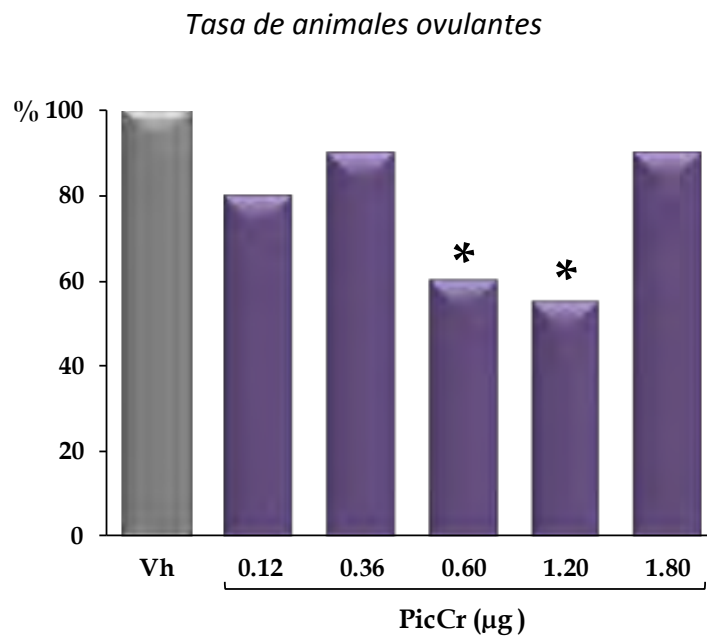
Figura 8. Peso corporal (media $\pm$ e.e.m.) de los ratones hembra adultos antes (peso inicial) y después (peso final) de ser sometidos a la ingesta diaria de PicCr (0.12, 0.36, 0.60, 1.20, 1.80 μ g) o vehículo (Vh) por 40 días y sin tratamiento (testigo [T]), inyectados con 1.5 u.i. de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados 20 horas más tarde.

En cuanto a la respuesta ovulatoria tanto los animales testigo como los tratados con Vh ovularon en respuesta al estímulo de 1.5 u.i. de eCG y 3 u.i. de hCG y liberaron un número de ovocitos similar. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso de los ovarios y del útero entre los dos grupos experimentales (Tabla 2).

Tabla 2. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media $\pm$ e.e.m. del número de ovocitos liberados y del peso de los ovarios y el útero de ratones testigo y tratados con vehículo (Vh), inyectados con 1.5 u.i. de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados 20 horas más tarde.

Parámetros	Testigo	Vh
Número de animales	10	10
TAO	100%	100 %
Número de ovocitos	11.8 $\pm$ 1.0	9.8 $\pm$ 1.3
Peso de ovarios (mg)	22.7 $\pm$ 1.5	20.2 $\pm$ 1.8
Peso de útero (mg)	148.9 $\pm$ 7.9	160.7 $\pm$ 15.1

Sólo en los grupos tratados con 0.60 y 1.20 μ g de PicCr diariamente, la tasa de animales ovulantes fue significativamente menor en comparación con el grupo Vh. No se observaron diferencias significativas en el número de ovocitos liberados con los tratamientos con PicCr respecto al grupo Vh (Figura 9).



* $p < 0.05$ vs Vh (prueba exacta de Fisher).

Figura 9. Tasa de animales ovulantes y media $\pm$ e.e.m. del número de ovocitos liberados de ratones tratados con vehículo (Vh) o con diferentes concentraciones de PicCr durante 40 días e inyectados con 1.5 u.i. de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados 20 horas más tarde.

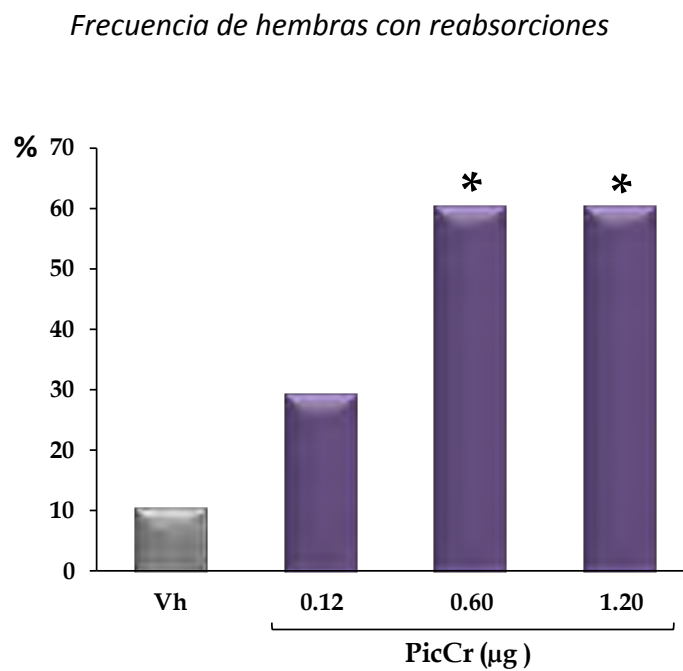
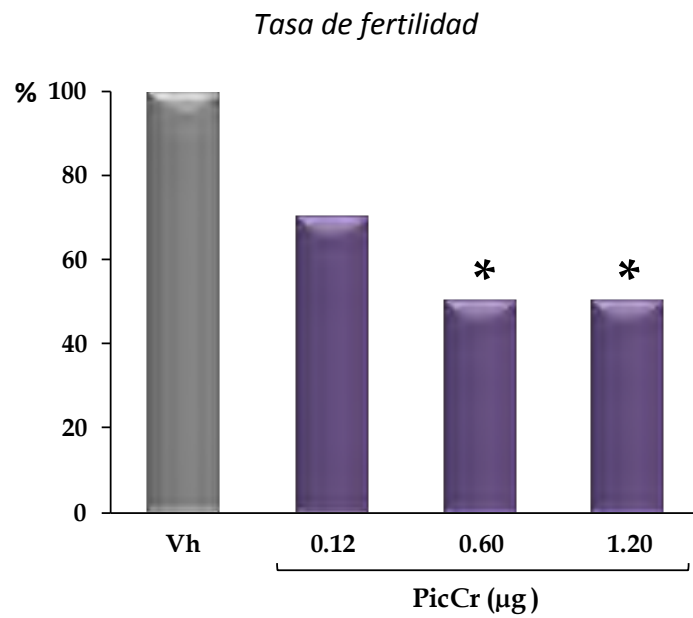
El peso de los ovarios y el útero de los animales con PicCr y tratados con gonadotropinas no presentaron diferencias significativas en comparación con el grupo con Vh (Tabla 3).

Tabla 3. Media $\pm$ e.e.m. del peso de los ovarios y del útero de ratones adultos tratados con vehículo (Vh) o con diferentes concentraciones de PicCr, durante 40 días e inyectados con 1.5 u.i. de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados 20 horas más tarde.

Grupos		Número de animales	Peso de los ovarios (mg)	Peso de útero (mg)
Vehículo		10	20.2 $\pm$ 1.8	160.7 $\pm$ 15.1
PicCr (μ g)	0.12	10	20.3 $\pm$ 0.9	185.2 $\pm$ 18.6
	0.36	10	16.9 $\pm$ 2.0	175.0 $\pm$ 25.9
	0.60	10	17.4 $\pm$ 2.0	135.2 $\pm$ 9.6
	1.20	11	18.4 $\pm$ 2.0	144.4 $\pm$ 8.2
	1.80	10	19.5 $\pm$ 2.3	182.4 $\pm$ 25.9

3. Estudio de los efectos de la ingesta diaria de PicCr sobre la fertilidad de las hembras adultas.

La tasa de fertilidad de las hembras tratadas durante 90 días con Vh fue similar a la del grupo testigo (10/10 vs 10/10). En las hembras que fueron consumidoras de PicCr durante 90 días, la tasa de fertilidad disminuyó significativamente en los grupos tratados diariamente con 0.60, 1.20 μ g en comparación con el grupo de animales con vehículo. En estos grupos se observó aumento significativo en el número de hembras que presentaron reabsorciones comparado con el grupo Vh (Figura 10). El análisis de Pearson mostró que no se correlaciona la tasa de fertilidad ($r=-0.81$, $p=0.19$) ni el número de hembras con reabsorciones ($r=0.83$, $p=0.37$), con el incremento en la dosis de PicCr.



* $p < 0.05$ vs Vh (Prueba exacta de Fisher).

Figura 10. Tasa de fertilidad de hembras que fueron consumidoras de PicCr antes de la gestación y frecuencia de madres con reabsorciones.

En los grupos tratados con PicCr, el promedio de implantes por hembra no se modificó en comparación con el grupo Vh (Tabla 4).

Cabe señalar que en las hembras que fueron consumidoras de PicCr durante 90 días, el número de fetos vivos y muertos no mostró diferencias significativas entre los grupos tratados diariamente con 0.60 ó 1.20 μg de PicCr en comparación con el grupo de animales con vehículo. En todos los grupos los fetos obtenidos a los 18 días de gestación estuvieron vivos.

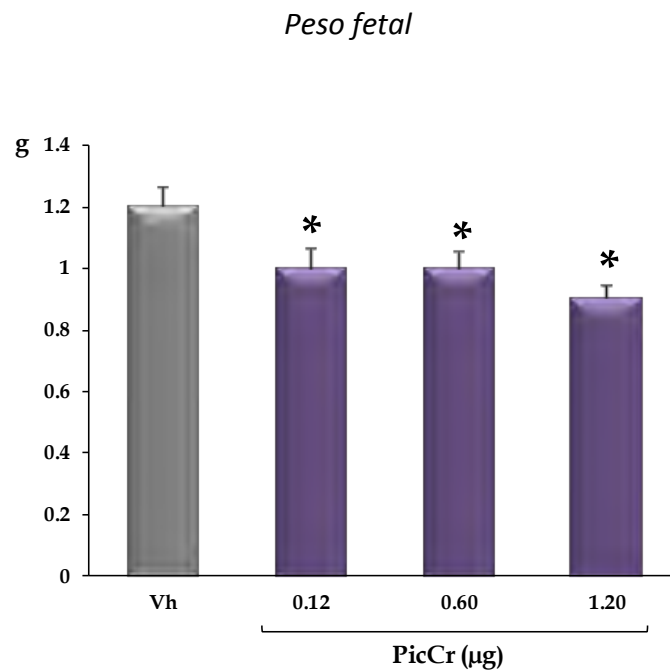
Tabla 4. Media $\pm$ e.e.m. del número de implantes por hembra de los grupos que fueron sometidos a la ingesta diaria de PicCr o vehículo (Vh) durante 90 días antes de la preñez y sacrificadas al día 18 de gestación.

Grupos		Implantes
Vh		11.1 $\pm$ 0.8
PicCr (μg)	0.12	11.1 $\pm$ 0.7
	0.60	8.8 $\pm$ 1.2
	1.20	10.2 $\pm$ 1.9

4. Características morfológicas y esqueléticas de las crías nacidas de madres que fueron consumidoras de PicCr.

El peso fetal promedio no mostró diferencias significativas entre el grupo testigo y el tratado con Vh (1.3 $\pm$ 0.03 vs 1.2 $\pm$ 0.04). El peso de los fetos obtenidos de madres que

consumieron PicCr antes de la gestación resultó ser significativamente menor, independientemente de la dosis administrada (Figura 11).



* $p < 0.05$ vs Vh (prueba de t de Student).

Figura 11. Media $\pm$ e.e.m. del peso de los fetos de hembras que fueron consumidoras de PicCr o vehículo (Vh) durante 90 días antes de la preñez y sacrificadas al día 18 de gestación.

No se observaron alteraciones morfológicas externas en los fetos, independientemente del grupo experimental.

En el grupo tratado con Vh, el número de fetos que presentaron anomalías esqueléticas no mostró diferencias significativas respecto al grupo testigo (11/43 vs 5/49).

En las hembras que fueron consumidoras de PicCr en las dosis de 0.60 y 1.20 μg , la frecuencia de fetos con anomalías esqueléticas aumentó significativamente en comparación con el grupo con Vh (Tabla 5).

No hay una relación directa entre la concentración de PicCr y la frecuencia de fetos con anomalías esqueléticas ($r=0.92$, $p=0.07$, Pearson) (Tabla 5).

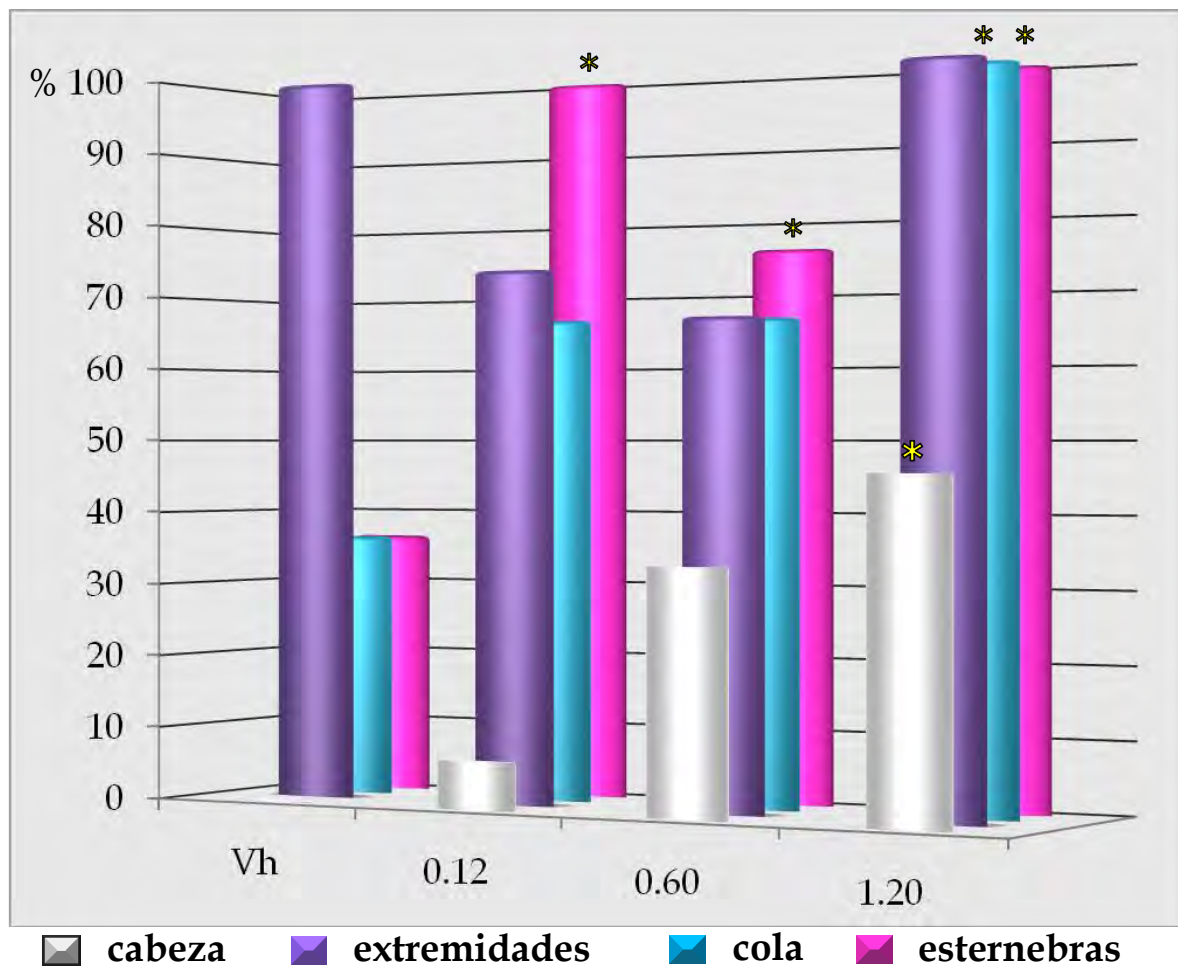
Tabla 5. Frecuencia de fetos con anomalías esqueléticas (número de fetos anormales/número total de fetos) obtenidos de hembras que fueron consumidoras de PicCr o vehículo (Vh) durante 90 días antes de la preñez y sacrificadas al día 18 de gestación.

Grupos		Número total de fetos	Número de fetos anormales	Frecuencia de fetos con anomalías
Vh		43	11	26%
PicCr (μg)	0.12	33	15	45%
	0.60	23	21 *	91% *
	1.20	24	24 *	100% *

* $p<0.05$ vs Vh (Prueba exacta de Fisher).

El número de fetos con anomalías esqueléticas en cabeza y cola fue significativamente mayor en el grupo de hembras que fueron tratadas con 1.20 de PicCr respecto al grupo con Vh. El número de fetos con anomalías en esternones aumentó significativamente en todos los grupos de hembras que fueron consumidoras de PicCr (Figura 12).

El análisis de correlación de Pearson mostró la existencia de una relación directamente proporcional entre la concentración de PicCr y la frecuencia de fetos con anomalías esqueléticas en cabeza ($r = 0.99$, $p = 0.01$).



* $p < 0.05$ vs Vh (Prueba exacta de Fisher).

Figura 12. Número de fetos con anomalías esqueléticas en cabeza, extremidades, cola y esternebras obtenidos de hembras que fueron consumidoras de PicCr o vehículo (Vh) durante 90 días antes de la preñez y sacrificadas al día 18 de gestación.

En la tabla 6 se muestran las esterneras anormales según su clasificación, presentes en los fetos obtenidos de hembras que fueron consumidoras de PicCr o Vh, donde se observa que con la dosis de 0.12 µg de PicCr hay un incremento significativo en el número de esterneras divididas y una disminución en el número de esterneras rudimentarias en comparación con el Vh.

En los fetos obtenidos de madres tratadas o no con PicCr no se encontraron esterneras bifurcadas, fusionadas o hiperplásicas.

Tabla 6. Número de esterneras asimétricas, hemiesternebras, divididas y rudimentarias observadas en los fetos de hembras que fueron consumidoras de PicCr o vehículo (Vh) durante 90 días antes de la preñez y sacrificadas al día 18 de gestación.

Grupos		Totales (%)	Asimetría (%)	Hemiesternebra (%)	Dividida (%)	Rudimentaria (%)
Vh		4	0 (0)	1 (25)	1 (25)	3 (75)
PicCr (µg)	0.12	15	3 (20)	3 (20)	12 (80)*	3 (20)*
	0.60	16	0 (0)	2 (13)	3 (19)	14 (88)
	1.20	24	0 (0)	1 (4)	15 (63)	19 (79)

* $p < 0.05$ vs Vh (prueba de Ji²).

En las figuras 13 y 14 se muestran las diferentes anomalías esqueléticas presentes en los fetos obtenidos de hembras que fueron consumidoras de PicCr y los fetos normales.

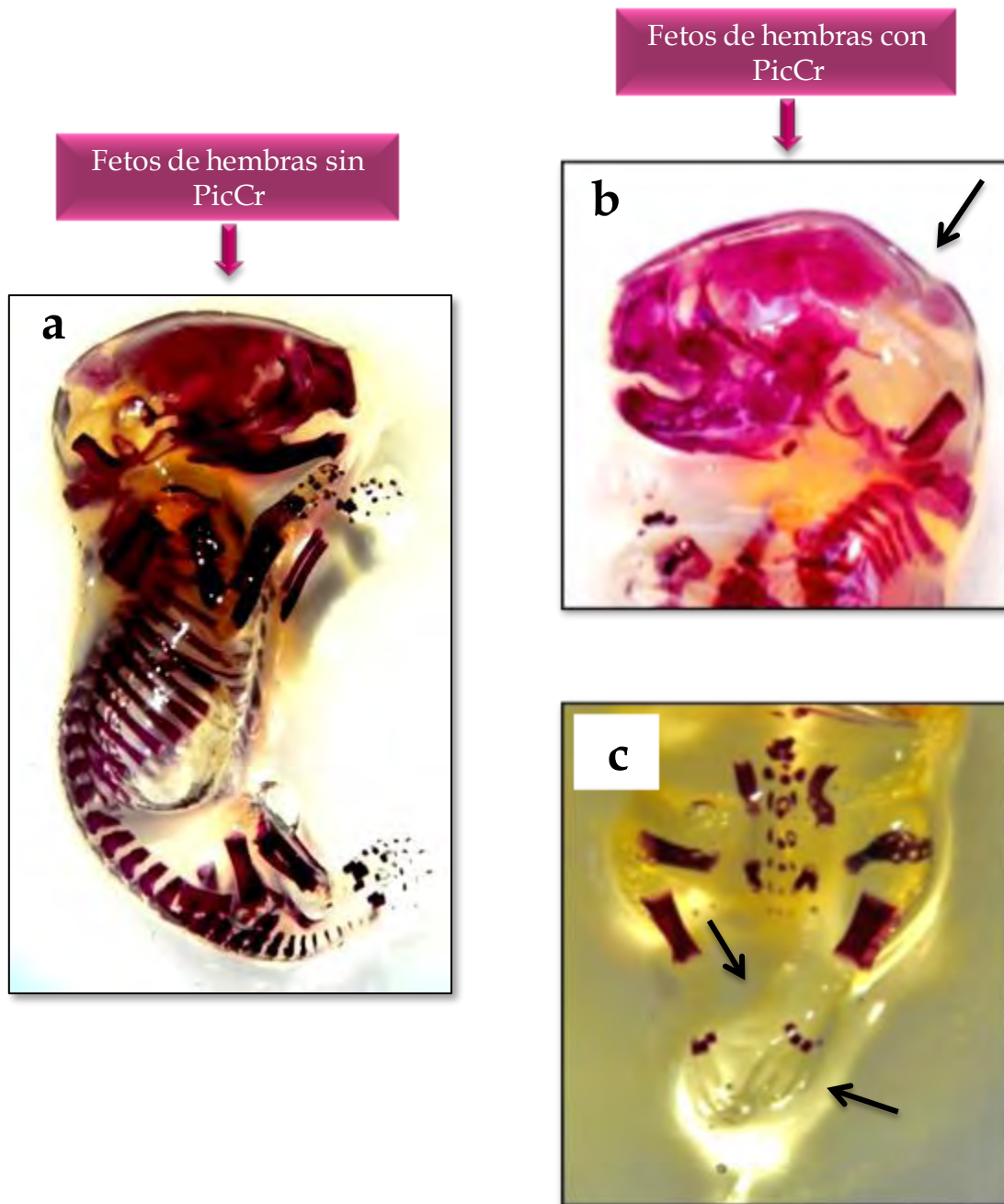


Figura 13. Fetos obtenidos de hembras que fueron consumidoras de PicCr durante 90 días antes de la preñez. Normal (a); falta de osificación en cabeza (b) y extremidades (c)

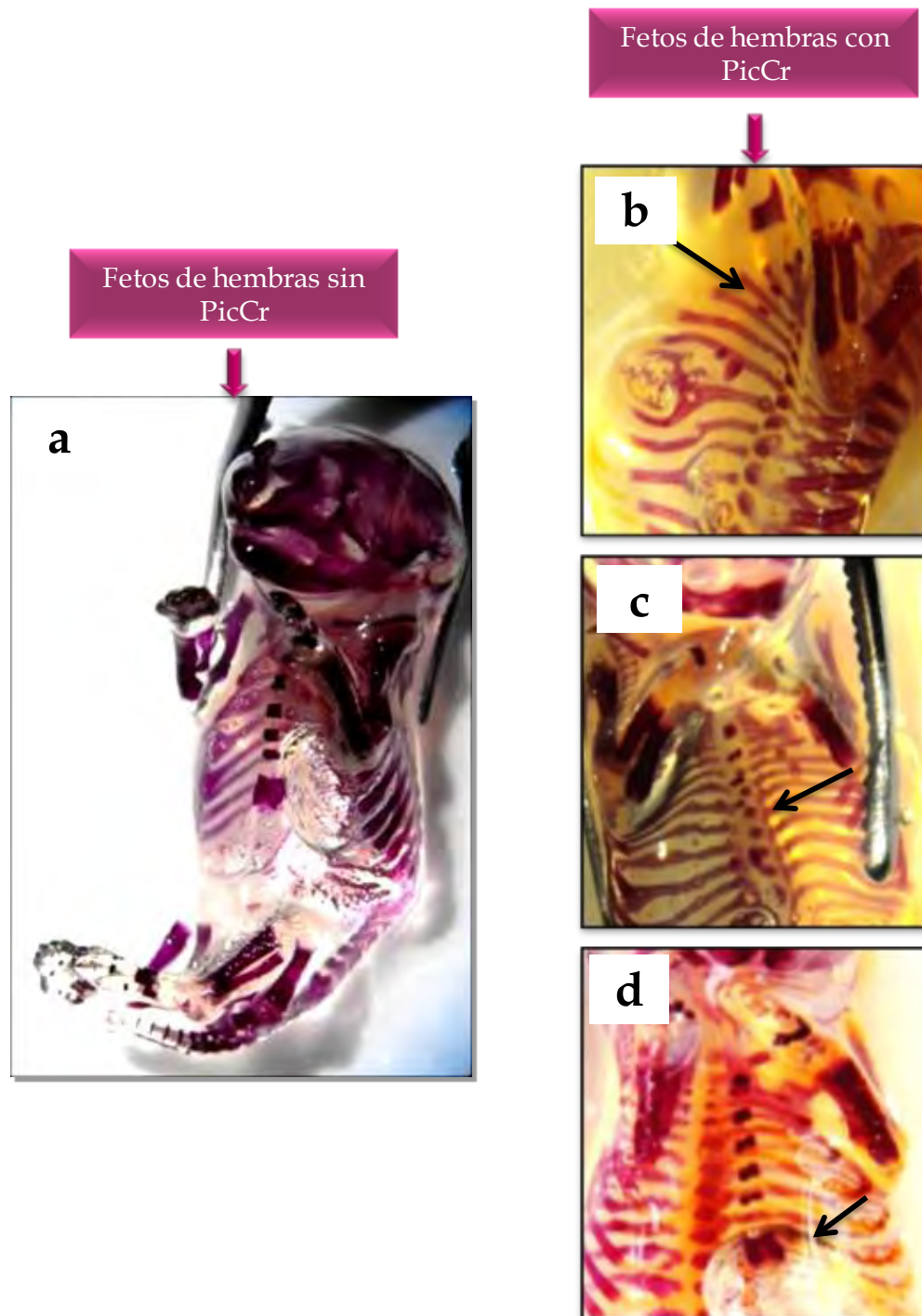


Figura 14. Fetos obtenidos de hembras que fueron consumidoras de PicCr durante 90 días antes de la preñez. Normal (a); falta de osificación en esternebras: hemiesternebras y rudimentarias (b), asimétricas (c) y divididas (d).

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que el PicCr administrado de forma prolongada a ratones hembra en edad adulta, disminuye la fertilidad y la tasa ovulatoria en respuesta a la estimulación gonadotrópica. Los fetos de hembras que fueron cosumidoras de PicCr presentan bajo peso corporal e incremento en la frecuencia de anormalidades esqueléticas.

La eCG es una gonadotropina muy utilizada en protocolos de superovulación debido a su acción estimulante, tanto para incrementar la eficiencia reproductiva con interés productivo (Brogliati y col., 1997; Maclellan y col., 1998; Murphy y col., 1998; Riesenbergr y col., 2001), como para la realización de trabajos de investigación en los que se utilizan animales de laboratorio (Walton y col., 1983; Mckiernan y Bavister, 1998; Ertzeid y Storeng, 2001; Susuki y col., 2003). Los resultados obtenidos en este estudio muestran que en el ratón adulto la administración secuencial de eCG y hCG tuvo un efecto estimulante sobre la respuesta ovulatoria, independientemente de la concentración de eCG empleada.

Una respuesta óptima en términos de tasa ovulatoria está estrechamente relacionada con la dosis utilizada de eCG. Sin embargo, un elevado número de ovocitos no siempre se correlaciona con la calidad de los mismos (Miller y Armstrong, 1981; Walton y col., 1983; Ertzeid y Storeng, 1992; Mckiernan, y Bavister, 1998; Murphy y col., 1998; Ertzeid y Storeng, 2001; Van Der y D'hooghe, 2001). La prueba de ovulación inducida se realizó con diferentes concentraciones de eCG con la finalidad de obtener el 100% de animales ovulantes y cuya cuota ovulatoria fuera similar al número de crías promedio por parición que presenta el ratón CD1 adulto bajo nuestras condiciones de confinamiento (14 ± 0.4 crías) (Reyes, 2010). En este estudio

la concentración de 1.5 u.i. de eCG fue la que cumplió con esta condición, considerándose como superovulación la respuesta obtenida con 3 ó 5 u.i. de eCG.

Las variaciones observadas en el peso de los ovarios de las hembras estimuladas con diferentes dosis de eCG respecto a las hembras sin estimulación hormonal, estarían relacionadas principalmente con los cambios que ocurren en el crecimiento y diferenciación de los folículos durante la fase preovulatoria que se transforman en cambios morfológicos cuantitativos después de la ovulación (Richards, 1980).

Dentro de los efectos de la eCG, se ha descrito que en el ovario de los roedores previene la entrada de los folículos a la atresia o los rescata de la misma (Peters y col., 1975; García, 1997). Desde el punto de vista endócrino es importante resaltar que la eCG posee actividad FSH y LH, lo que promueve la maduración gonadal y la esteroidogénesis (Prieto, 2002). Así, el tratamiento con dosis altas de eCG provoca el reclutamiento de un mayor número de folículos sanos, que llegan a la ovulación bajo el estímulo de hCG, efectos que se reflejan en nuestros resultados.

Se ha relacionado a los suplementos de cromo con la pérdida de peso y grasa corporal, lo que ha llevado al PicCr a ganar popularidad como suplemento dietético, especialmente entre quienes integran programas de reducción de peso (Caffaratti y Briñon, 2005). Sin embargo no existen evidencias que indiquen que los suplementos de cromo incrementan la masa muscular a un nivel mayor al que se produce con una dieta saludable y ejercicio físico (Caffaratti y Briñon, 2005). Stout y col., en 2009 muestran que la adición de PicCr a la dieta diaria de ratas y ratones de ambos sexos durante dos años no modifica el peso corporal a lo largo del experimento. Nuestros resultados coinciden con este estudio, ya que el peso corporal de las hembras antes, durante y al término del tratamiento prolongado con PicCr fue similar.

Se ha descrito que concentraciones altas de PicCr provocan daño cromosómico en las células CHO al exceder los límites que pueden soportar las células *in vivo* (Stearns y col., 1995a). Ortega en 2011, describe que el PicCr adicionado al cultivo de células de la granulosa de mujer, modifica la esteroidogénesis y daña al ADN, lo que se traduciría en un desbalance hormonal que comprometería la ovulación. Nuestros resultados muestran que la ingesta prolongada de concentraciones medias y altas de PicCr modifica la capacidad ovulatoria de ratones que fueron estimulados con gonadotropinas, ya que inhibe la ovulación en el 50% de los animales.

Estudios *in vitro* indican que la comunicación entre las células de la granulosa y el ovocito es un fenómeno esencial para el crecimiento temprano del folículo, para corroborar lo anterior Tsafri, (1997) separó el ovocito inmaduro de las células de la granulosa, lo que detuvo el crecimiento. McGee y col. (1997) observaron en roedores que los folículos preantrales cultivados en ausencia de suero folicular sufren apoptosis a pesar de estar expuestos a las gonadotropinas, a sus análogos o al AMPc (McGee y Hsueh, 2000). Con estos antecedentes y nuestros resultados se puede sugerir que aunque la cuota ovulatoria de los animales tratados con PicCr que lograron ovular no fuera afectada, los ovocitos pueden no ser viables.

A la fecha no existen estudios sobre los efectos que el PicCr pueda tener en la fertilidad de la hembra; tampoco sobre el posible potencial dañino al embrión y/o feto cuando la hembra consumidora de PicCr deja de consumirlo al iniciar la gestación. Este es el primer estudio realizado en la hembra de mamíferos en edad reproductiva que muestra que la ingesta de dosis medias de PicCr durante largos periodos de tiempo disminuye la tasa de fertilidad y aunque esta condición se interrumpa antes de la gestación induce alteraciones en el desarrollo prenatal de la progenie.

En los protocolos de investigación en toxicología reproductiva establecidos para detectar alteraciones en la fertilidad, los organismos se deben exponer al agente tóxico durante todo el ciclo reproductivo, en el caso de los machos se tratan por lo menos un ciclo espermatogénico y en la hembra en el último estado de maduración del ovocito, antes que los animales de generación progenitora (F0) sean apareados, aunque en algunos casos la exposición de las hembras se puede continuar después del apareamiento y hasta el final de la lactancia (ECETOC, 1983).

Los índices de implantación y reabsorción son medidas indirectas de la viabilidad del cigoto, del proceso de implantación y del desarrollo embrionario. El primer índice aporta información sobre los ovocitos que, una vez fecundados lograron anclarse a las paredes del útero; en tanto que el segundo informa sobre el desarrollo del embrión a partir de su implantación (De Oliveira, 1989). En este estudio la tasa de fertilidad disminuye al incrementar la dosis de PicCr, lo que parece estar relacionado con el aumento en la frecuencia de hembras que presentaron reabsorciones. Estos resultados apoyan la interpretación de que no todos los ovocitos ovulados por los animales tratados con PicCr son viables.

El bajo peso al nacimiento es en general un índice de la condición del recién nacido (Kalman, 1989). Este parámetro en algunos casos también refleja la condición materna, ya que existe la posibilidad de que se deba a la toxicidad o desnutrición materna más que a la acción del agente directamente sobre el feto (Torchinsky y col., 2011). Lo anterior, aunado al hecho que el PicCr tiende a acumularse en varios órganos (riñones, músculo, hígado, bazo, corazón, páncreas y hueso) (Mertz, 1988; Cefalu y Hu, 2004), nos permite sugerir que el bajo peso de los fetos obtenidos de madres que fueron consumidoras de PicCr es el resultado de la acción del PicCr sobre el desarrollo *in utero*.

El esqueleto fetal es un fino indicador de daño durante el desarrollo prenatal (Kalman, 1989), aún sin que se manifiesten alteraciones morfológicas externas, como ocurrió en este estudio.

En un estudio realizado por Bailey y col. (2006), utilizando al ratón hembra gestante, muestra que el tratamiento oral con 200 mg/kg PicCr del día 6 al 17 de preñez resulta en defectos en el desarrollo de la descendencia (anomalías vertebrales) en una frecuencia significativamente mayor a la observada en los fetos de hembras tratadas con ClCr o AcPic. En contraste con este estudio, nuestros resultados muestran que los efectos del PicCr no sólo se manifiestan al exponer a la descendencia durante el desarrollo prenatal, sino también representa un riesgo para los fetos de madres que consumieron PicCr antes de la gestación, ya que la disminución en los centros de osificación de cabeza, cola, extremidades y esternones indica la permanencia de la acción adversa del PicCr sobre el proceso de osificación.

Muchas de las anomalías en esternones se pueden atribuir a un retraso en la velocidad normal de osificación o a alteraciones en el desarrollo. Una marcada disminución en el peso fetal frecuentemente es reflejo del retraso en la osificación (Kappen y col., 2007). El aumento en el porcentaje de esternones anormales aunado al bajo peso corporal, muestran que el PicCr retrasa el crecimiento intrauterino

Algunos teratógenos administrados a dosis que no inducen anomalías estructurales al nacimiento o retraso en el crecimiento fetal, pueden dañar la osteogénesis comprometiendo la estructura ósea de la descendencia en la etapa adulta (Torchinsky y col., 2011). En el ratón, las anomalías esqueléticas a menudo no interfieren con la viabilidad y la capacidad reproductiva (Kappen y col., 2007).

No existe un mecanismo que explique completamente como se originan las anomalías fetales originadas por agentes tóxicos. En algunos casos se sabe que el compuesto interactúa con la madre o directamente con el producto en desarrollo, pero la ruta o las vías por las cuales se da el efecto final que se observa como una malformación determinada no siempre es posible determinarlas (Scialli, 1992).

Los metales tienen diferentes mecanismos de acción, recientemente se han estudiado los relacionados con las alteraciones endócrinas y el estrés oxidante. Los efectos producidos por los metales dependen de varios factores, tales como el tiempo y duración de la exposición, la distribución y la acumulación en varios órganos, y en la capacidad de interferir con los procesos de desarrollo de los órganos (Apostoli y col., 2007).

Bailey y col. (2006), sugieren que la combinación química del ácido picolínico y el cromo es la responsable de las anomalías vertebrales observadas en fetos expuestos a PicCr durante la gestación. Speetjens y col (1999), mencionan que al parecer la unión del picolinato con el centro crómico del complejo, permite que éste pueda ser reducido por agentes biológicos reductores como el ascorbato (vitamina C) y trioles. El complejo resultante puede interactuar con oxígeno catalítico generando especies reactivas de oxígeno (ERO) (Vincent, 2000). En humanos se ha mostrado que el PicCr es citotóxico ya que en linfocitos de sangre periférica al ser expuestos se induce apoptosis a través de la generación de ERO (Jana y col., 2009).

Las ERO son un conjunto de moléculas muy reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno, entre ellas se encuentran los radicales libres. Su gran reactividad se debe a que poseen electrones desapareados que les permite reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de oxido-reducción. El

desbalance en la producción de ERO y la defensa antioxidante que provoca el estrés “oxidante” llevan a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales provocan el deterioro y muerte celular (Gastel y Perez, 2009).

El potencial del PicCr para causar daño se encuentra en su estabilidad, ya que la molécula puede entrar intacta en las células y generar el daño al ADN (Hepburn y col., 2003b).

Estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que los efectos del PicCr se deben al compuesto en sí y no a la acción por separado de sus componentes, ya que ni el Cr (en forma de cloruro) ni el AcPic han mostrado tener efectos tóxicos (Hepburn y col. 2003a; Bailey, 2006; Ortega, 2011).

El PicCr induce una amplia variedad de efectos adversos sobre la reproducción y el desarrollo prenatal por lo que se sugerimos que el uso, abuso o consumo prolongado de PicCr como suplemento alimenticio es perjudicial a la salud reproductiva de la hembra.

CONCLUSIONES

- En ratones hembra adultos, la ingesta diaria de PicCr disminuye la respuesta ovulatoria frente al estímulo gonadotrópico.
- La ingesta de PicCr en forma prolongada disminuye la tasa de fertilidad.
- Las hembras gestantes que fueron consumidoras de PicCr presentan mayor riesgo de reabsorciones aunado a menor peso fetal.
- El PicCr tiene efectos embriotóxicos y fetotóxicos evidenciados por el retraso en el proceso de osificación y el bajo peso corporal.
- En los fetos de hembras que fueron consumidoras de PicCr se incrementa la frecuencia de anormalidades esqueléticas en cabeza, extremidades, cola y esternones.

BIBLIOGRAFÍA

- Altamirano-Lozano MA. y Rodríguez-Mercado JJ. (2006). Vanadio: Contaminación, Metabolismo y Genotoxicidad. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **22**: 173-189.
- Anderson, RA. (1987). Chromium in tissues and fluids. En: Trace Elements in Human and Animal Nutrition. W. Mertz. Ed. 5^{ta} edición. Academy Press, New York. pp: 225-224.
- Apostoli P, Telisman S, Sager PR. (2007). Reproductive and developmental toxicity of metals. En: Handbook on the Toxicology of Metals. 3^a edición. Academy Press. USA. pp: 213-215.
- Armendariz-Anguiano AL, Bacardí-Gascón M y Jiménez CA. (2007). Evidencias del efecto del cromo en personas con diabetes: revisión sistemática. *Rev Biomed.* **18**: 117-126.
- Audesirk T y Audesirk G. (1997). Biología. La Vida en la Tierra. 4^a edición. Pearson. México. pp: 765-775.
- Bailey M, Boohaker J, Sawyer R, Behling J, Rasco J, Jernigan J, Hood R, Vincent J. (2006). Exposure of pregnant mice to chromium picolinate results in skeletal defects in their offspring. *Birth Defects Res. B.* **77**: 244-249.
- Barria A, Lara HE. (1991). A quantitative analysis of the maturation of steroids secretion. Role of sympathetic innervation. *Arch. Biol. Med. Exp.* **24**: R-154.
- Bentley GR, Mascie-Taylor N. (2000). Infertility in the modern world: present and future prospects. 1^a edición. Cambridge University Press. UK. Pp: 1-13.
- Bonilla E, Altamirano M, Casas E, Fierro R, Ducolomb Y, Betancourt M. (2001). Identificación de reprotóxicos en el laboratorio. En: Biología de la Reproducción II. J Velázquez Ed. PUIS-UNAM, UAM. México. Pp: 257-276.
- Borel JS, Majerua TC y Polansky MM. (1984). Chromium intake and urinary chromium excretion of trauma patients. *Biol. Trace Elem. Res.* **6**: 317-326.
- Bousfield GR, Jia L y Ward D. (2006). Gonadotropins: chemistry and biosynthesis. En: Physiology of Reproduction. Vol. 1. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York. Pp: 1581-1634.
- Branch S, Cisneron FJ. (2004). Transplacental exposure to the DNA demethylating agent, 5-AZA-CdR, affects the sexual behavior of CD-1 male mice. National Center for Toxicological Research /FDA, 3900 NCTR Drive, Jefferson, AR 72079, USA. Pp: 411-41.

- Brogliati GM, Salamone DF y Adams GP. (1997). Ovarian follicular waves synchronization and superstimulation in prepuberal calves. *Theriogenology* **47**: 1253-1264.
- Brugo-Olmedo S, Chillik C y Kopelman S. (2003). Definición y causas de infertilidad. Artículo de revisión. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. **54**: 227-248.
- Caffaratti M y Briñon MC. (2005). Suplementos dietarios: Picolinato de cromo (Revisión) Centro de Información de Medicamentos (CIME).
- Carruthers A. (1990). Facilitated diffusion of glucose. *Physiol. Rev.* **70**: 1135-1176.
- Castrejón V, Cárbo R y Martínez M. (2007). Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *REB*. **26**: 49-57.
- Cefalu WT y Hu FB. (2004). Role of chromium in human health and diabetes. *Diabet. Care*. **27**: 2741-51.
- Chang X, Mowat DN y Mallard BA. (1994). Supplemental chromium and niacin for stressed feeder calves. *Canadian Journal of Animal Science* **75**: 351-358.
- Chedrese J. (2003). Regulación autócrina y parácrina del desarrollo folicular I: Efectos de los esteroides. *Rev. Col. Cienc. Pec.* **16**: 171-182.
- Clodfelder BJ, Emamaulee J, Hepburn DD, Chakov NE, Nettles HS y Vincent JB. (2001). The trail of chromium (III) *in vivo* from the blood to the urine: the roles of 63rgãos63ário63 and chromodulin. *J. Biol. Inorg. Chem.* **6**: 608-617.
- Cuapio P, Rosas P, Rocha F, Domínguez R y Pellicer A. (2009). Effects of chromium picolinate on seminal parameters of young adult males. 9th International Congress off Andrology. *Journal of Andrology* **30**, supp P 18. Barcelona, España.
- Davis C y Vincent J. (1997). Chromium oligopeptide activates insulin receptor kinase activity: *Biochem.* **36**: 4382-4385.
- De la Lastra M y Leal J. (1989). Factor hipotalámico inhibidor de la secreción de hormona luteinizante: relación con fragmento 1-5 de hormona liberadora de LH. *Arch. Biol. Med. Exp.* **22**: 53-59.
- De Oliveira M. (1989). Alteracao do desenvolvimento embrionario de ratas apos tratamento con extractos aquosos de diferentes orgaos de Petiveria Alliacea. *Bol. Cent. Biol. Reprod.* **8**: 17-22.
- Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y y Delbaere A. (2005). Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction* **130**: 147-156.

- Domínguez R, Chávez R y Cruz ME. (1991). La regulación del crecimiento y del folículo ovárico. En: Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. R Domínguez Ed. PUIS-UNAM, MA Porrúa, México. pp: 161-192.
- Dowling H, Offenbacher E y Pi-Sunyer X. (1990). Effects of aminoacids on the absorption of trivalent chromium and its retention by regions of the rat small intestine. *Nutr. Res.* **10**: 1261-1271.
- ECETOC (1983). Identification and assessment of the effects of chemicals on production and development reproductive toxicology. Monograph No. 5
- Ertzeid G y Storeng R. (1992). Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre- and poststimulation developmet in mice. *J. Reprod. Fertil.* **96**: 649-655.
- Ertzeid G y Storeng R. (2001). The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum. Reprod.* **16**: 221-225.
- ESHRE Capri Workshop. (1996). Infertility revisited: The state of the art today and tomorrow. *Hum. Reprod.* **11**: 117-1807.
- Everett J. (1994). Pituitary and hypothalamus; perspectives and overview. En: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York. pp: 1509-1526.
- Figueroa D. (2003). Diabetes. 4ª edición. Masson. España. pp: 25-36, 203-206.
- Fink G. (1986). The endocrine control of ovulation. *Sci. Prog. Oxf.* **70**: 403-423.
- Food and nutrition Board, Insitute of Medicine. (2002). Chromium. Dietary reference intakes for Vitamin A, Vitamin C, arsenic, Boron, chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molibdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and zinc, Academic Press. EUA.
- Franks S. (1995). Diagnosis and treatment of anovulation. En: *Ovarian endocrinology*. SG Hillier Ed. Blackwell Scientific Publications, UK. pp: 227-238.
- García R, Ballesteros LM, Hernández PO, Rosales AM, Espinosa R, Soto H, Díaz de León L, Rosado A. (1997). Metalloproteinase activity during growth, maturation and atresia in the ovarian follicles of the goat. *Anim. Reprod. S.* **47**: 211-228.
- Gardner Weston D. (1981). Anatomía Humana. Nueva Editorial Interamericana 3ª edición México. pp: 482-491.
- Gartner L.P y Hiatt JL. (2003). Histología Texto y Atlas. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. España. pp: 421-427, 581-590.
- Geneser F. (2000). Histología sobre bases biomoleculares. 3ª edición Editorial Médica Panamericana. España. pp: 421-425, 581-586.

- Goldfien Alan y Scott E. Monroe (1988). Ovarios. En: Endocrinología básica y clínica. Editorial el Manual Moderno. México. pp: 379-425.
- Gómez AG y Magaña PG. (2003). Papel del cromo y del cinc en el metabolismo de la insulina. *Rev. Med. IMSS*. **42**: 347-352.
- González MM, Meseguer I, Martínez PM, Aguilar MV y Bernao A. (2006). Repercusiones del picolinato de cromo en el metabolismo protéico en función de la edad. *Nutri Hosp*. **21**: 709-714.
- Gore-Langton RE y Armstrong DT. (1994). Follicular steroidogénesis and its control. En: The Physiology of Reproduction. E. Knobil y JD Neill Eds., 2ª edición. Raven Press. New York. pp: 571-627.
- Greenwald GS y Roy SK. (1994). Follicular development and its control. En: The Physiology of Reproduction. E Knobil y JD Neil Eds. 2ª edición. Raven Press, New York. 721-724.
- Greenwald GS. (1989). Temporal and topographic changes in DNA synthesis after induced follicular atresia. *Biol. Reprod*. **41**: 175-181.
- Guyton AC. (1984). Tratado de Fisiología Medica. 6ª edición. Interamericana, España. pp: 1117-1204.
- Havel PJ (2004). A scientific review: The role of chromium in insulin resistance. *Nutrition* **21**: 2-14.
- Hemken RW. (1997). Role of organic trace minerals in animal nutrition. European and African Lecture. Altech's. pp: 47-52.
- Henderson LM y Swan PB. (1971). Picolinic acid carboxylase. En: McCormick DB y Wright LD. Academic Press. New York. *Methods in Enzymology*. 175-180.
- Hepburn DDD, Xiao J, Bindom S, Vincent JB y O'Donnell J. (2003). Nutritional supplement chromium picolinate causes sterility and lethal mutations in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*. **100**: 3766-3771.
- Hurwitz A y Adashi E. (1992). Ovarian follicular atresia as a apoptotic process: a paradigm for programmed cell death in endocrine tissues. *Mol. Cell Endocrinol*. **84**: 19-23.
- Jana M, Rajaram A y Rajaram R. (2009). Chromium picolinate induced apoptosis lymphocytes and the signaling mechanisms thereof. *Toxicol Appl Pharmacol*. **237**: 331-44.
- Jeejeebhoy KN. (1999). The role of chromium in nutrition and therapeutics and as a potential toxin. *Nutr. Rev*. **57**: 329-335.
- Kalman TS. (1989). Skeletal System En: Congenital Malformations in Laboratory and Farm Animals. Academic Press. Toronto Canada. 144-183.

- Kappen C, Neubüser A, Balling R y Finnell R. (2007). Molecular basis for skeletal variation: insights from developmental genetic studies in mice. *Birth Defects Research. Part B: Dev. Reprod. Toxicol.* **80**: 425-450.
- Khera KS. (1984). Maternal toxicity-A posible factor in fetal malformations in mice. *Teratology* **29**: 411-416.
- King JC y Rubin BS. (1995). Dynamic alterations in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neuronal cell bodies and terminals of adult rats. *Cell Mol. Neurobiol.* **15**: 89-106.
- Langwinsky D y Patino HO. (2002). A Nutrição de ruminantes e os complexos orgânicos de minerais. São Paulo. Tortuga. P. pp: 52.
- Lesson CR y Lesson TS. (1992). Histología. 4ª edición. Interamericana, México. pp: 602.
- Levina A y Lay PA. (2008). Chemical properties and toxicity of chromium (III) nutritional supplements. *Chem. Res. Toxicol.* **21**: 563-571.
- Maclellan, L. J, Whyte TR, Murray A, Fitzpatrick LA, Earl CR, Aspden WJ, Kinder JE, Walsh J, Triqq TE y Docchio MJ. (1998). Superstimulation of ovarian follicular growth with FSH, oocyte recovery, and embryo production from zebu (*Bos indicus*) claves: Effects of treatment with a GnRH agonist. *Theriogenology* **49**: 1317-1329.
- Mastick CC, Aebersold R y Lienhard GE. (1994). Characterization of a major protein in GLUT 4 vesicles. *J. Biol. Chem.* **269**: 6089-6092.
- McGee EA y Hsueh AJW (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* **21**: 200-214.
- McGee EA, Spears N, Minami S, Hsu SY, Chun SY, Billig H, Hsueh AJ. (1997). Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* **138**: 2417-2424.
- Mckiernan SH y Bavister BD. (1998). Gonadotrophin stimulation of donor females decreases post-implantation viability of cultured one cell hamster embryos. *Hum Reprod.* **13**: 724-729.
- McLaren DS y Meguid MM. (1993). La nutrición y sus trastornos. Editorial el Manual Moderno. México. pp: 32, 48-49, 63-66, 148.
- Melvin HW. (2002). Nutrición para la salud, la condición física y el deporte. Editorial Paidotribo. México. pp: 262-264.
- Merchenthaler I, Setalo G, Csontos C, Petrusz P, Flerko B y Negro-Vilar A.

- (1989). Combined retrograde tracing and immunocytochemical identification of luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin-containing neurons projecting to the median eminence of the rat. *Endocrinology*. **125**: 2812-2821.
- Mertz W. (1988). Is chromium essential for humans?. *Nutr. Rev.* **46**: 17-20.
 - Miller B y Armstrong DT. (1981). Effects of a superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotrophin on ovarian function; serum estradiol, and progesterone levels and early embryo development in immature rats. *Biol Reprod.* **25**: 261-271.
 - Moreno JR. (2007). Importancia del cromo en el organismo de personas con diabetes tipo II. *Rev. Tec.* **5**:3-7.
 - Murphy MG, Boland MP y Roche JF. (1998). The effects of dose and duration of administration of FSH during the first follicular wave on the ovulation rate of beef heifers. *Theriogenology*. **49**: 557-569.
 - Nielsen FH. (1984). Ultra trace elements in nutrition. *Ann. Rev. Nutr.* **4**:21-41.
 - NIOSH, (1999). The effects of workplace Hazards on Female Reproductive Health. DHHS (NIOSH) Cincinnati. pp: 99 -104.
 - Niswender GD, Juengell JL, Silva PJ, Rollynson MK, McIntush EW. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.* **80**: 1-29.
 - Ojeda SR y Urbanski HF. (1994). Puberty in the rat. En: The Physiology of Reproduction. E Knobil y JD Neil Eds. Raven Press, New York. pp: 363-409.
 - OMS. Programa Internacional de Seguridad de Sustancias Químicas. Seguridad química; principios básicos de toxicología aplicada. La naturaleza de los peligros químicos. 2ª edición. Lima: CEPIS; 1997.
 - Ortega C. (2011). Efectos del picolinato de cromo sobre la esteroidogénesis y la integridad cromosómica de las células de la granulosa en cultivo. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
 - Palkovits M. (2000). Micro and macroscopic structure, innervation, and vasculature of the hypothalamus. En: Neuroendocrinology in Physiology and Medicine. PM Conn y ME Freeman Eds. Human Press, New Jersey. pp: 23-40.
 - Palmer A. K. (1980). The Principles and methods in Modern Toxicology. Elsevier/North Holland, New York. pp:139-156.
 - Pérez Gastell PL y Pérez de Alejo JL. (2000). Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev. Cubana Med. Milit.* **29**:192-8.

- Peters H. (1978). Folliculogenesis in mammals. En: The vertebrates ovary. comparative biology. RE Jones Ed., Plenum Press, New York. pp: 121-145.
- Peters H, Byskov AG, Himelstein-Braw R and Faber M. (1975). Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *J. Reprod. Fertile.* **45**: 559-566.
- Pimentel A. (2006). Tópicos de genética. En: Alteraciones reproductivas y del desarrollo inducidas por metales: El vanadio como ejemplo. 1ª edición. México. pp: 237- 249.
- Prieto Gómez B y Velázquez Paniagua M. (2002). Monografía Fisiología de la Reproducción: hormona liberadora de gonadofinas. *Rev. Fac. Med. UNAM.* **45**:252-257.
- Rebello T, Linnerdal B y Hurley LS. (1982). Picolinic acidimilk, pancreatic juice, and intestine: inadequate forroleinzincabsorption. *Am. Clin. Nuir.* **35**: 1-5.
- Richards JS. (1980). Maturation of ovarian follicles actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev.* **60**: 51-89.
- Richards JS y Hedin L. (1988). Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Ann. Rev. Physiol.* **50**: 441-463.
- Riesenbergs S, Meinecke-Tillmann S, Meinecke B. (2001). Ultrasonic study of follicular dynamics following superovulation in German merino ewes. *Theriogenology.* **55**: 847-865.
- Rosas A. (2009). Efecto del picolinato de cromo en parámetros seminales y en las concentraciones de glucosa e insulina. Tesis de licenciatura. Carrera de Biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Ross HM y Pawlina W. (2007). Histología texto y atlas color con Biología Celular y Molecular. 5ª edición. Editorial Médica Panamericana, México. pp: 644-655, 728-730.
- Ross, MH, Reth, EW y Romell, LJ. (1992). El ovario. En: Histología, Texto y atlas a color. Panamericana, Buenos Aires. pp: 830-844.
- Roth RA, Lui F y Chin JE. (1994). Biochemical mechanism of insulin resistance. *Hormone Res.* **41**: 51-55.
- Ryan GJ, Wanko NS, Redman AR y Cook CB. (2003). Chromium as Adjunctive treatment for type 2 Diabetes. *Ann Pharmacother.* **37**: 876-85.
- Sánchez JE. (2003). Fisiología del ovario. En: Fisiología humana. JAF Tresguerres, E Aguilar, MV Cachofeiro, D Cardinali, P Gil-Loyzaga, J Martínez,

- F Mora, R Rodríguez, M Romano J, Tamargo, P Zarco, Eds. 2ª edición. Mac Graw-Hill, España. pp: 1036-1048.
- Schwarz K and Mertz W. (1959). Chromium III and the glucose tolerance factor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **85**: 292-295.
 - Scialli R.A. (1992). A clinical guide to reproductive and development toxicology. CRC, Boca Raton Ann Arbor Florida, EUA, pp: 284
 - Seaborn C y Stoecker B. (1990). Effects of antacid ascorbic acid on tissue accumulation and urinary excretion of Cr51 chromium. *Nutr. Res.* **10**: 1401-1407.
 - Sharma RK. (2000). Follicular atresia in goat: A review. *Ind. J. Anim. Sci.* **70**: 1035-1046.
 - Shepard, T. (1995). Catalog of teratogenic agents. 8ª edición.. The Johns Hopkins University Press. London. pp: 542.
 - Silverman AJ, Livne I y Witkin JW. (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: immunocytochemistry and *in situ* hybridization. En: The Physiology of reproduction. E. Knobil y JD Neil Eds, 2ª edición. Raven Press, New York pp: 1683-1709.
 - Snell RS. (1999). Neuroanatomía clínica. 4ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. pp: 481-486
 - Solórzano del Río HE. (1998). Un nuevo remedio natural para perder peso: el picolinato de cromo. *Terapia Bioquímica Nutricional*. OASA. México. pp: 24-32.
 - Spey LL and Lipner H. (1994). Ovulation. En: The physiology of Reproduction Knobil, E. and J Neil Eds. Academic Press **13**: 725-780.
 - Stearns DM, Wise JP Sr, Patierno SR y Wetterhahn KE. (1995a). Chromium (III) picolinate produces chromosome damage in Chinese hamster ovary cells. *FASEB J.* **9**: 1643-1648.
 - Stearns DM, Wise JP, Patierno SR y Wetterhahn. (1995b). Chromium (III) accumulation in human Chromium dietary supplements. *J. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **9**: 1650-1657.
 - Steele NC, Althen TG y Frobish LT. (1977). Biological activity of glucose tolerance factor in swine. *J. Anim. Sci.* **45**: 1341-1345.
 - Steepjens JK, Collins RA, Vincent JB y Woski SA. (1999). The nutritional supplement chromium (III) tris (picolinate) cleaves DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **12**: 483-487.
 - Strauss JF y Williams CJ. (2009). The ovary life cycle. En: Reproductive

- Endocrinology Physiology, Pathophysiology and Clinical Management. JF Strauss y RL Barbieri Eds. Elsevier. Philadelphia. pp: 155-190.
- Striffer J, Polansky M y Anderson R. (1993). Dietary chromium enhances insulin secretion in perfused rat pancreas. *Trace Elem. Exper. Med.* **6**: 75-81.
 - Sung-Il K, Dong-Jin W, Myung-Hee L, Gun Jo W, Dae-Kyung K y Ki-Won C. (2003). Determination of chromium (III) picolinate using high performance liquid chromatography-ultraviolet spectrophotometry. *Bull Korean Chem. Soc.* **24**:151.152.
 - Susuki O, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y y Matsuda J. (2003). Optimization of superovulation induction by human menopausal gonadotropin in guinea pigs based on follicular waves and FSH-receptor homologies. *Mol. Reprod. Dev.* **64**: 219-25.
 - Taylor, P. (1986). Practical Teratology. Academic Press Inc, Florida. pp: 171.
 - Tilly JL, Kowalski KI, Schomberg DW y Hsue A. (1992). Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology*. **131**: 1670-1676.
 - Torchinsky A, Mizrahi L, Savion S, Shahar R, Toder V y Kobylansky E. (2011). Bone loss in adult offspring induced by low-dose exposure to teratogens. *Bone Miner Metab.* **30**: 270-80.
 - Tsafiriri A. (1997). Follicular development: impact on oocyte quality. En: Fauser BCJM (Ed.) FSH: action and intraovarian regulation. Parthenon. Nueva York, pp: 83-105.
 - Van Der I y D'hooghe T. (2001). Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development: *Hum. Reprod.* **16**: 1237-1243.
 - Van-Voorhis BJ. (1999). Follicular development. En: Encyclopedia of reproduction Vol 2, Knobil E y Neil JD Eds. Academic Press, USA. pp: 376-389.
 - Vincent JB. (2000). Elucidating a biological role for chromium at a molecular level. *Acc. Chem. Res.* **33**: 503-510.
 - Vincent JB. (2004). The biochemistry of chromium. *J. Nutr.* **130**: 715-718.
 - Walton EA, Evans G y Armstrong DT. (1983). Ovulation response and fertilization failure in immature rats induced to superovulate. *J. Reprod. Ferti.* **67**:91-96.
 - Wang ZQ, Zhang XH, Russell JC, Hulver M y Cefalu WT. (2006). Chromium picolinate enhances skeletal muscle cellular insulin signaling *in vivo* in obese, insulin-resistant JCR: LA-cp Rats 1. *J. Nutr.* **136**: 415-420.

- Yamamoto A, Wada O y Ono T. (1984). Distribution and chromium-binding capacity of a low-molecularweight, chromium-binding substance in mice. *J. Inorg. Biochem.* **22**: 91-102.
- Yamamoto A, Wada O y Susuki H. (1988). Purification and proprieties of biologically active chromium complex from bovine colostrum. *J. Nutrition* **118**: 39-45.
- Yen J y Adashi E. (2000). El ciclo ovárico. En: Endocrinología de la reproducción. Fisiología, Fisiopatología y manejo clínico. 4ª edición. SC Samuel, J Yen, RB Jaffe y RL Barbieri Eds. Editorial Médica Panamericana. México. pp: 164-202.
- Yen J y Adashi E. (2001). En: Endocrinología de la Reproducción. Fisiología, Fisiopatología y manejo clínico. 4ª edición. SC Samuel, J Yen, RB Jaffe y RL Barbieri Eds. Editorial Médica Panamericana. México pp: 600-633, 664-665.