



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

EFFECTOS DEL PICOLINATO DE CROMO
SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS Y LA
INTEGRIDAD CROMOSÓMICA DE LAS
CÉLULAS DE LA GRANULOSA
EN CULTIVO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

CLAUDIA CIPACTLI ORTEGA RODRÍGUEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR
DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

EFFECTOS DEL PICOLINATO DE CROMO
SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS Y LA
INTEGRIDAD CROMOSÓMICA DE LAS
CÉLULAS DE LA GRANULOSA
EN CULTIVO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

CLAUDIA CIPACTLI ORTEGA RODRÍGUEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR
DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

*Al CONACyT por el apoyo otorgado para la realización de ésta tesis (CVU: 262259).
Al PAEP por el apoyo para asistir al LXIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas.*

A los Miembros del Comité Tutor, por su colaboración y sus aportaciones durante el desarrollo de esta tesis:

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza

Agradecimientos

Dra. Paty Rosas: Gracias por todos los días de trabajo y de convivencia, por compartirme su conocimiento y sus consejos, por todo el apoyo que me ha brindado, porque además de una tutoría me ha dado su amistad.

A los Miembros del Jurado, por sus valiosos comentarios y sugerencias en la revisión de esta tesis:

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dra. Marta Catalina Romano Pardo

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza

A Lore Hinojosa por darme las bases para realizar cultivos de tejidos.

Al M. en C. Pedro Cuapio Padilla, por abrirme las puertas de FVJ, por ser mi maestro y amigo.

*Al Dr. Francisco Rocha por permitirme entrar al Laboratorio de Fertilización *in vitro* e instruirme en la recuperación de las células de la granulosa.*

A los embriólogos Ricardo Rodríguez y Abel Avilés, por su ayuda en todo momento de mi permanencia en el “FJV”.

Al Dr. Francisco Vázquez-Cuevas por su asesoría en el montaje de las técnicas de cultivo de las células de la granulosa.

A la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología en particular al Dr. Juan José Rodríguez Mercado por todas enseñanzas y las facilidades que me otorgó para la evaluación y el análisis del daño al ADN de las células de la granulosa.

Al Laboratorio de Hormonas Esteroides del Instituto Nacional de Nutrición “Salvador Zubirán” en especial al Biól. Roberto Chauira por su gran apoyo y colaboración en la cuantificación de hormonas esteroides.

Al Biól. Rafael Tenorio Barrientos por su colaboración en los cultivos y las intensas jornadas de trabajo.

A todos los que hicieron posible que lograra superar los “baches técnicos”.

A Dannie, por su amistad y por apoyarme con las imágenes (quedaron super!). A sus abuelitos por permitirme entrar a su familia.

A Todos mis compañeros y amigos de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, particularmente al “Laboratorio 7 P.B. de la UMJEZ” y de manera muy especial a: Andy, Adriana, Rafa, Natasha..

Mamita querida: Te agradezco infinitamente la educación que nos diste. Tu ejemplo me impulsa cada día a esforzarme por ser mejor persona. Eres lo máximo!!!

Papá: Gracias por ser mi amigo, por enseñarme que nunca debemos de dejar de prepararnos.

Hunyeli: Gracias por tus preguntas y tus excelentes comentarios sobre esta tesis, por tu apoyo en cada momento de mi vida, desde siempre.

Gracias por estar en mi vida: a mis pequeñitas Fer y Ari; a las chicas Lety, Sara, Rebeca, Marina y a mis hermanos Nayeli, Jessica, Viri. y Ave.

A mi Mami

Ami Papá

A Hunyeli

ÍNDICE	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN	5
MARCO TEÓRICO.....	7
I. Ovario. Estructura, funciones y regulación	7
II. Células de la granulosa.....	20
III. Cromo.....	21
IV. Ácido Picolinico.....	24
V. Picolinato de cromo.....	25
VI. Métodos de evaluación del daño al ADN	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
HIPÓTESIS	33
OBJETIVOS	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
RESULTADOS.....	42
• Determinación de la concentración letal media (CL ₅₀) de PicCr sobre la proliferación de las células de la granulosa de mujer	42
• Determinación de la concentración efectiva al 50% (CE ₅₀) de PicCr sobre la liberación de hormonas esteroides por las células de la granulosa de mujer mantenidas en cultivo	44
• Efectos de la administración de PicCr sobre la secreción de progesterona y estradiol inducida por FSH en las células de la granulosa en cultivo.....	48
• Efectos de la adición de AcPic o CrCl ₃ sobre la secreción de progesterona y estradiol estimulada por FSH en las células de la granulosa en cultivo.....	51
• Análisis del daño al ADN inducido por el PicCr en las células de la granulosa en cultivo, evaluado por electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa)	53
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES.....	63
PERSPECTIVAS.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	65

RESUMEN

El picolinato de cromo (PicCr) es un compuesto de venta libre en el mercado, que se comercializa ampliamente argumentando que favorece la quema de grasa corporal e incrementa la masa muscular, lo que lo ha popularizado como un excelente suplemento alimenticio, principalmente entre los jóvenes en edad reproductiva.

En algunos estudios clínicos se ha observado que el PicCr disminuye la concentración de colesterol en suero, aumenta la musculatura y prolonga la vida; en otros han descrito que no tiene efectos significativos sobre el crecimiento de la masa muscular y la utilización de nutrientes. Estudios realizados con diferentes modelos biológicos, describen al PicCr como agente clastogénico, mutagénico y citotóxico. La ingesta en el varón modifica la calidad espermática.

Con base en lo anterior en este estudio se analizaron los efectos del PicCr sobre la secreción *in vitro* de progesterona y estradiol por las células de la granulosa de ovarios de mujer y el posible daño al ADN.

Las células de la granulosa se obtuvieron por punción folicular de los ovarios de mujeres sanas que previamente recibieron un tratamiento gonadotrópico. Las células se preincubaron por 24 h, se cosecharon y contaron para sembrarlas en una densidad de 1×10^5 células vivas/ml. Para evaluar los efectos del PicCr sobre la proliferación celular y la secreción de progesterona y estradiol se consideró como grupo de comparación los cultivos adicionados con androstenediona disuelta en etanol más dimetilsulfóxido por ser el disolvente del PicCr.

Proliferación celular. El análisis de la proliferación de las células de la granulosa tratadas con PicCr por 24 h, mostró que concentraciones bajas y medias del suplemento incrementaron la proliferación celular, en tanto que concentraciones altas no la modificaron.

Secreción de progesterona y estradiol. La administración de PicCr, independientemente de la concentración, incrementó la secreción de progesterona por los cultivos de células de la

granulosa. Los cambios en la secreción de estradiol presentaron un comportamiento hormético. En los cultivos pretratados con FSH, la adición de PicCr aumentó la secreción de progesterona. El tratamiento con 30 ng/ml de PicCr incrementó la secreción de estradiol y la dosis de 300 ng/ml no la modificó. El análisis de los efectos de cada uno de los componentes del PicCr [ácido picolínico y cromo (cloruro)] en las concentraciones equivalentes a 30 y 300 ng/ml a células de la granulosa estimuladas con FSH, resultó en un aumento de la secreción de progesterona y de estradiol.

Daño al ADN evaluado por el ensayo cometa. La adición de 30 ó 300 ng/ml de PicCr por 1 h a los cultivos de células de la granulosa incrementó la longitud de los cometas, la proporción de células con daño y la migración del ADN.

Tomados en conjunto los resultados del presente estudio muestran que el PicCr a concentraciones bajas y medias, incrementa la proliferación de las células de la granulosa mantenidas en cultivo, aumenta la capacidad esteroideogénica espontánea y estimulada por FSH y compromete la integridad del ADN. Con lo cual podemos sugerir que altas concentraciones de progesterona y estradiol podrían inhibir la secreción pulsátil de GnRH, FSH y LH provocando efectos deletéreos en la ovulación.

ABSTRACT

Chromium picolinate (PicCr) is a widely marketed chemical compound which is offered as help to burn body fat and increase muscle mass. Often promoted like an excellent dietary supplement, it has gained popularity particularly among young people in reproductive age.

Some clinical studies have shown that PicCr decreases total serum cholesterol levels, increases muscle mass and extends life. Other reports found no significant effects on muscle growth and nutrient utilization. Studies with different biological models show PicCr like a clastogenic, mutagenic and cytotoxic agent, and decreases the quality of human sperm.

Based on the above information, the present study was conducted in order to analyze the effects of PicCr on *in vitro* secretion of progesterone and estradiol by human ovarian granulosa cells and DNA damage.

Granulosa cells were obtained by follicular puncture of the ovaries from healthy women who previously received gonadotropin treatment. The cells were preincubated for 24 h, harvested, counted and reseeded at a density of 1×10^5 living cells/ml. In order to assess the effects of PicCr on cell proliferation and secretion of progesterone and estradiol, cultures with androstenedione dissolved in ethanol and dimethylsulfoxide as the solvent of PicCr were taken as the group for comparison.

Cell proliferation. The analysis of granulosa cells proliferation treated for 24 h with PicCr showed that, low and medium concentrations of the supplement increased the cell proliferation, while high ones had no effect.

Secretion of progesterone and estradiol. The PicCr administration, regardless of its concentration, showed an increase on progesterone secretion by cultured granulosa cells. The estradiol secretion had a hormetic behavior. In cultures pretreated with FSH, the addition of PicCr increased progesterone secretion. Treatments with 30 ng/ml of PicCr increased

estradiol secretion while treatments with 300 ng/ml had no effects. The analysis of the effects of each component of the PicCr [picolinic acid and chromium (chloride)] at concentrations equivalent to 30 and 300 ng/ml on granulosa cells stimulated with FSH, resulted in an increased secretion of progesterone and estradiol.

Evaluation DNA damage by comet assay. The addition of 30 or 300 ng/ml PicCr for 1 h to granulosa cell cultures increased the length of the comets, the proportion of damaged cells and migration of DNA.

Taken together, the results of present study show that PicCr at low and medium concentrations increases the proliferation of human granulosa cells maintained in culture, augment the spontaneous and FSH-stimulated steroidogenic capacity and compromises the integrity of DNA, suggesting that the high levels of progesterone and estradiol could inhibit the GnRH, FSH and LH pulsatile secretion, having deleterious effects on ovulation.

INTRODUCCIÓN

La infertilidad es la incapacidad para tener un hijo después de 12 meses o más de relaciones sexuales sin el uso de anticonceptivos (Zegers-Hochschild y col., 2010). Afecta a hombres y mujeres en edad reproductiva en todas partes del mundo (OMS, 2002).

En algunos países la infertilidad es generalizada y prevalece llegando a una proporción que puede ser considerada como un problema de salud pública (OMS, 2002).

En la mayoría de los países entre el 8 y el 12% de las parejas experimentan alguna forma de infertilidad durante su vida reproductiva, lo que se traduce en alrededor de 80 millones de personas afectadas (OMS, 2002). En países desarrollados como los Estados Unidos de Norteamérica (EUA), la infertilidad afecta entre el 10 y 15% de las parejas en edad reproductiva (Udoff y Adashi, 1999).

La OMS (2002) clasifica a la infertilidad en:

1. Primaria, cuando la pareja mantiene relaciones sexuales por más de un año sin protección anticonceptiva y no se logra un embarazo.
2. Secundaria, cuando la mujer concibió previamente, pero es incapaz de embarazarse nuevamente, después de un año de relaciones sexuales.
3. Por pérdida del embarazo, cuando existe la capacidad de concebir, pero el producto no llega al nacimiento.

El análisis de las parejas infértiles muestra que el factor masculino explica el 40% de los casos, al igual que el femenino (40%), mientras que el 20% restante es una combinación de ambos factores o indeterminado (Udoff y Adashi, 1999). Las causas que explican la infertilidad incluyen alteraciones anatómicas, genéticas, endocrinológicas, inmunológicas o la exposición a tóxicos ambientales (OMS, 2002). Existen parejas infértiles cuya etiología no se explica por ninguna de las causas anteriores y que incluirían el consumo de productos benéficos para otras patologías.

Aproximadamente en el 40% de las mujeres infértiles, el motivo principal es la incapacidad del ovario para ovular. En otro 40% la causa es debida a daño tubárico u otras patologías, como la endometriosis. Las causas inusuales de infertilidad como las anormalidades uterinas o cervicales ocurren en un 10% y la infertilidad de origen inexplicable es de alrededor del 10% (Udoff y Adashi, 1999).

En la actualidad, aunado a estos factores de infertilidad, se suma el aumento considerable de mujeres que por continuar con su avance profesional, participar en diferentes actividades laborales o alcanzar un nivel socioeconómico estable, deciden quedar embarazadas por primera vez aproximadamente a los 35 años de edad, momento en el cual la fertilidad comienza a declinar (Brugo-Olmedo y col., 2003).

El desarrollo urbano también ha propiciado que tanto hombres como mujeres se encuentren más expuestos a contaminantes ambientales, así como el ritmo de vida actual que los somete a estrés y cambios en la alimentación, lo que ha acrecentado la ingesta de alimentos con conservadores y suplementos alimenticios.

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 una tendencia a utilizar productos que promueven la quema de grasa y el aumento de masa muscular como son la queratina, el óxido nítrico, la L-carnitina y el picolinato de cromo (PicCr), entre otras.

Uno de los suplementos alimenticios más populares y de libre acceso es el PicCr. Existen estudios que muestran que el PicCr ocasiona efectos deletéreos a nivel genético, por lo que se está analizando la posibilidad de regular su uso (Vincent, 2004).

Dada la potencial peligrosidad del PicCr a nivel celular, es importante estudiar los efectos que este suplemento pueda ocasionar sobre las células de la granulosa, ya que las funciones de este tipo celular se encuentran íntimamente relacionadas con el desarrollo folicular y por ende con la ovulación.

MARCO TEÓRICO

I. Ovario. Estructura, funciones y regulación neuroendócrina

En la mujer los ovarios son órganos pares que se encuentran alojados en la pelvis, fijos a la superficie posterior del ligamento ancho por medio de un pliegue peritoneal llamado mesovario. El aporte nervioso, vascular y linfático llega por medio de este ligamento, que en conjunto con otras estructuras fibromusculares, mantienen al ovario en posición a la entrada de las fimbrias de las trompas de Falopio y unido al útero (Fig. 1) (Tresguerres y Castillo, 2005; Silverthorn, 2007).

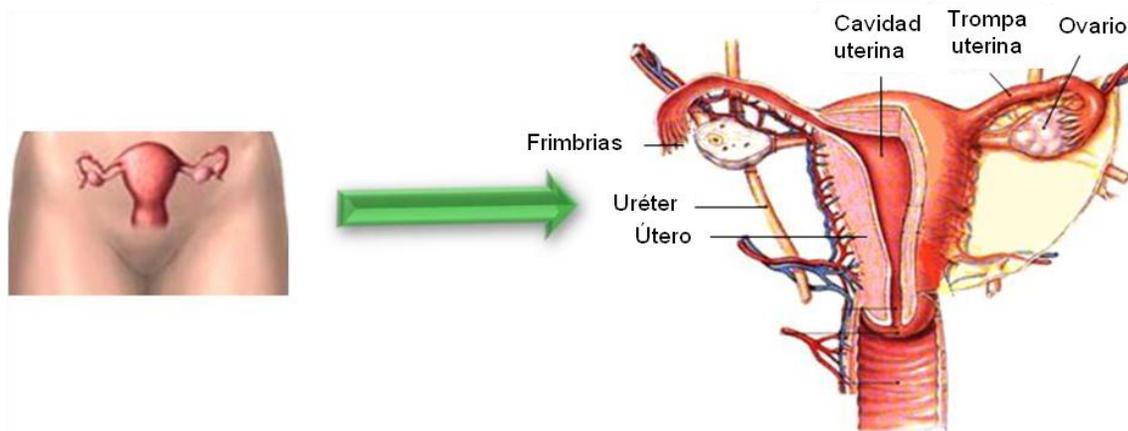


Fig. 1. Esquema que representa la localización de los ovarios en la mujer (Tomado y modificado de Silverthorn, 2007).

Durante la vida fetal, después del quinto mes de vida intrauterina, el ovario presenta tres regiones perfectamente estructuradas: médula, corteza e hilio; siendo este último el punto de anclaje del ovario con el mesovario (Tresguerres y Castillo, 2005). La zona más externa del ovario es la corteza donde se encuentran los folículos. La zona más interna es la médula formada por tejido conjuntivo con fibras elásticas, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervios y fibras musculares lisas. No hay una línea clara de división entre la corteza y la médula (Geneser, 2000).

El ovario realiza dos funciones, la producción de gametos y la síntesis de hormonas (Tresguerres y Castillo, 2005).

Ovogénesis

Alrededor de la tercera semana de gestación, cerca del extremo caudal del embrión, en la pared del saco vitelino aparecen las células progenitoras de los gametos o *células germinales primordiales* (CGP), las cuales migran pasivamente entre los tejidos embrionarios y posteriormente por movimientos ameboides y utilizando moléculas de reconocimiento llegan a la cresta genital donde son rodeadas por células mesenquimáticas y mesoteliales con las que se asocian estrechamente, formando el primordio gonadal (Merchant-Larios y Moreno-Mendoza, 2003; Morales y col., 2006).

Al llegar las CGP al primordio gonadal, las células mesenquimáticas y mesoteliales inician una gran actividad proliferativa, de manera que forman un agregado compacto denominado blastema gonadal. Posteriormente, se inicia el depósito de una delgada lámina basal entre las células del primordio gonadal, que gradualmente lleva a la formación de los *cordones sexuales*. Entre las células somáticas quedan atrapadas las CPG (Merchant-Larios y Moreno-Mendoza, 2003; Morales y col., 2006).

Cerca de la quinta semana de gestación las CGP entran en mitosis y dan lugar a las *ovogonias*, mismas que continúan dividiéndose por mitosis de tal forma que para el quinto y sexto mes de vida fetal los ovarios contienen alrededor de 6×10^6 ovogonias (Fig. 2) (Strömstedt y Byskov, 1999; Sadler, 2004; Parker y Schimmer, 2006).

Alrededor de la décimo sexta semana de gestación la tasa de división de las ovogonias declina. Hacia la mitad de la gestación y hasta justo después del nacimiento, las ovogonias que se encuentran agrupadas en los cordones sexuales, empiezan a ser separadas por las células epiteliales e inician la meiosis, misma que se interrumpe en la etapa de diploteno de la profase I. En este momento las ovogonias se transforman en *ovocitos primarios* (Fig. 2) y la estructura en conjunto se denomina *foliculo primordial* o de reserva. Los ovocitos que no son rodeados por las células epiteliales degeneran probablemente por apoptosis. Finalmente el número total de ovocitos primarios al nacimiento varía de 7×10^5 a 2×10^6 (Strömstedt y Byskov, 1999; Genesser, 2000; Sadler, 2004; Parker y Schimmer, 2006).

El ovocito primario permanece en reposo meiótico por el resto de la vida intrauterina, incluso años después del nacimiento. Su núcleo es pálido y el nucleólo prominente, existe una gran acumulación de mitocondrias próximas al núcleo, el aparato de Golgi está asociado a numerosas vesículas, el retículo endoplásmico está representado por estructuras vesiculares dispersas y la cantidad de ribosomas es baja (Geneser, 2000; Morales y col., 2006).

Poco antes de la ovulación, el ovocito primario reanuda la primera división meiótica dando como resultado una célula no funcional (primer cuerpo polar) y otra de mayor tamaño producto de la partición desigual del citoplasma llamada ovocito secundario, el cual entra en la segunda división meiótica sin que haya duplicación de los cromosomas. Cuando el ovocito secundario es ovulado, nuevamente se detiene la meiosis y sólo culminará formando un segundo cuerpo polar no funcional y un óvulo si éste es fecundado por un espermatozoide (Fig. 2) (Strömstedt y Byskov, 1999; Tresguerres y Castillo, 2005; Morales y col., 2006).

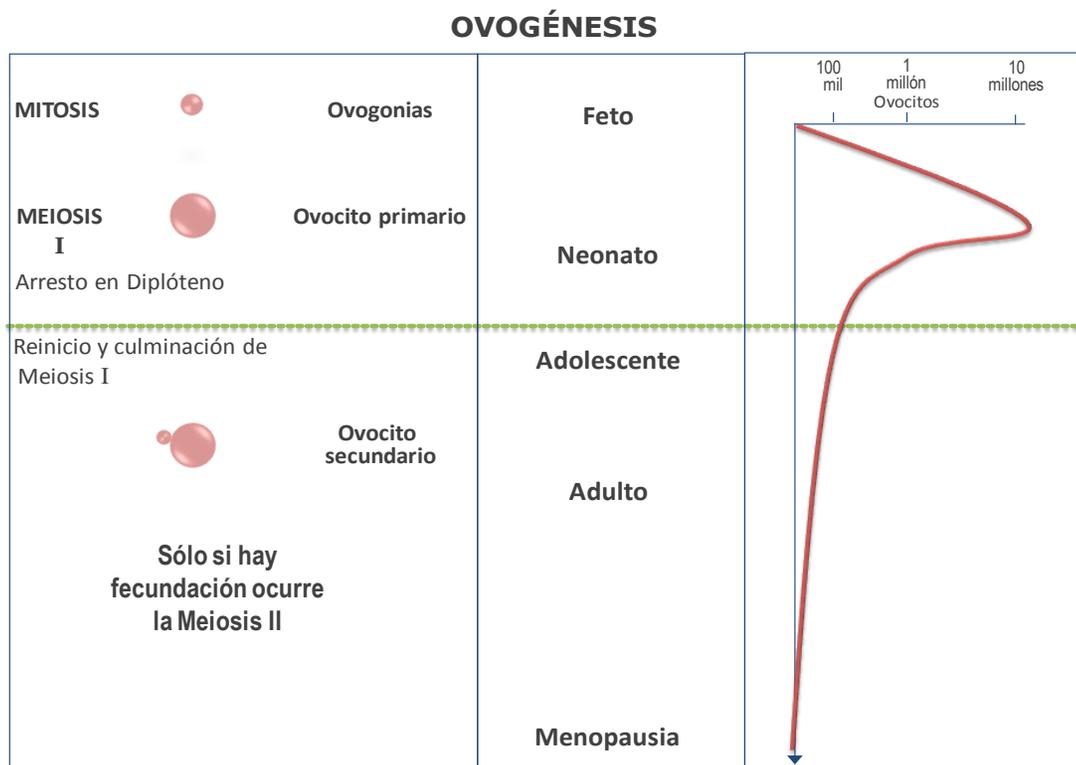


Fig. 2. Representación gráfica de las diferentes etapas de la ovogénesis y el número de ovocitos durante la vida de la mujer. (Tomado y modificado de Strömstedt y Byskov, 1999).

Foliculogénesis

El folículo es la unidad anatómica funcional del ovario a partir del cual se originan los tres compartimentos del órgano: folicular, luteal e intersticial (Dominguez y col., 1991).

La regulación y activación del inicio del crecimiento folicular es uno de los procesos menos comprendidos en la biología de la reproducción. El reclutamiento de la cohorte de folículos primordiales que van a iniciar su crecimiento se puede deber tanto a los factores intraováricos que estimulan a los folículos, así como a la liberación de factores inhibitorios que mantienen detenidos al resto de los folículos (McGee y Hsueh, 2000).

A medida que el ovocito primario comienza a incrementar su tamaño, las células foliculares que lo rodean cambian de la forma plana a cúbica (células de la granulosa) y forman un epitelio estratificado con gran capacidad de proliferación y síntesis hormonal. La lámina basal separa a la capa de células de la granulosa del estroma circundante que formará la teca folicular. La unidad ahora se denomina *folículo primario* (Fig. 3) (Sadler, 2004).

Conforme continúa el crecimiento del folículo, aumenta la proliferación de las células de la granulosa. Las células de la teca se diferencian en una capa de células secretoras, la teca interna, mientras que otras (fibroblastos) forman una capa de fibras colágenas y reticulares que forman la teca externa. La acumulación de los productos de secreción de las células de la granulosa forma el antro folicular (Dominguez y col., 1991). Gradualmente el ovocito adopta una posición excéntrica, rodeado por células de la granulosa que conforman el *cumulus oophorus*. En esta etapa el folículo es llamado *folículo secundario* (Fig. 3) (Sadler, 2004).

Cuando el folículo muestra un incremento de tamaño (entre 15 y 20 mm) en los días previos a la ovulación, se denomina *folículo maduro o de Graaf* y forma una elevación en la superficie del ovario. Al mismo tiempo se liberan las células de la parte basal del *cumulus oophorus* y poco antes de la ovulación el ovocito flota libremente en el líquido folicular, rodeado por la zona pelúcida y la nube de células de la granulosa por lo que a esta estructura se le denomina corona radiada (Fig. 3) (Geneser, 2000).

El crecimiento de los folículos puede ser influenciado por una gran cantidad de factores autócrinos y parácrinos, sintetizados en el propio ovocito o en el folículo (McGee y Hsueh, 2000; Rajkovic y col., 2006):

- ⊕ El crecimiento de los folículos primarios se bloquea en ausencia del factor de diferenciación 9 (GDF9) y de la proteína morfogenética del hueso 15 (BMP15).
- ⊕ Durante la transformación a folículo secundario las uniones gap entre el ovocito y las células de la granulosa son esenciales, ya que cuando la conexina 37 está ausente el crecimiento del folículo no progresa normalmente.
- ⊕ Poco antes de la ovulación, la leptina y su receptor se expresan en las células endoteliales del ovario y promueven la angiogénesis. Sin embargo, sus funciones específicas son desconocidas.
- ⊕ El ovario del ratón carente del gen del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1 (IGF-1), no presenta folículos secundarios debido a la disminución en el número de receptores a la hormona estimulante del folículo (FSH) y la expresión de la enzima P₄₅₀aromatasa.
- ⊕ El ratón carente del gen de la proteína folistatina, tiene pocos folículos, fallas en la ovulación, fertilización e incremento de las concentraciones en suero de FSH y la hormona luteinizante (LH).

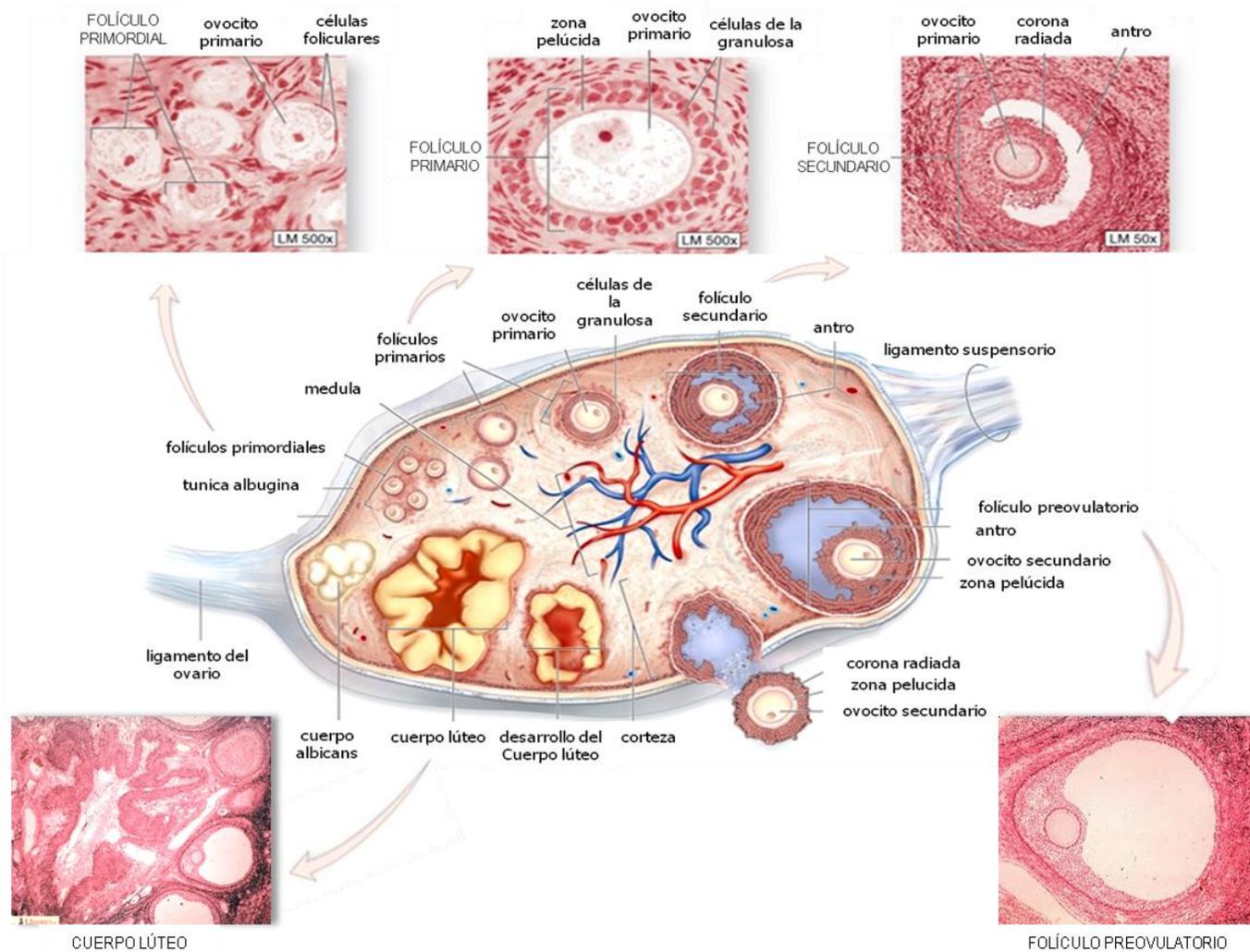


Fig. 3. Esquema que muestra el cuerpo lúteo y los diferentes tipos de folículos durante el proceso de crecimiento folicular del ovario; primordial, primario, secundario y preovulatorio (Tomado y modificado de: http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201_McKinley/f28-4a_ovary_c.jpg).

Una mujer joven tiene aproximadamente 400 mil folículos entre primordiales y primarios, de los cuales menos de 500 llegan a ser ovulados durante la vida reproductiva. Aún se desconocen los factores que determinan cual folículo va a iniciar el crecimiento (Geneser, 2000).

En el ovario ocurre un fenómeno denominado atresia folicular que es el proceso normal por el cual se eliminan del ovario todos aquellos folículos que, habiendo iniciado su crecimiento y diferenciación no llegan a ovular. La atresia se presenta desde la etapa fetal hasta la vida adulta y ocurre en cualquier estadio del desarrollo folicular (Dominguez y col., 1991; Greenwald y Roy, 1994). Las células de la teca interna de los folículos atrésicos, que tienen receptores a LH, dan origen a células de la glándula intersticial (Hafez, 1989; Domínguez, 1997).

Aunque las células de la teca están localizadas en el estroma interfolicular, se encuentran íntimamente asociadas a la lámina basal de los folículos ováricos y son un elemento importante para el desarrollo de los folículos (Magoffin, 2005).

Las células intersticiales de la teca son la unidad productora de progesterona y andrógenos. Se desarrollan continuamente a lo largo de la vida reproductiva a partir de una población idéntica de células mesenquimáticas no especializadas del estroma (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Yen y Adashi, 2001). El origen de las células que conforman el compartimento intersticial de la teca es heterogéneo. Se han identificado cuatro clases de células intersticiales (Yen y Adashi, 2001):

- ⊕ *Células intersticiales primarias.* Constituyen una población transitoria de células productoras de andrógenos localizadas en el compartimento medular, desaparecen a las 20 semanas de gestación.
- ⊕ *Teco-intersticiales.* Representan una característica constante en todos los folículos en desarrollo. Son el componente principal que produce andrógenos relacionado con el mantenimiento y la atresia del folículo.

- ⊕ *Células intersticiales secundarias.* Las células de este tipo provienen de la teca hipertrofiada remanente que sobrevive a la atresia folicular. Son el blanco de la inervación noradrenérgica.

- ⊕ *Células intersticiales hiliares.* Se encuentran en el hilio ovárico. Son células grandes similares a las luteales que sintetizan andrógenos.

Las células teco-intersticiales forman una capa alargada muy vascularizada, adyacente a la lámina basal que se conoce como teca interna. La teca externa es una capa de células no esteroidogénica, organizada libremente que se encuentra entre la teca interna y el estroma adyacente (Magoffin, 2005).

Cuerpo Lúteo

Después de la ovulación, el folículo se transforma en cuerpo lúteo. Las células de la granulosa crecen de tamaño y se multiplican y las de la teca interna penetran a la cavidad virtual que se genera a la expulsión del ovocito, se multiplican dentro del cuerpo lúteo adquieren la capacidad de aromatizar andrógenos. Las células se denominan células luteínicas de la granulosa y células luteínicas de la teca. En estas células la producción de hormonas esteroides es estimulada por la LH y su principal producto de secreción es la progesterona (Fig. 3) (Hafez, 1989; Domínguez, 1997; Geneser, 2000).

Si el ovocito no es fecundado, el cuerpo lúteo alcanza su máximo tamaño y actividad secretora unos nueve días después de la ovulación y luego comienza su regresión. Desde el punto de vista histológico se observa que las células luteínicas se llenan de lípidos y cuando comienza su regresión queda reducido a una cicatriz blanquecina llamada *cuerpo albicans* (Fig. 3) (Geneser, 2000; Tresguerres y Castillo, 2005).

Esteroidogénesis

El ovario sintetiza esteroides a partir del colesterol que obtiene de las lipoproteínas de baja (LDL) o alta (HDL) densidad del plasma sanguíneo o el que sintetiza *de novo* a partir de acetato. El colesterol es almacenado en unidades de membrana localizadas en el citoplasma de las células esteroidogénicas, en forma de ésteres (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Hinshelwood, 1999). Los tipos celulares involucrados en la esteroidogénesis folicular son las células de la teca y de la granulosa (Fig. 4) (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

Las células de la teca presentan receptores a LH y las de la granulosa a FSH y posteriormente a LH. Ambos tipos de receptores están acoplados a proteínas G. La unión de la LH a su receptor estimula al adenilato ciclasa que cataliza la síntesis de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) a partir de trifosfato de adenosina (ATP), lo cual activa a la proteína cinasa A, que a su vez estimula la expresión de las 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 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 (Fig. 4) (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Strauss y Williams, 2009).

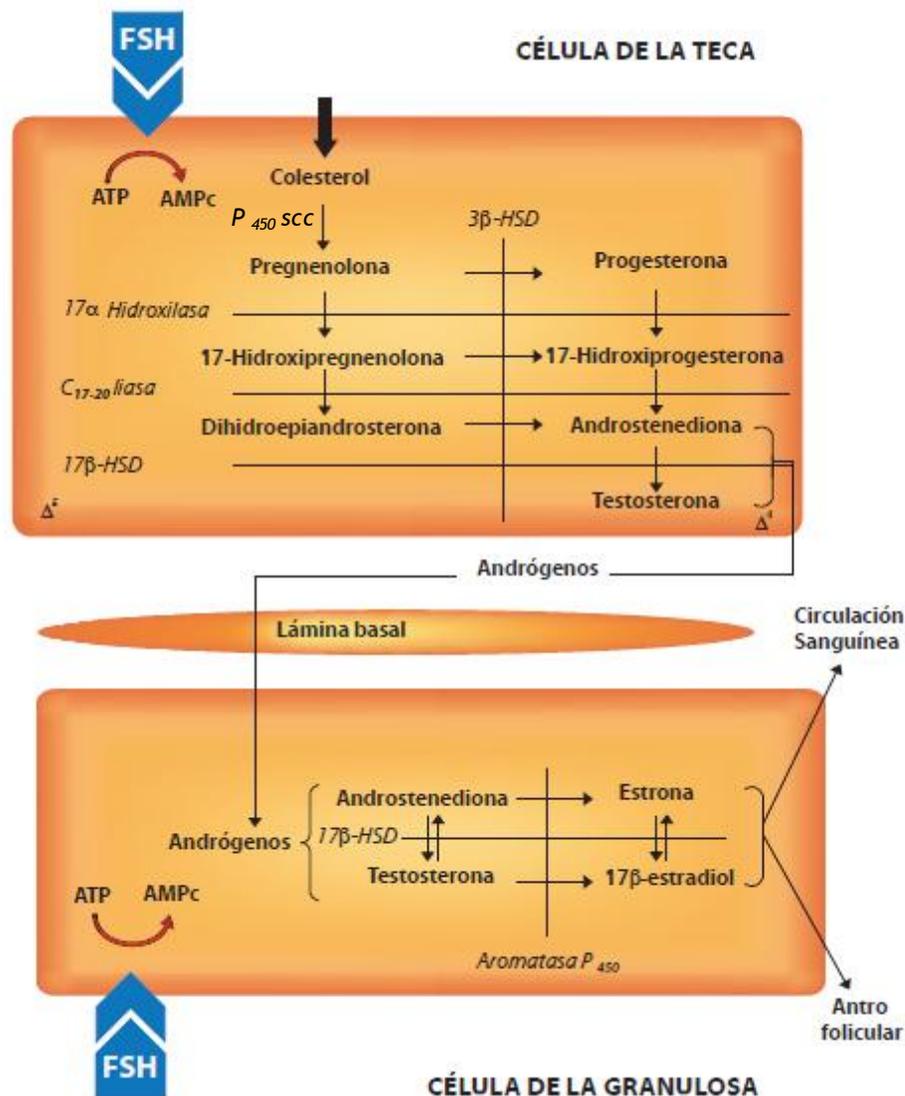


Fig. 4. Biosíntesis de hormonas esteroides en el ovario (Tomado y modificado de Gore-Langton y Armstrong, 1994). P_{450} que escinde la cadena lateral del colesterol ($P_{450}SCC$), 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD), 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD).

El primer paso en esta biosíntesis es la conversión de colesterol a pregnenolona por la activación de la enzima citocromo P_{450} que escinde la cadena lateral del colesterol ($P_{450}SCC$). La pregnenolona es el intermediario común en la producción de las hormonas esteroides. A partir de este paso la esteroidogénesis puede seguir dos esquemas biosintéticos la vía Δ^5 y la Δ^4 (Fig. 4) (Felig y col., 1981; Domínguez y col., 1991; Gore-Langton y Armstrong, 1994).

En la vía Δ^5 la pregnenolona es modificada por la enzima 17α -hidroxilasa y transformada a 17 -hidroxipregnenolona. Ésta por acción de la enzima $17-20$ desmolasa se convierte en dihidroepiandrosterona (DHEA) que a su vez es transformada en androstenediona por acción de las enzimas 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) y Δ^{4-5} isomerasa (Fig. 4) (Felig y col., 1981; Gore-Langton y Armstrong, 1994; Yen y Adashi, 2001).

En la ruta Δ^4 la pregnenolona se convierte en progesterona mediante las enzimas 3β -HSD y Δ^{4-5} isomerasa. La progesterona por la acción de la 17α -hidroxilasa es transformada en 17 -hidroxiprogesterona que a su vez es convertida en androstenediona por la $17-20$ desmolasa (C_{17-20} liasa). La androstenediona es transformada en testosterona por la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD) (Fig. 4) (Felig y col., 1981; Gore-Langton y Armstrong, 1994; Yen y Adashi, 2001).

Los andrógenos producidos en la teca interna de los folículos secundarios, pasan por difusión simple a las células de la granulosa donde la unión de la FSH a su receptor activa al complejo enzimático P_{450} aromatasa. La aromatasa transforma el anillo A de la testosterona o la androstenediona en un anillo fenólico, elimina el CH_3 de la posición 19. La testosterona da origen al estradiol y la androstenediona a la estrona. La estrona y el estradiol son convertibles entre sí por efectos de la 17β -HSD (Fig. 4) (Felig y col., 1981; Gore-Langton y Armstrong, 1994; Yen y Adashi, 2001; Tresguerres y Castillo, 2005).

Además de las gonadotropinas, la biosíntesis de esteroides también es regulada por otros factores (Domínguez y col., 1991; Gore-Langton y Armstrong, 1994; Dissen y Ojeda, 1999):

- ⊕ La prolactina (PRL) inhibe la síntesis de estradiol, porque disminuye la actividad de la aromatasa en las células de la granulosa y la síntesis de andrógenos en la teca.
- ⊕ Los péptidos similares a la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH-like) inhiben la síntesis de progesterona en las células de la granulosa. Estos efectos dependen de la duración de la exposición y del estado de maduración folicular.
- ⊕ El cortisol inhibe la actividad de la aromatasa en las células de la granulosa e incrementa la producción de progesterona.

- ⊕ La hormona del crecimiento incrementa la producción de progesterona en células de la granulosa.
- ⊕ Las catecolaminas, por medio de la activación de los receptores β_2 -adrenérgicos, incrementan la liberación de progesterona por las células de la granulosa y luteales y la de andrógenos por las células de la teca.
- ⊕ La oxitocina inhibe la actividad de la 17α -hidroxilasa y la $20\text{-}22$ desmolasa, lo que resulta en la disminución de la secreción de testosterona.
- ⊕ El factor de crecimiento epidermal bloquea los efectos de la FSH sobre la aromatasa y la síntesis de receptores a LH en las células de la granulosa.
- ⊕ La vasopresina y la arginina-vasopresina también inhiben la secreción de estrógenos por un mecanismo semejante al de la oxitocina.
- ⊕ La síntesis de estrógenos es regulada de manera estimulante por la noradrenalina. Estos efectos son indirectos, requieren de la interacción con FSH o LH.
- ⊕ La síntesis de progesterona *in vitro* por las células de la granulosa requiere de calcio y calmodulina.
- ⊕ El péptido intestinal vasoactivo incrementa la enzima limitante en la biosíntesis de esteroides y estimula la actividad de la aromatasa.

Regulación neuroendócrina del ovario

Las funciones ováricas dependen de una compleja sucesión de fenómenos neuroendócrinos en los que participan el hipotálamo, la hipófisis y el propio ovario. En el área preóptica y el núcleo hipotalámico anterior se encuentra la mayoría de los somas de las neuronas que secretan a la GnRH, misma que al ser liberada hacia la hipófisis induce la síntesis y liberación

de la FSH y de la LH (Fig. 5) (Charli y col., 1991; Fawcett, 1995; Audesirk y Audesirk, 1997; Guyton y Hall, 1998).

En el ovario la FSH estimula el crecimiento y la maduración de los folículos. Conforme el folículo crece, secreta cantidades cada vez mayores de estrógenos. Los estrógenos ejercen sus efectos a diferentes niveles. En el eje hipotálamo-hipofisario, las concentraciones elevadas de estrógeno a mitad del ciclo ovárico, estimulan la síntesis y liberación de FSH y LH mediante un efecto de retroalimentación estimulante. En el ovario, promueve el desarrollo continuo del propio folículo y del ovocito primario que contiene (Fawcett, 1995; Audesirk y Audesirk, 1997; Guyton y Hall, 1998) (Figs. 5 y 6).

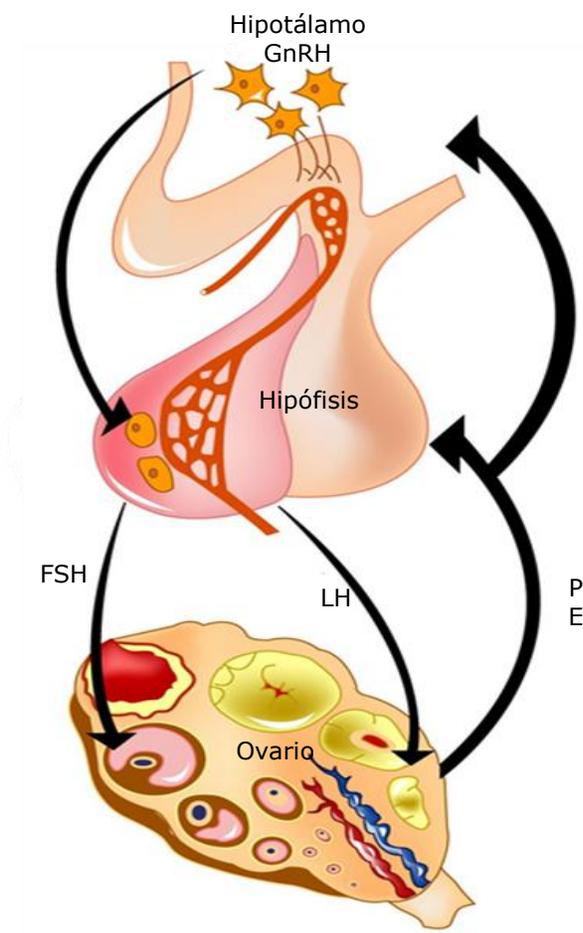
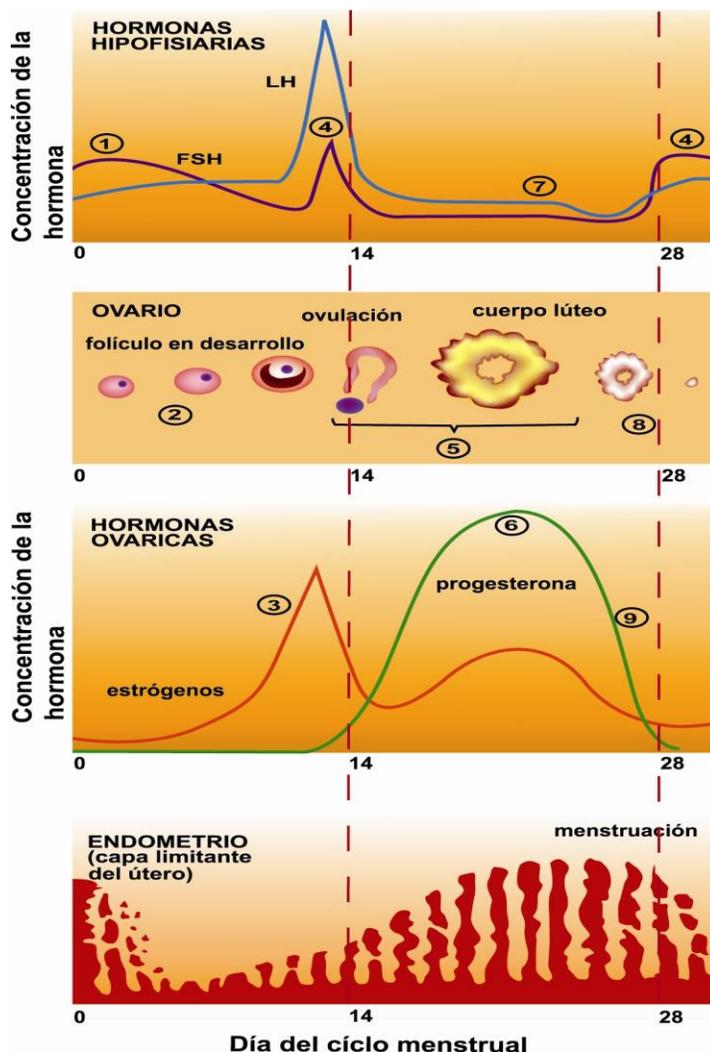


Fig. 5. Regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Tomado y modificado de Audesirk y Audesirk, 1997). Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), progesterona (P₄), estradiol (E₂).

El incremento brusco en la secreción de la LH induce la ovulación y 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 y la progesterona estimulan el crecimiento posterior del endometrio (Audesirk y Audesirk, 1997; Fawcett, 1995; Guyton y Hall, 1998) (Figs. 5 y 6).



1. FSH y LH inician el desarrollo de los folículos.
2. Folículos en desarrollo
3. El folículo secreta concentraciones altas de estrógenos.
4. Los estrógenos estimulan tanto al hipotálamo como a la hipófisis lo que ocasiona una elevación brusca en la liberación de FSH y LH.
5. Ocorre la ovulación.
6. El cuerpo lúteo secreta estrógenos y progesterona.
7. Inhibición de la liberación de las gonadotropinas.
8. El cuerpo lúteo se reabsorbe.
9. Las concentraciones de estrógenos y progesterona decaen.

Fig. 6. Control hormonal del crecimiento folicular y la ovulación durante el ciclo menstrual (Tomado y modificado de Audesirk y Audesirk, 1997).

El ovario está inervado por nervios autónomos compuestos por fibras simpáticas y parasimpáticas que alcanzan los componentes estructurales de la glándula incluyendo los vasos sanguíneos, el tejido intersticial y a los folículos en desarrollo (Dissen y Ojeda, 1999). Estas fibras nerviosas participan en el control y la regulación de las funciones del ovario por medio de los neurotransmisores y neuropéptidos que liberan y actúan sobre sus receptores localizados en células secretoras (Gerendai y col., 2002).

II. Células de la granulosa

Para explicar el origen de las células de la granulosa hay dos hipótesis. Según Byskov (1978), las células foliculares o pregranulosas se originan a partir del mesonefros y de las células del epitelio celómico. Estas células se organizan alrededor de los ovocitos primarios y más tarde se diferencian en las células de la granulosa. Según Merchant-Larios y Chimal-Monroy (1989) las células foliculares se derivan de células que forman los cordones epiteliales. Los ovocitos gradualmente son separados por el crecimiento del citoplasma de las células del cordón epitelial.

Las células de la granulosa desempeñan un papel fundamental en la regulación del crecimiento del ovocito y la maduración del folículo. Durante el desarrollo folicular se establece un sistema de comunicación intracelular o uniones Gap, que permite que las células de la granulosa puedan funcionar como un extenso sincitio (Wong y Adashi, 1998; Goldberg y col., 2002; Sasseville y col., 2009).

Las uniones Gap están compuestas por proteínas llamadas conexinas. En las células de la granulosa predominan las conexinas 37 y 43. Estas uniones permiten el paso de iones (calcio, sodio, potasio), metabolitos (piruvato, inositol), aminoácidos (L-Alanina) y moléculas de señalización intracelular (ATP, AMPc) (Goldberg y col., 2002; Sasseville y col., 2009).

La diferenciación de las células de la granulosa comienza cuando el folículo primordial es reclutado para iniciar su crecimiento. Las células epiteliales aplanadas asumen una forma cuboidal presumiblemente por la activación del gen FOXL2 (Schmidt y col., 2004). En la etapa

de folículo primario (cuando el ovocito cesó su crecimiento), las células de la granulosa adquieren receptores a FSH y entran en mitosis constante. A partir del folículo secundario, los cambios que ocurren en las células de la granulosa para realizar la síntesis de esteroides son completamente dependientes de la FSH (Wong y Adashi, 1998).

La FSH regula la expresión de sus propios receptores y el estradiol incrementa su número, aumentando así la biosíntesis de estradiol que se traduce en una actividad mitogénica adicional. La acción sinérgica entre la FSH y el estradiol también induce la aparición de receptores a la LH (Wong y Adashi, 1998; Tresguerres y Castillo, 2005).

La población de células de la granulosa es heterogénea y no todas cumplen las mismas funciones. Se pueden distinguir por lo menos tres poblaciones: la mural, la antral y la del *cumulus oophorus*. Las células de la granulosa murales tienen contacto con la lámina basal y poseen gran número de receptores a la LH; son más activas en la producción de hormonas esteroides y sus concentraciones de 3β -HSD, Δ^5 isomerasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y citocromo P₄₅₀ son mayores, características que las diferencian de las otras dos poblaciones celulares (Domínguez y col., 1991; Yen y Adashi, 2001). En las células antrales (cerca de la cavidad antral) los receptores a PRL son más abundantes y poseen diferente capacidad de respuesta a la FSH y a la GnRH-like (Domínguez y col., 1991). Las células del *cumulus* modulan el aporte nutricional del ovocito y carecen de la citocromo P₄₅₀, por lo que se sugiere que no hay actividad de la aromatasa (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Yen y Adashi, 2001).

III. Cromo

El cromo (Cr) es un elemento mineral esencial para las funciones biológicas y su forma más estable es el Cr trivalente (III) (Gómez y Magaña, 2003). La ingesta estimada de este micronutriente en la dieta es de 25 a 35 $\mu\text{g}/\text{día}$ para los adultos (Food and Nutrition Board, 2002). Su contenido en los alimentos es muy variable como se muestra en la tabla 1 (Gómez y Magaña, 2003; Havel, 2004).

Tabla 1. Contenido de cromo en algunos alimentos. (Tomado de Gómez y Magaña, 2003 Havel, 2004).

Alimento	Porción	Cromo por porción (µg)
Hojuelas de maíz	1 taza	2.6
Arroz	1/2 taza	0.6
Pan Integral	1 rebanada	0.8-1.0
Harina	1/3 taza	0.3-0.4
Carne de res	100 g	2
Carne de pavo	100 g	0.9-1.7
Carne de pescado	100 g	0.6-0.9
Carne de pollo	100 g	0.5
Huevo	1	Menor a 0.5
Leche	1 taza	Menor a 0.5
Manzana (no pelada)	1 mediana	1.4 (7.5)
Plátano	1 mediano	1.0
Naranja	1 mediano	0.5
Brócoli	1/2 taza	0.9-11.0
Jitomate	1 mediano	0.9
Té o café	1/2 taza	4.0
Vino tinto	100 ml	0.6-8.5

El Cr es un elemento traza con propiedades funcionales en el metabolismo de los carbohidratos y lípidos. La deficiencia de este micronutriente se ha asociado a numerosos desórdenes, como diabetes tipo 2, incremento en la concentración de insulina y disminución en el número de receptores a insulina (Lamson y Plaza, 2002).

Los mecanismos de absorción y transporte de los iones Cr no han sido completamente dilucidados. Se propone que el movimiento del Cr de la sangre al interior de la célula se lleva a cabo por intermedio de una proteína llamada transferrina; cuando su contenido en plasma se incrementa, la insulina estimula el movimiento de las vesículas que contienen al receptor de transferrina hacia la membrana plasmática. Estando los receptores de transferrina en la superficie celular puede unirse el Cr y entonces entra a la célula por endocitosis (Vincent, 2000; Feng, 2007).

Aunque aún no es claro el mecanismo de acción del Cr, diversos estudios muestran que amplifica la señal de la insulina, potenciando sus efectos (Govindaraju y col., 1989; Striffer y col., 1993; Havel, 2004).

En la década de los 80s, Yamamoto y colaboradores (1988) separaron y caracterizaron una proteína de bajo peso molecular llamada cromodulina, compuesta por cuatro aminoácidos (Gly-Cis-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(III). La acción primaria de la cromodulina es amplificar la señal de la insulina. Cuando la insulina se une a su receptor, la cromodulina se une al receptor activado en la parte interna de la membrana celular e incrementa la actividad de las proteínas cinasas, lo que aumenta ocho veces la captura de la glucosa y el metabolismo de los lípidos (Vincent, 2000; Lamson y Plaza, 2002). Cuando disminuye la concentración de insulina en sangre y cesa la actividad de su receptor, la cromodulina es expulsada de las células a la sangre y eliminada por la orina (Vincent, 2000; Feng, 2007).

Las manifestaciones de la deficiencia de Cr son muy raras, aunque se han registrado concentraciones altas de glucosa en la sangre de individuos que recibieron alimentación intravenosa prolongada carente de Cr (Melvin, 2002). La deficiencia de este micronutriente también se ha relacionado con una alta concentración de insulina en sangre, un incremento en la concentración de colesterol e incluso la formación de placas aórticas. La adición de Cr en la alimentación puede prevenir la hipertensión al reducir la concentración de colesterol de baja densidad (LDL), incrementar el colesterol de alta densidad en sangre e incluso revertir la arteroesclerosis (Zafra-Stone y col., 2006).

El Cr trivalente se ha asociado con el tratamiento de diabetes tipo 1 y 2 y resistencia a la insulina gestacional e inducida por esteroides. En estudios clínicos se observa que reduce la concentración de lipoproteínas de baja densidad y de triglicéridos (Lamson y Plaza, 2002).

IV. Ácido picolínico

El ácido picolínico (AcPic) es un isómero del ácido nicotínico (Evans y Johnson, 1980). Existen diferentes sinónimos para este compuesto tales como piridina-2-carboxílico, 2-ácido piridina carboxílico, o-ácido piridina carboxílico y alpha-ácido piridincarboxílico (Grant y col., 2009).

La característica física del AcPic más ampliamente estudiada, es como un agente quelante de metales pesados como el Zn^{2+} y el Fe^{2+} (Evans y Johnson, 1980). El AcPic se ha detectado en una gran variedad de fluidos biológicos incluyendo el líquido cefaloraquídeo, el plasma, la leche materna, el jugo pancreático y el homogenado intestinal (Evans y Johnson, 1980; Grant y col., 2009).

En la tabla 2 se muestran las concentraciones endógenas de AcPic en el humano (Grant y col., 2009):

Tabla 2. Concentración endógena de Ácido picolínico (AcPic).

Localización de AcPic	Concentración de AcPic (μM)
Plasma	0.299 ± 0.034
Cerebro	0.100 - 0.150
Fluido cerebro espinal	0.017 ± 0.005

El AcPic estimula la función inmunológica. Tiene actividad antimicrobiana por sus efectos quelantes de Zn^{2+} y Fe^{2+} ; actividad antiviral por su acción citotóxica que incrementa la apoptosis de las células infectadas; inhibe la expresión de retrovirus, aunque no se conoce el mecanismo de acción (Grant y col., 2009). Junto con el $INF\gamma$ potencia la función de los macrófagos ya que estimula la producción de ácido nítrico (Merillo y col., 1993).

El AcPic es un catabolito natural del L-triptofano generado a través de la vía kinurenina o kinuramina. La activación de esta vía ocurre en todos los tipos celulares del tejido nervioso (Ruddick y col., 2006; Grant y col., 2009).

Estudios en células normales de riñón en cultivo, muestran que el AcPic a concentraciones suprafisiológicas (2.5 y 3 mM) inhibe la proliferación celular y altera el patrón de distribución de microfilamentos del citoesqueleto (Fernandez-Pol, 1977 y 1978).

En macrófagos de peritoneo de ratón, el AcPic (4 mM) inhibe la maduración del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) e induce la acumulación de su precursor en el interior de la célula. En este mismo tipo celular actúa como un coestimulador capaz de inducir actividad tumoral (Varesio y col., 1990). En contraste el tratamiento con AcPic (5 mM) por 24 h induce apoptosis en células tumorales HL-60, efectos que no se observan cuando se utilizan concentraciones bajas (0.1 ó 0.5 mM) (Ogata y col., 2001).

V. Picolinato de cromo

Los suplementos de Cr se encuentran generalmente disponibles en el mercado en forma de sales como el picolinato de cromo (PicCr), cloruro de cromo o formando complejos con ácido nicotínico y aminoácidos. Algunos estudios han mostrado que los suplementos a base de cromo incrementan la acción metabólica de la insulina y disminuyen los factores de riesgo cardiovascular. El PicCr es la sal que da mayor biodisponibilidad del Cr (Havel, 2004).

El PicCr está formado por tres moléculas de ácido picolínico que se disponen alrededor de un átomo de Cr(III) (Fig. 7) (Berner y col., 2003). En la rata macho adulta, la concentración de Cr en plasma disminuye rápidamente durante los primeros 30 min, siguientes a la inyección de PicCr. Un tercio de la concentración de Cr disminuye por su excreción en la orina y el resto parece entrar a la célula de modo rápido (Hepburn y Vincent 2003a).

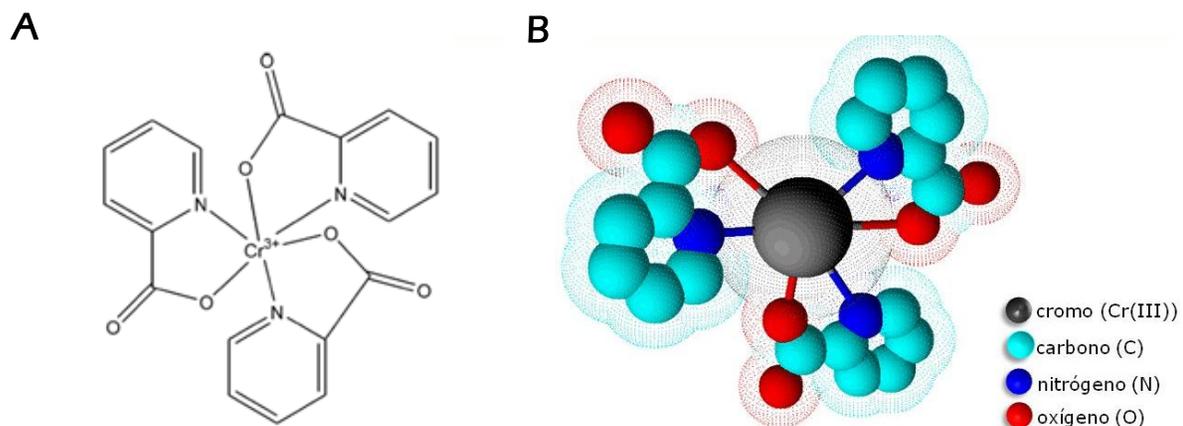


Fig. 7. Estructura química (A) y configuración tridimensional (B) de la molécula de PicCr (Tomado y modificado de Berner y col., 2003).

El PicCr se absorbe en el yeyuno y probablemente se incorpora íntegro a las células. Es muy estable ya que permanece intacto por algunas horas en jugo gástrico sintético (Gammelgaard y col., 1999).

Existe gran controversia sobre los efectos del PicCr. Al igual que lo descrito para el Cr(III), el PicCr disminuye la concentración de colesterol en el plasma, aumenta la musculatura, reduce la grasa corporal y prolonga la vida (Anderson y col., 1997). Otros autores consideran que el PicCr no tiene efectos significativos sobre el crecimiento de la masa muscular y la utilización de nutrientes. Incluso mencionan que puede afectar el funcionamiento renal (Bernao y col., 2004; González y col., 2006).

En cultivos de células de ovario de hámster chino (CHO), el PicCr tiene un efecto clastógeno (rompimientos de los cromosomas) sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN) (Stearns y col. 1995b). 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 los trioles (Speetjens y col., 1999). El complejo resultante puede interactuar con oxígeno catalítico generando especies reactivas de oxígeno (ERO) (Vincent, 2000), mismas que pueden romper la molécula de ADN y conducir a rupturas en los cromosomas (Speetjens y col., 1999; Vincent, 2000).

En estudios de genotoxicidad utilizando como modelo biológico a la *Drosophila melanogaster*, se observó 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 de la eclosión e incrementa la tasa de mutaciones letales y de hembras estériles (Hepburn y col. 2003c). En la rata, el tratamiento con PicCr administrado vía intravenosa durante 60 días, provoca en la orina un incremento en la concentración de 8-hidroxidesoxiguanosina, un marcador de la oxidación y el daño al ADN (Hepburn y col., 2003b).

La ingesta diaria de 200 µg de PicCr por 21 días a varones adultos jóvenes en edad reproductiva, reduce la movilidad y vitalidad espermática y aumenta el número de alteraciones en la morfología de los espermatozoides (Cuapio y col., 2009).

En linfocitos de humano en cultivo el PicCr disminuye la viabilidad celular y la síntesis de ADN e incrementa el daño oxidativo y la fragmentación del ADN. Cuando se administra a concentraciones entre 5 y 150 µM los efectos son atribuidos al centro crómico de la molécula y no a su asociación con el AcPic. Sin embargo, a concentraciones mayores el daño es causado por ambos compuestos (Jana y col., 2009).

Debido a los efectos deletéreos descritos para el PicCr y dada la popularidad de este suplemento, en marzo del 2003 el Grupo de Expertos sobre Vitaminas y Minerales, Normas Alimenticias y el Grupo de Seguridad del Reino Unido pidió a la industria retirar voluntariamente los suplementos que contienen PicCr, mientras analizan la prohibición del uso y venta del PicCr. Actualmente en EUA, la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) en colaboración con la Academia Nacional de Ciencias estudian la posibilidad de regular el uso del PicCr (Vincent, 2004).

Levina y Lay (2008) propusieron un modelo de transformación del PicCr en condiciones que se pueden presentar *in vivo*, como la exposición del suplemento a aminoácidos y proteínas y que llevan a la formación de complejos moleculares altamente reactivos que producen daño oxidativo en el ADN (Fig. 8).

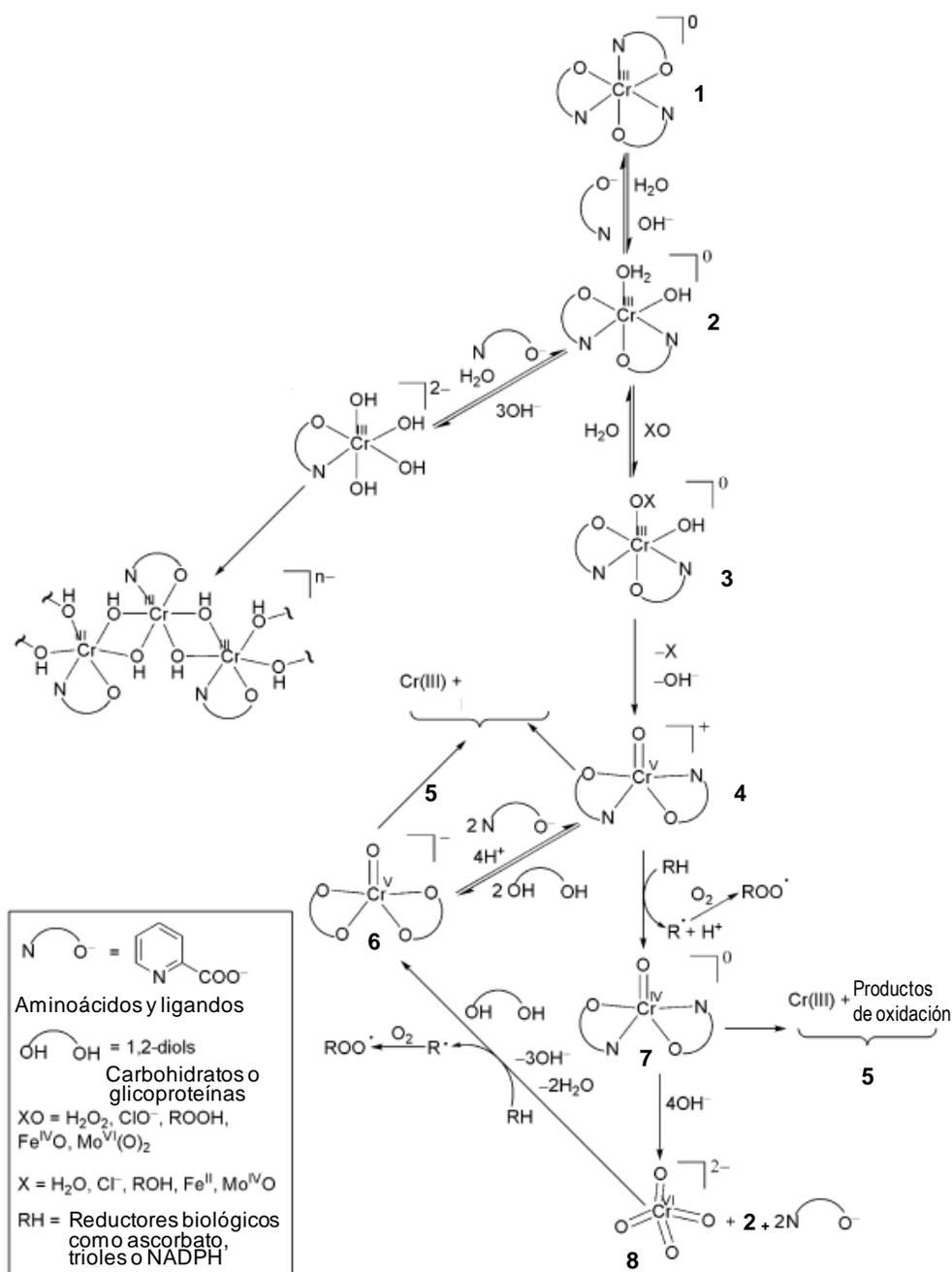


Fig. 8. Esquema que representa la ruta de reacciones del PicCr bajo condiciones fisiológicas específicas de temperatura (37°C) y pH (7.4) (Tomado de Levina y Lay, 2008).

Algunas reacciones de intercambio de ligando con oxidantes biológicos (peróxidos lipídicos, ClO^- , metaloenzimas) que se forman naturalmente como parte de la señalización celular y mecanismos humanos de defensa antimicrobianos, producen la liberación de un ligando de picolinato (1 a 2). Las concentraciones de los oxidantes biológicos aumentan en condiciones patológicas, incluyendo inflamación y diabetes. Los complejos oxidantes (3) someten al Cr(III) a reacciones redox con la

formación de especies oxo de Cr(V) (4). En soluciones acuosas neutras, los complejos de Cr(V) se descomponen siguiendo una o varias vías: a) reacciones redox de dos electrones con un ligando o un reductor externo, formando especies de Cr(III) y productos de oxidación orgánica (5), b) estabilización de Cr(V) por reacciones de intercambio de ligando con carbohidratos y ligandos glicoprotéicos (6), c) reacciones de transferencia de un electrón con la formación de complejos de Cr(IV) inestables (7), el cual reacciona con Cr(V) y se forma $[\text{Cr}^{\text{VI}}\text{O}_4^{2-}]$ y especies de Cr(III) en (8). Se cree que esta última vía es la responsable de la formación de Cr(VI), por las reacciones de suplementos nutricionales con Cr(III) y oxidantes biológicos. Los agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno pueden formarse a partir de agentes reductores como el ascorbato bajo condiciones fisiológicas relevantes, las cuales representan un problema más de seguridad vinculado con el uso de formulaciones que contienen además de Cr, vitamina C. A diferencia de los complejos de Cr(III), el Cr(VI) es tomado eficientemente por las células, donde reacciona con los agentes reductores como el glutatión y el ascorbato en presencia de carbohidratos, con la formación de Cr(V) como intermediario (6), éste es reducido y forma complejos de Cr(III) con otras biomoléculas (5), cerrándose el ciclo redox. Los complejos altamente reactivos de Cr(V/IV) causan daño oxidante al ADN. Además, estos mismos complejos reaccionan con residuos de cisteína de enzimas reguladoras, como la tirosina fosfatasa, causando un incremento en la acción de la insulina.

VI. Métodos para la evaluación del daño al ADN

La naturaleza hereditaria de cada organismo vivo se define por su genoma contenido en los cromosomas, formados por una larga secuencia de ADN, en el que se encuentra la información necesaria para su funcionamiento (Lewis, 2004; Lodish y col., 2004).

El ADN es una macromolécula que consiste de dos cadenas helicoidales, formadas por una base nitrogenada púrica (adenina y guanina) o pirimídica (timina y citosina), un azúcar (desoxirribosa) y un grupo fosfato, que en conjunto reciben el nombre de nucleótido (Lewis, 2004; Lodish y col., 2004).

La secuencia de bases con características hereditarias (gen) se transcriben en un ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que se traduce en una secuencia específica de aminoácidos que forman una proteína. A su vez, las proteínas tienen la capacidad de construir estructuras y de llevar a cabo las reacciones metabólicas necesarias para la vida (Lewis, 2004; Lodish y col., 2004).

El ADN se replica en cada ciclo celular y durante este proceso ocasionalmente ocurren errores espontáneos que modifican la secuencia de nucleótidos y que pueden conducir a mutaciones. Si esto ocurre en regiones de codificación, puede resultar en proteínas alteradas

que lleven a enfermedades heredables o aún a la muerte del individuo (Lodish y col., 2004). Menos de uno de cada mil cambios espontáneos accidentales provoca una mutación, el resto de los cambios son eliminados con una eficacia extraordinaria mediante el proceso de reparación del ADN (Alberts y col., 1996).

El proceso básico de reparación supone tres etapas: La porción alterada de la cadena de ADN es reconocida y eliminada por nucleasas de reparación produciendo un hueco en esta región de la hélice; la ADN polimerasa se une a un extremo de la cadena cortada del ADN y coloca nucleótidos uno a uno utilizando la información correcta de la otra cadena; finalmente la ADN ligasa une la cadena completando el proceso de restauración (Alberts y col., 1996).

Ensayo cometa

La integridad del ADN es fundamental para el buen funcionamiento celular. El material genético es susceptible de ser dañado por numerosos agentes (Collins y col., 2008) y aunque la mayoría del daño puede ser reparado eficientemente, parte de él se escapa a este proceso (Alberts y col., 1996). Es por esto que en los últimos años se han desarrollado técnicas para evaluar el daño al ADN como la electroforesis unicelular, también llamada ensayo cometa (Tice y Vasquez, 1999; Collins y col., 2008).

El ensayo cometa es un biomarcador sensible al daño temprano en el ADN en células individuales expuestas *in vivo* o *in vitro* a agentes químicos, físicos o biológicos. Es ampliamente utilizada en el biomonitoreo ambiental y humano para la detección de posibles agentes genotóxicos (Collins y col., 2008; Dunsinska y Collins., 2008).

El principio básico de la técnica es la migración del ADN dañado bajo condiciones de electroforesis y cuya apariencia es similar a la de un cometa donde la cabeza es la región nuclear y la cola son fragmentos nucleares que han migrado en dirección al ánodo (Collins y col., 2008). La versión alcalina del ensayo detecta rompimientos de cadena sencilla y doble del ADN. Muchos agentes que dañan a la molécula de ADN no provocan rupturas directamente, pero pueden producir sitiosapurínicos o apirimidínicos los cuales son alcalilábiles (Collins y col., 2008)

Comparado con otros ensayos de genotoxicidad, el ensayo cometa se distingue por: alta sensibilidad para detectar daño al ADN, obtención de resultados en menor tiempo comparado con otras técnicas como detección de aberraciones cromosómicas, análisis del daño en células individuales, tamaño de muestra pequeño, bajo costo, aplicable a cualquier población de células eucariotas (Collins y col., 2008).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El PicCr es una forma biológicamente activa del Cr que recientemente se ha comercializado como suplemento alimenticio de fácil acceso a la población. Sus propiedades para quemar la grasa y aumentar la masa muscular lo han popularizado como un excelente suplemento dietético, principalmente entre los jóvenes en edad reproductiva.

En linfocitos de humano en cultivo, el PicCr disminuye la viabilidad celular y la síntesis de ADN, e incrementa el daño oxidante y la fragmentación del ADN. Sus efectos se atribuyen al centro crómico y no a su asociación con el AcPic. No obstante, el PicCr es un compuesto muy estable por lo que es probable que entre íntegro a la célula y sus efectos se deban a la unión del Cr con el AcPic.

En las células de ovario de hámster chino, el PicCr induce daño cromosómico. En el varón su ingesta disminuye la movilidad y vitalidad espermática y aumenta la frecuencia de alteraciones morfológicas.

La mayoría de los estudios realizados tanto a nivel clínico como experimental se han abocado a analizar los efectos del PicCr en el macho. Dado que los suplementos alimenticios que contienen PicCr son utilizados tanto por hombres como por mujeres, se considera que es pertinente realizar estudios sobre los efectos de este compuesto en la regulación de las funciones ováricas.

Con base en lo anterior, en este estudio se analizaron los efectos del PicCr y de cada uno de sus componentes (AcPic y Cr, relación 3:1), sobre la secreción de progesterona y estradiol por las células de la granulosa del ovario de mujer mantenidas en cultivo y el posible daño al ADN provocado por el compuesto.

HIPÓTESIS

Dado que el PicCr provoca fragmentación del ADN en las células de ovario de hámster chino y en linfocitos de humano, entonces la administración *in vitro* de este suplemento a las células de la granulosa del ovario de mujer provocará alteraciones en la integridad del ADN. Ya que el PicCr afecta la calidad del semen, en las células de la granulosa en cultivo disminuirá la capacidad esteroidogénica. Debido a que el PicCr es una molécula muy estable, entonces los efectos del Cr y el AcPic sobre la secreción de progesterona y estradiol, no serán reflejo de los provocados por el compuesto.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos del picolinato de cromo sobre el ADN y la secreción *in vitro* de progesterona y estradiol por las células de la granulosa de mujer.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración letal media (CL_{50}) de PicCr en la proliferación celular y la concentración efectiva al 50% (CE_{50}) del mismo suplemento en la liberación de hormonas esteroideas por las células de la granulosa.
2. Analizar los efectos de la administración de PicCr sobre la secreción de progesterona y estradiol inducida por FSH en las células de la granulosa en cultivo.
3. Analizar los efectos de la adición de ácido picolínico o cloruro de cromo sobre la secreción de progesterona y estradiol estimulada por FSH en las células de la granulosa en cultivo.
4. Analizar el daño ocasionado por el PicCr en el ADN de las células de la granulosa en cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Las células de la granulosa se obtuvieron con previo consentimiento, de donantes y pacientes entre 18 y 40 años de edad del Instituto Valenciano de Infertilidad México (IVI) que se encontraban dentro de un programa de reproducción asistida (donación de óvulos, fertilización *in vitro* [FIV] o inyección intracitoplasmática de espermatozoides [ICSI]). En el caso de las pacientes sólo se consideraron aquellas con problemas tales como: obstrucción tubárica uni o bilateral, anormalidades en el útero o debido al factor masculino. El protocolo de estimulación ovárica consistió de un tratamiento con antagonistas de la GnRH (para evitar la interferencia endógena) seguido de la administración de FSH, cuando en la evaluación ultrasonográfica de la cohorte folicular se detectaron folículos con diámetro mayor a 15 mm, se administró hCG y 36 h después se procedió a la punción folicular bajo sedación suave.

Cultivo de células de la granulosa

Tras la punción de los folículos con diámetro entre 15 y 18 mm, se llevó a cabo la recuperación de ovocitos. Con la ayuda de agujas calibre 21G se separaron las células del *cumulus oophorus* de todos los ovocitos aspirados de cada paciente y también se recolectaron células del licor folicular libres de eritrocitos (coágulos). Las células se lavaron cuatro veces en medio WASH (fluido tubárico humano [HTF], IVI México suplementado con HEPES (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Las células se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min, el botón celular se resuspendió en 500 µl de tripsina (0.01%)-EDTA (0.02%) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, EUA) por 5 min. Las células de la granulosa se pasaron repetidas veces por una pipeta Pasteur para realizar una disgregación celular mecánica-enzimática. Pasados los 5 min se añadió 1.5 ml de una mezcla de medio Dulbelco's Eagle Modified con medio Ham F-12 (DMEM/F-12) (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero de bovino fetal (SBF) (GIBCO, México), antibiótico al 1% v/v (penicilina 10,000 U/ml,

estreptomycin 10 mg/ml y anfotericina B 25 µg/ml) (GIBCO), piruvato de sodio (Sigma-Aldrich) e insulina humana 10 µg/ml (GIBCO).

Quimioluminiscencia

La cuantificación de las concentraciones de progesterona (P_4) y 17β -estradiol (E_2) en el medio de cultivo se realizó por inmunoensayo enzimático quimioluminiscente competitivo en fase sólida en el equipo Immulite 1000 (Siemens, UK). Para cada esteroide se utilizó un estuche de Immulite que incluye unidades de análisis, las cuales contienen una esfera recubierta de anticuerpo policlonal de conejo anti-estradiol o anti-progesterona y estándares para realizar la curva patrón. El límite de detección para P_4 es de 0.02 a 20 ng/ml y para E_2 de 20 a 2,000 pg/ml.

El Immulite es un equipo automatizado que toma 25 µl de muestra que reacciona con la fase sólida. La hormona conjugada con enzima compite con la hormona presente en la muestra por un número limitado de unión a anticuerpos situados en la esfera. El exceso de reactivo y de muestra es lavado por centrifugación. Finalmente se añade el substrato quimioluminiscente a la esfera y se genera una señal en proporción a la cantidad de enzima unida. El ciclo de incubación es de una hora.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Las células se sembraron en una caja de 35 mm calidad cultivo de tejidos (Nalgen Nunc, Naperville IL, EUA) y se mantuvieron por 24 h a 37°C en una atmósfera húmeda y saturada con 95% de aire y 5% CO_2 .

Pasadas las 24 h, las células se resuspendieron para realizar el conteo celular en un hematocitómetro, tomando una alícuota de 20 µl de medio-células que se tiñó con 20 µl de azul tripano al 0.5%. Se sembraron 1×10^5 células vivas/ml de medio en placas de cultivo

calidad cultivo de tejidos (Nalgen Nunc International) y se incubaron por 24 h en las mismas condiciones. Se cambió el medio de cultivo por medio fresco más las variables, según lo indique el diseño experimental I ó II. De todos los experimentos se realizaron tres ensayos por triplicado.

En todos los cultivos se adicionó 4-androstene-3,17-diona (Sigma-Aldrich) (10^{-7} M) como substrato para la síntesis de E_2 . En cada ensayo se contó con un grupo sin tratamiento (basal), uno al cual se le administró etanol (EtOH) al 1% por ser el vehículo en el cual se disolvió el esteroide y otro al que además de EtOH+ androstenediona se le añadió dimetilsulfóxido (DMSO) al 2% por ser el diluyente del PicCr.

I. Determinación de la concentración letal media (CL₅₀) de PicCr en la proliferación celular y la concentración efectiva al 50% (CE₅₀) de PicCr en la liberación de hormonas esteroides por las células de la granulosa.

Se realizó una curva dosis-respuesta sometiendo a las células, previamente incubadas por 24 h, a concentraciones crecientes de PicCr (0, 0.3, 3, 30, 300, 3000, 30000, 300000 ng/ml) en un rango que abarca de inocuas a tóxicas para diferentes sistemas de prueba (Stearn y col., 1995b; Speetjens y col., 1999; Hepburn y col., 2003a, Hepburn y col., 2003b) incluyendo en este rango el equivalente (30 ng/ml) a la ingesta recomendada para una mujer de 60 Kg (200 µg de PicCr) (Gómez y Magaña, 2003; Havel, 2004). Los cultivos se incubaron por 24 h más al término de las cuales se realizó un cambio de medio por medio fresco (DMEM-F12) sin SBF con el fin de detener la proliferación celular. En estas condiciones se incubaron por 24 h adicionales tras lo cual se realizó un cambio de medio por medio Optimem (GIBCO) y por cada 200 µl de este medio se adicionaron 20 µl del kit colorimétrico Cell Titer 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA), que se basa en la conversión del colorante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) a formazan. Los cultivos se incubaron por 3 h tiempo en que la conversión tiene lugar. La absorbancia se leyó a 450 nm en un fotómetro de placas (Bio-Rad, Modelo Benchmark, Japón) para la cuantificación de la DL₅₀.

Para la determinación de la DE_{50} se utilizaron cultivos tratados con las mismas concentraciones crecientes de PicCr por 24 h. Finalizado este tiempo se recuperó el medio de cultivo y se almacenó a -20°C hasta la determinación de las concentraciones de P_4 y E_2 por quimioluminiscencia.

II. Análisis de los efectos de la administración de PicCr sobre la secreción de progesterona y estradiol inducida por FSH en las células de la granulosa en cultivo.

Con el fin de evaluar los efectos del PicCr sobre la capacidad biosintética inducida por la FSH, después de la resiembra de las células de la granulosa al medio de cultivo, se les adicionó rFSH (30 ng/ml) (Calbiochem) (Lindeberg y col., 2006). Las células se incubaron por 24 h, se cambió el medio por medio fresco. A estos cultivos se les adicionó PicCr (30 ó 300 ng/ml). Los cultivos se incubaron por 24 h más, finalizado el tiempo de incubación, se recuperó el medio de cultivo y se almacenó a -20°C para la cuantificación de hormonas esteroides.

Se utilizó la concentración de 30 ng/ml de PicCr por ser la equivalente a la dosis recomendada para consumo humano (Gómez y Magaña, 2003; Havel, 2004) y la de 300 ng/ml porque el uso y abuso en la ingesta de PicCr por tiempos prolongados, conlleva a su bioacumulación (Stearns y col., 1995a; Quinto, 2009).

III. Análisis de los efectos de la adición de AcPic o CrCl_3 sobre la secreción de progesterona y estradiol estimulada por FSH en las células de la granulosa en cultivo.

Para analizar los efectos de cada uno de los componentes del PicCr sobre la esteroidogénesis de las células de la granulosa, se utilizaron cultivos adicionados con AcPic o CrCl_3 siguiendo el mismo esquema del experimento anterior.

Las concentraciones de ambos compuestos se muestran en la tabla 3 y se establecieron con base en la proporción de cada compuesto (Stearn y col., 1995a) en correspondencia a las concentraciones de 30 y 300 ng/ml de PicCr.

Tabla 3. Concentraciones de AcPic y CrCl₃ establecidas con base en la proporción de cada compuesto en correspondencia a 30 y 300 ng/ml de PicCr.

PicCr (ng/ml)	AcPic (ng/ml)	CrCl ₃ (ng/ml)
30	26.3	19.1
300	263.0	191.0

IV. Análisis del daño al ADN inducido por el PicCr en las células de la granulosa en cultivo, evaluado por electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa).

Se evaluó el posible daño al ADN ocasionado por el PicCr en las células de la granulosa de mujer, con el ensayo unicelular alcalino. Con la finalidad de registrar el daño considerado primario ocasionado por el tratamiento, a la par se valoró la viabilidad celular. En todos los casos se contó con un grupo tratado con peróxido de hidrógeno para comprobar que la electroforesis se llevó a cabo correctamente

Después de la disgregación mecánica-enzimática, las células de la granulosa se contaron en un hematocitómetro y se sembraron en tubos eppendorf de 1.5 ml en una concentración de 1×10^5 células vivas/ml de medio y se expusieron o no por una hora a concentraciones de 30 ó 300 ng/ml de PicCr. Después del tiempo de tratamiento las células se centrifugaron a 4000 rpm por 5 min tras lo cual se retiró el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 30 μ l de medio DMEM/F-12. Para cada tratamiento se realizaron dos ensayos por duplicado.

a) Viabilidad

De cada tratamiento se tomaron 10 μ l y se colocaron en un tubo eppendorf; a cada uno se le adicionaron 10 μ l de bromuro de etidio 0.025 μ g/ μ l (BrEt) (Sigma) y 10 μ l de 5-6 carboxifluorosceína 0.125 μ g/ μ l (CFDA) (Sigma) y se incubaron por 10 min. Finalizado este tiempo se les adicionó 1ml de medio DMEM/F-12 sin SBF, se centrifugaron a 4000 rpm por 5 min, se eliminó el medio y con el fin de eliminar los colorantes se realizaron tres lavados con medio.

Las muestras se revisaron al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400, Japón) y se evaluó la viabilidad, tomando como vivas aquellas células que reflejaron color verde y como muertas las que tiñen su núcleo de color rojo. En cada ensayo se analizaron 100 células por variable.

b) Ensayo cometa

Para realizar la electroforesis unicelular alcalina se tomaron 20 μ l de muestra y se mezclaron con 75 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (0.5%). La mezcla se colocó en un portaobjetos al que previamente se le aplicó una capa de agarosa regular (0.5%) (75 μ l). Se cubrió con un cubreobjetos libre de impurezas y se llevó a congelación hasta que la agarosa se solidificó; una vez solidificada, se retiró el cubreobjetos y se adicionó una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión (75 μ l), se cubrió nuevamente con un cubreobjetos, se dejó solidificar y nuevamente se retiró el cubreobjetos. Cada muestra se realizó por duplicado.

Para lisar las células de la granulosa, los portaobjetos se colocaron en un vaso coplin con una solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 Mm Na₂EDTA, 10 mM Tris pH 10, 0.1% lauril sarcosinato) al que se le adicionó en fresco Tritón X-100 (1%) y DMSO (10%). Las muestras se mantuvieron por 24 h en solución de lisis a 4°C en condiciones de obscuridad.

El desenrollamiento y corrida de las muestras se realizó en una cámara de electroforesis horizontal con solución de desenrollamiento (NaOH 10 N, EDTA 200 mM pH>13) durante 20 min y a 25 V-300 mA por 20 min adicionales.

Posteriormente los portaobjetos se colocaron en una solución de neutralización (Tris 400 mM, pH 7.5) por 15 min. Este paso se repitió dos veces más con una duración de 5 min por vez. Posteriormente las muestras se deshidrataron con alcohol al 70% por 10 min.

Para visualizar el daño al ADN, las muestras se sometieron al fluorocromo BrEt 60 μ l (0.02 mg/ml) y se observaron al microscopio de fluorescencia (Olympus BH2-RFCA) a 40x a una longitud de onda de 480-550 nm.

Se midieron 100 células al azar. En las células que presentaron daño en forma de cola o estela, se midió la longitud de ésta y la longitud de la cabeza. El cociente de la fórmula longitud de la cola/longitud de la cabeza se utilizó para clasificar el daño en bajo (<1), medio (<2) y alto (>2) (Rodríguez-Mercado y col., 2011).

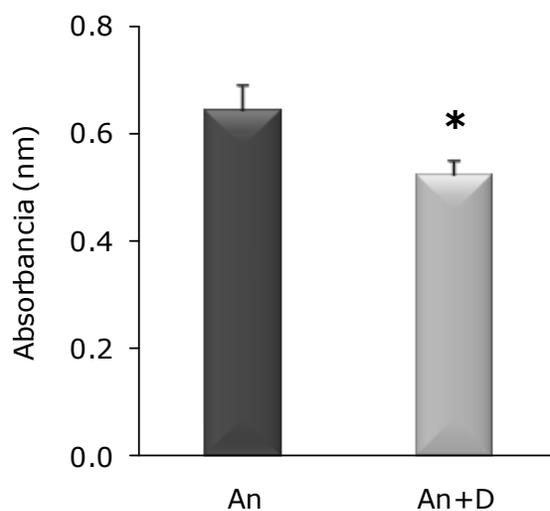
Análisis estadístico

Los datos de la proliferación celular, de las concentraciones de esteroides y de la longitud del cometa se expresaron como media \pm e.e.m y se compararon con la prueba de *U* de Mann-Whitney. La proporción de células sin y con daño se compararon por la prueba de χ^2 . La comparación entre los diferentes tipos de daño se analizó mediante la prueba de *t* de Student. En la migración del ADN se aplicó un análisis de varianza (*ANDEVA*) seguido de la prueba de Tukey. Sólo se consideraron como significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue de 0.05 o menor.

RESULTADOS

Determinación de la concentración letal media (CL₅₀) de PicCr sobre la proliferación de las células de la granulosa de mujer.

Para evaluar la proliferación de las células de la granulosa en cultivo, se utilizó el ensayo colorimétrico basado en la conversión del MTS a formazan. Los resultados mostraron que la adición de EtOH no modificó de manera significativa la proliferación de las células de la granulosa en comparación con la de los cultivos sin tratamiento (basal) (0.60 ± 0.04 vs 0.53 ± 0.03 nm). El tratamiento con EtOH+androstenediona (An) no fue diferente al grupo EtOH (0.64 ± 0.04 vs 0.60 ± 0.04). Al administrar An y DMSO (An+D) en el mismo medio, la proliferación de las células de la granulosa disminuyó respecto a los cultivos tratados con An (Fig. 9).



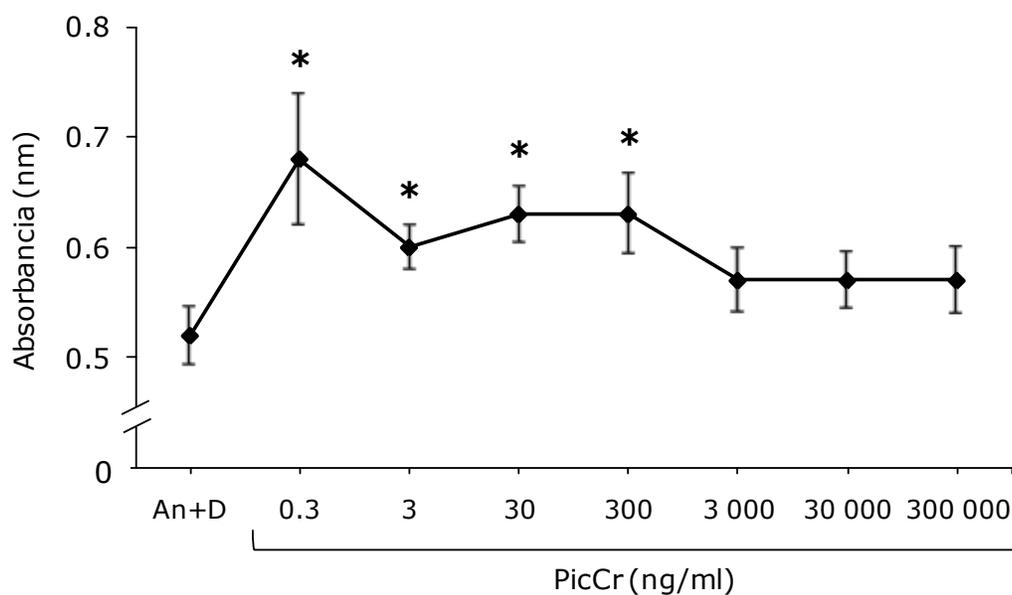
* $p < 0.05$ (Prueba de U de Mann Whitney).

Fig. 9. Proliferación medida por absorbancia de las células de la granulosa tratadas con EtOH+androstenediona (An) y An+DMSO (An+D). Cada barra representa la media \pm e.e.m.

Con base en estas diferencias, para evaluar los efectos de concentraciones crecientes de PicCr sobre la proliferación de las células de la granulosa se consideró como grupo de comparación a los cultivos con An+D y determinar la CL₅₀.

La exposición a concentraciones bajas de PicCr incrementó la proliferación de las células de la granulosa respecto al grupo An+D, mientras que a concentraciones altas no se observaron diferencias significativas (Fig. 10).

No hubo cambios significativos en la proliferación de células de la granulosa entre las diferentes concentraciones de PicCr.



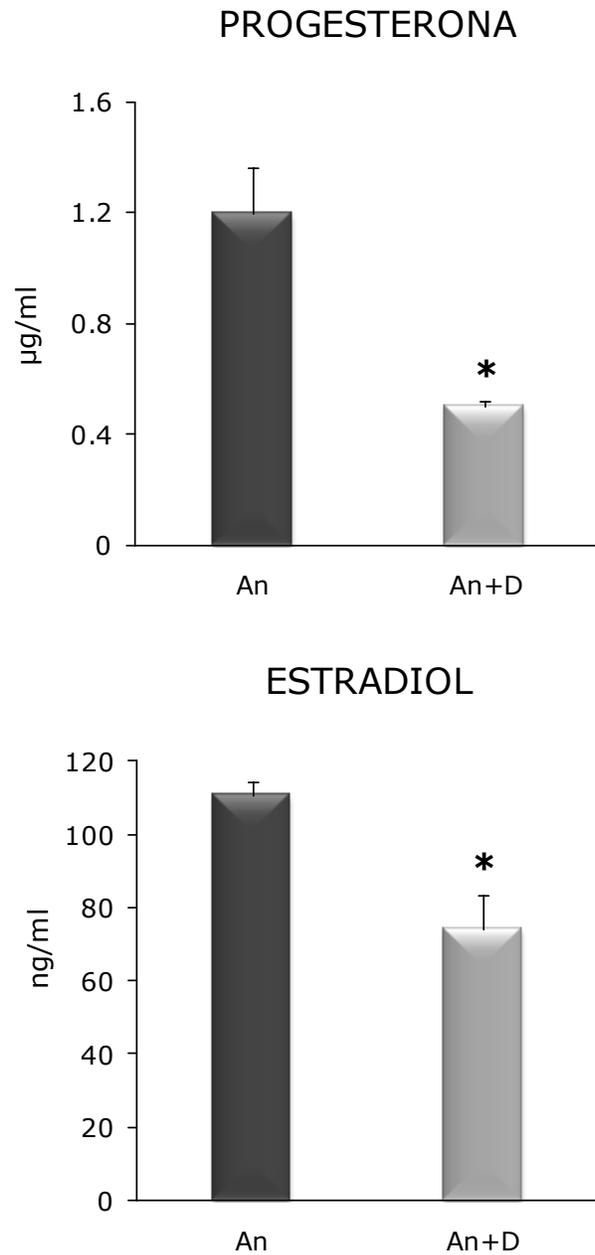
* $p < 0.05$ vs. An+D (Prueba de U de Mann Whitney).

Fig. 10. Proliferación de las células de la granulosa medida por absorbancia. Las células se trataron con EtOH+androstenediona+DMSO (An+D) y An+D+concentraciones crecientes de PicCr (PicCr). Cada punto de la línea representa la media \pm e.e.m.

Determinación de la concentración efectiva al 50% (CE₅₀) de PicCr sobre la liberación de hormonas esteroides por las células de la granulosa de mujer mantenidas en cultivo.

En los cultivos de células de la granulosa, la administración de EtOH no modificó la secreción basal de progesterona (2.2 ± 0.12 vs 2.4 ± 0.09 $\mu\text{g/ml}$). En comparación con el grupo tratado con EtOH, la adición de An la redujo significativamente (2.2 ± 0.12 vs 1.2 ± 0.16 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0.05$). Lo mismo se observó en el grupo An+D respecto al grupo con An (Fig. 11).

La administración de EtOH a los cultivos de células de la granulosa incrementó significativamente la secreción de estradiol, respecto a la basal (5.3 ± 0.1 vs 1.1 ± 0.1 ng/ml , $p < 0.05$). La administración de An resultó en el incremento significativo de la concentración de este esteroide en comparación con el tratamiento con EtOH (5.3 ± 0.1 vs 110.9 ± 3.4 ng/ml , $p = 0.0004$), efecto que disminuyó al tratar a las células con An+D (Fig. 11).



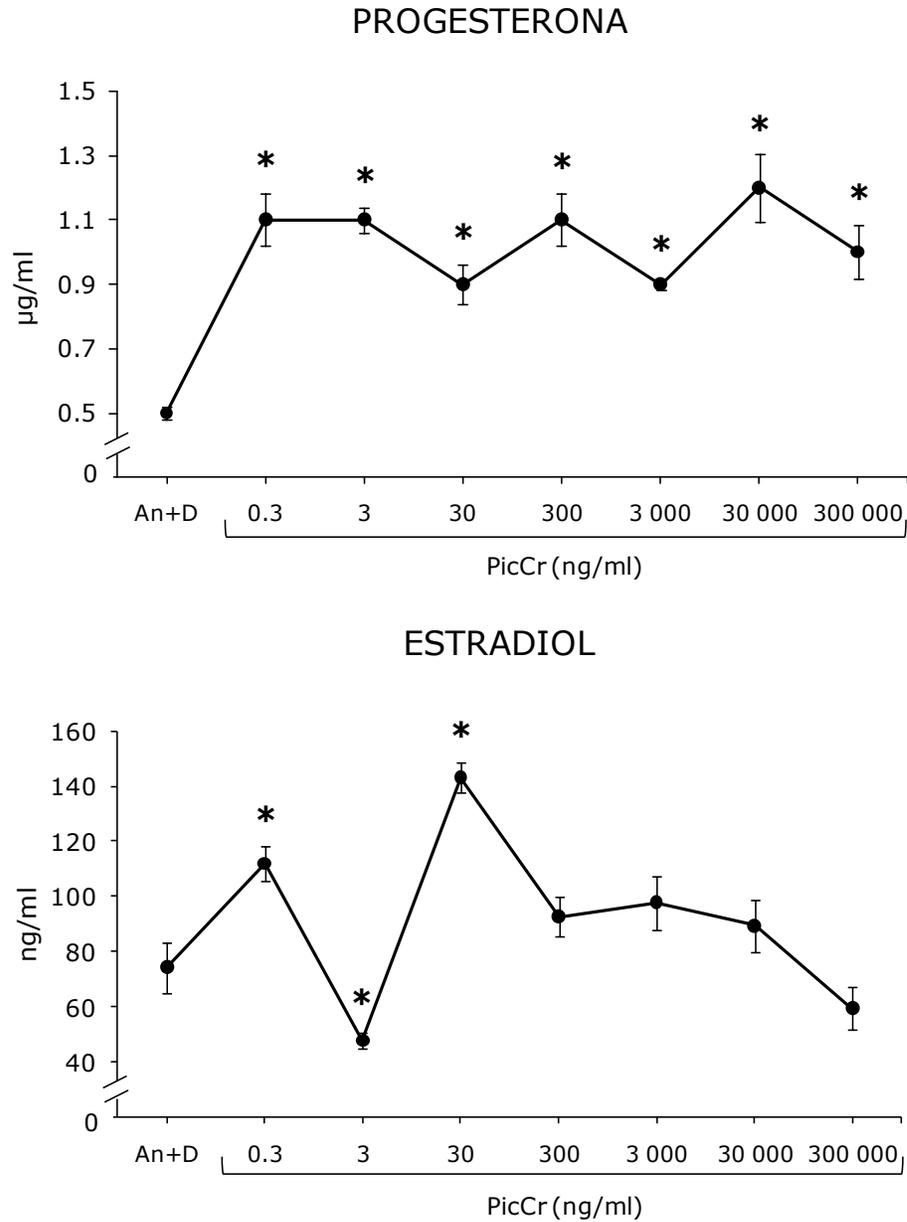
* $p < 0.05$ (Prueba de U de Mann Whitney).

Fig. 11. Concentración de progesterona y estradiol en el medio de cultivo de células de la granulosa tratadas con EtOH+androstenediona (An) y An+DMSO (An+D). Cada barra representa la media \pm e.e.m.

Dada las diferencias observadas en la respuesta de las células de la granulosa a An+D tanto en la proliferación como en la secreción de esteroides, se decidió utilizar este grupo para realizar las comparaciones en los experimentos con PicCr.

El PicCr aumentó la secreción de progesterona respecto a los cultivos con An+D, independientemente de la concentración administrada. En cuanto a la secreción de estradiol, ésta se incrementó significativamente con las concentraciones de 0.3 y 30 ng/ml de PicCr, mientras que el tratamiento con 3 ng/ml de PicCr la disminuyó (Fig. 12).

No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de PicCr en la secreción de progesterona. Con las concentraciones de 0.3, 30 ó 3,000 ng/ml de PicCr la secreción de estradiol fue mayor respecto a la de 3 ng/ml (111.9 ± 6.2 , 143.1 ± 5.6 , 92.7 ± 7.4 vs 47.9 ± 3.0 ng/ml, $p < 0.05$) y con la administración de 30,000 ó 300,000 ng/ml la secreción fue menor en comparación con 30 ng/ml (89.4 ± 9.3 , 59.5 ± 7.6 vs 143.1 ± 5.6 ng/ml, $p < 0.05$).



* $p < 0.05$ vs. An+D (Prueba de U de Mann Whitney).

Fig. 12. Concentración de progesterona y estradiol en el medio de cultivo de células de la granulosa tratadas con EtOH+androstenediona+DMSO (An+D) y An+D+concentraciones crecientes de picolinato de cromo (PicCr). Cada punto de la línea representa la media \pm e.e.m.

Tomando en consideración los resultados anteriores, se utilizaron las concentraciones de 30 ng/ml (equivalente a la dosis diaria recomendada para una mujer de 60 kg) y 300 ng/ml de PicCr para evaluar sus efectos sobre la esteroidogénesis de las células de la granulosa estimuladas con FSH.

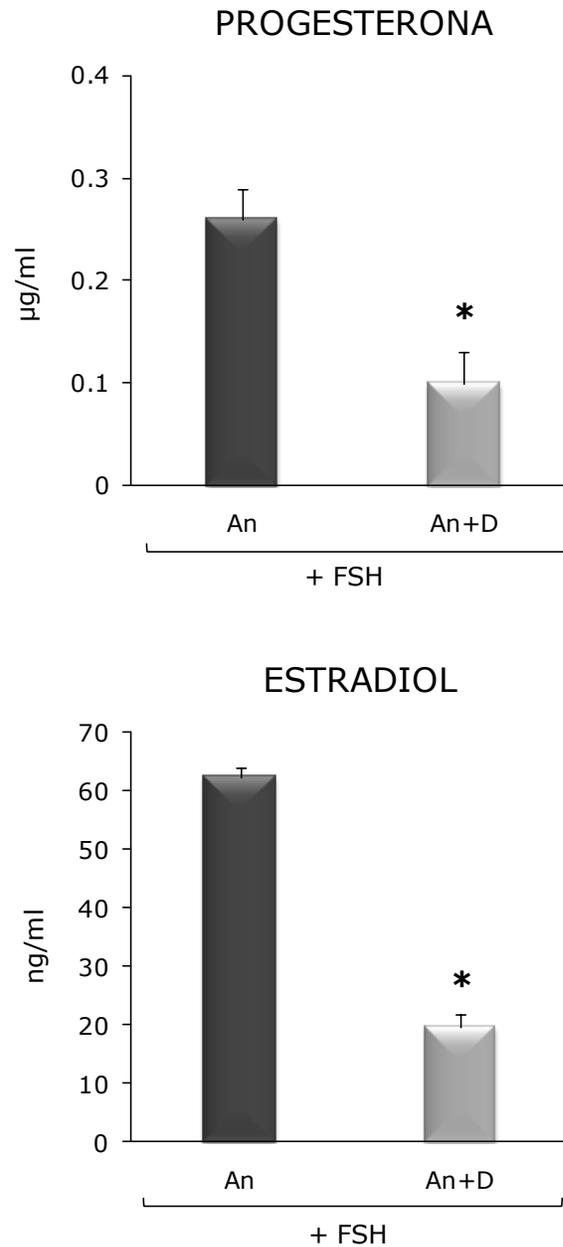
Efectos de la administración de PicCr sobre la secreción de progesterona y estradiol inducida por FSH en las células de la granulosa en cultivo.

La estimulación con FSH no modificó la secreción basal de progesterona por las células de la granulosa (0.53 ± 0.05 vs 0.40 ± 0.04 $\mu\text{g/ml}$). La adición de EtOH a los cultivos pretratados con FSH, resultó en una disminución de la secreción de progesterona (0.40 ± 0.04 vs 0.19 ± 0.01 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0.05$). Los efectos de la administración de An no mostraron diferencias respecto al grupo EtOH (0.26 ± 0.03 vs 0.19 ± 0.01 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0.05$). En comparación con el grupo tratado con An, el agregado de An+D decreció la secreción de progesterona (Fig. 13).

En los cultivos de células de la granulosa, la FSH no modificó la secreción basal de estradiol (0.4 ± 0.01 vs 0.5 ± 0.06 ng/ml). El tratamiento con EtOH incrementó la secreción de este esteroide respecto a los cultivos estimulados con FSH (3.5 ± 0.29 vs 0.4 ± 0.01 ng/ml, $p < 0.05$). El agregado de An al medio la aumentó en comparación con EtOH (62.4 ± 1.5 vs 3.5 ± 0.29 ng/ml, $p = 0.0004$) y An+D la disminuyó significativamente respecto a los cultivos tratados con An (Fig. 13).

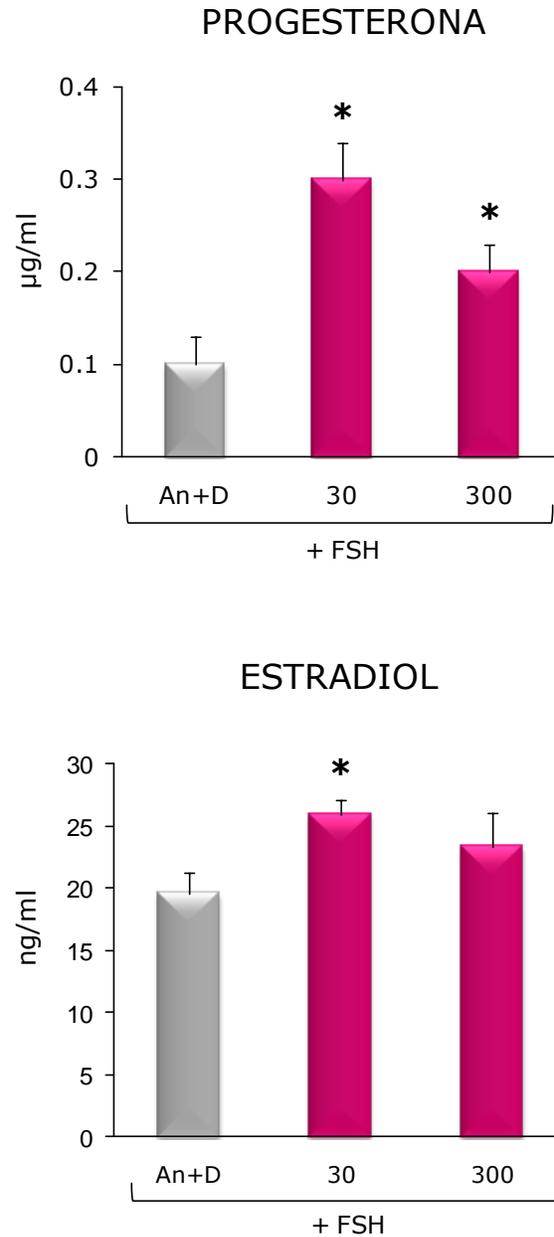
En comparación con los cultivos pretratados con FSH y estimulados con An+D, el tratamiento con 30 ó 300 ng/ml de PicCr incrementó la secreción de progesterona. En estos cultivos, la adición de 30 ng/ml de PicCr aumentó de manera significativa la secreción de estradiol, mientras que con 300 ng/ml no la modificó (Fig. 14).

No hubo diferencias significativas entre 30 y 300 ng/ml de PicCr en la secreción de ambos esteroides.



* $p < 0.05$ (Prueba de U de Mann Whitney).

Fig. 13. Concentración de progesterona y estradiol en el medio de cultivo de células de la granulosa pretratadas con FSH por 24 h y posteriormente tratadas con EtOH+androstenediona (An) y An+DMSO (An+D). Cada barra representa la media \pm e.e.m.



* $p < 0.05$ vs. An+D (Prueba de U de Mann Whitney).

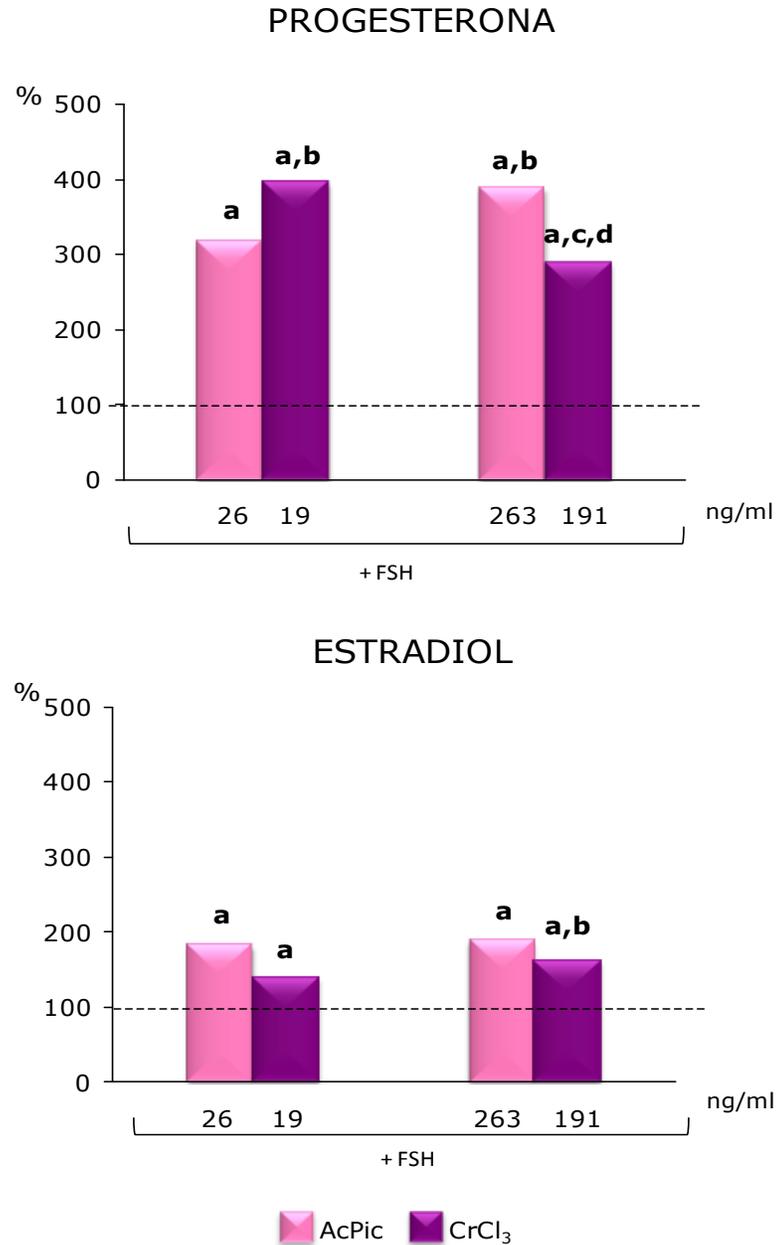
Fig. 14. Concentración de progesterona y estradiol en el medio de cultivo de células de la granulosa pretratadas con FSH por 24 h y posteriormente tratadas con EtOH+androstenediona+DMSO (An+D) y An+D+30 ó 300 ng/ml de picolinato de cromo. Cada barra representa la media \pm e.e.m.

Efectos de la adición de AcPic o CrCl₃ sobre la secreción de progesterona y estradiol estimulada por FSH en las células de la granulosa en cultivo.

En estos experimentos no se empleó DMSO como diluyente dada la alta solubilidad en agua tanto del AcPic como del CrCl₃, por lo que se utilizó como grupo de comparación los cultivos adicionados únicamente con An.

En la figura 15 se muestra el incremento porcentual de la secreción de progesterona y estradiol por las células de la granulosa pretratadas con FSH y tratadas con AcPic o CrCl₃ en las concentraciones correspondientes a 30 y 300 ng/ml de PicCr. En todos los grupos tratados con AcPic o CrCl₃, la secreción de ambos esteroides sobrepasa de manera significativa al grupo con An, haciéndose más evidente el incremento en la secreción de progesterona.

El tratamiento con CrCl₃, en la concentración de 19 ng/ml incrementó de manera significativa la secreción de progesterona en comparación con el AcPic (26 ng/ml). Cuando las células se trataron con las concentraciones altas de AcPic o CrCl₃, se observó el efecto contrario, lo que resultó en una diferencia significativa entre la concentración baja y alta de cada compuesto. Mientras que en la secreción de estradiol, el incremento observado sólo mostró diferencias significativas entre la concentración baja y alta de CrCl₃ (Fig. 15).



a, $p < 0.05$ vs An

b, $p < 0.05$ vs. 26 ng/ml de AcPic (Prueba de *U* de Mann Whitney).

c, $p < 0.05$ vs. 19 ng/ml de CrCl₃ (Prueba de *U* de Mann Whitney).

d, $p < 0.05$ vs. 263 ng/ml de AcPic (Prueba de *U* de Mann Whitney).

Fig. 15. Incremento porcentual de la secreción de progesterona y estradiol por las células de la granulosa pretratadas con FSH por 24 h y posteriormente tratadas con CrCl₃ 19 ó 191 ng/ml o AcPic 26 ó 263 ng/ml. Línea discontinua grupo EtOH+androstenediona (An).

Análisis del daño al ADN inducido por el PicCr en las células de la granulosa en cultivo, evaluado por electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa).

a) Viabilidad

La evaluación de la viabilidad de las células de la granulosa tratadas o no con PicCr siempre fue mayor del 80% (Tabla 4).

Tabla 4. Media \pm e.e.m. de la viabilidad de las células de la granulosa sin tratamiento (basal) o tratadas con PicCr.

Tratamiento	Viabilidad
Basal	95.0 \pm 3.0
PicCr 30 ng/ml	90.5 \pm 8.5
PicCr 300 ng/ml	84.0 \pm 2.0

b) Ensayo cometa

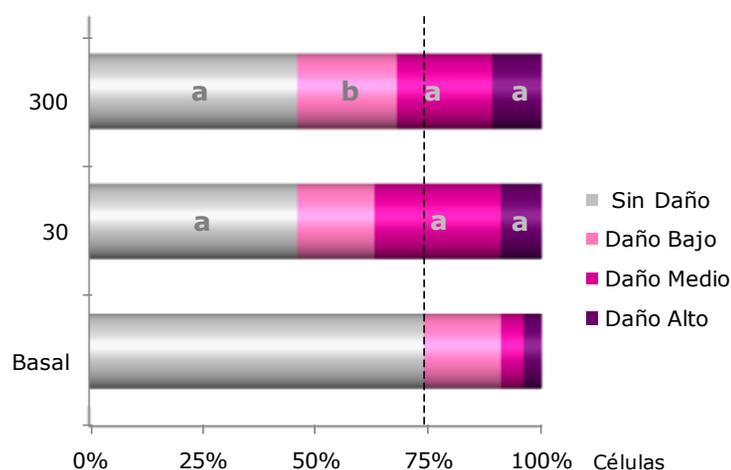
Cuando las células de la granulosa se trataron por una hora con PicCr, independientemente de la concentración, la longitud promedio de los cometas, así como la proporción de células con daño se incrementaron significativamente en comparación con las células que no recibieron tratamiento. No se observaron diferencias significativas en los diferentes parámetros evaluados entre las dos donantes (Tabla 5).

El análisis del tipo de daño al ADN de las células de la granulosa mostró que el tratamiento con PicCr disminuyó significativamente la proporción de células sin daño e incrementó la frecuencia de daño medio y alto; el daño bajo sólo fue estadísticamente significativo entre las concentraciones de PicCr (Fig. 16).

Tabla 5. Longitud total del cometa (μm) (media \pm e.e.m) y proporción de células de la granulosa sin y con daño en el ADN, de los cultivos tratados con PicCr (30 ó 300 ng/ml) y sin tratamiento (basal).

	Tratamiento	Longitud del cometa Media \pm e.e.m.	Células sin daño %	Células con daño %
Donante 1	Basal	22.9 \pm 0.8	79	21
	PicCr 30 ng/ml	32.3 \pm 1.5 a	42	58 b
	PicCr 300 ng/ml	30.8 \pm 1.3 a	45	55 b
Donante 2	Basal	23.9 \pm 0.7	71	29
	PicCr 30 ng/ml	31.4 \pm 0.9 a	46	54 b
	PicCr 300 ng/ml	29.4 \pm 0.8 a	47	53 b

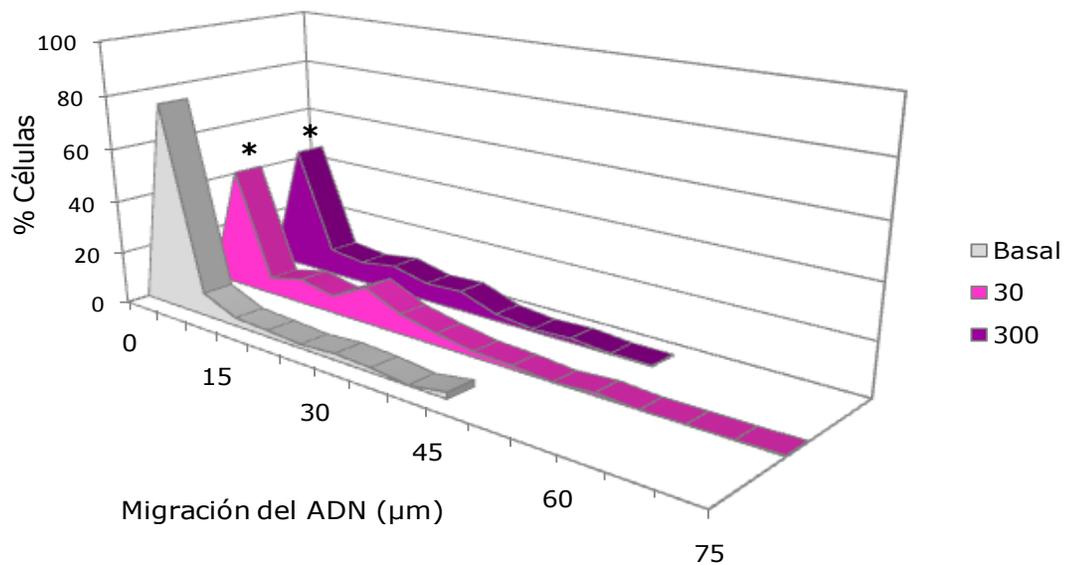
a, $p < 0.0001$ vs. Basal correspondiente (Prueba de U de Mann-Whitney).
b, $p < 0.0001$ vs. Basal correspondiente (Prueba de χ^2).



a, $p < 0.05$ vs. Basal correspondiente (Prueba de t de Student).
b, $p < 0.05$ vs. Daño bajo de 30 ng/ml de PicCr (Prueba de t de Student).

Fig. 16. Frecuencia de células de la granulosa tratadas con PicCr (30 ó 300 ng/ml) y sin tratamiento (basal), agrupadas por tipo de daño al ADN.

En la evaluación del daño en función de la migración del ADN (cola) de las células de la granulosa, se observó que ésta se incrementó significativamente al adicionar 30 ó 300 ng/ml de PicCr respecto a la distribución del grupo basal. No hubo diferencias significativas entre las concentraciones de PicCr (Fig. 17).



* $p < 0.0001$ vs. Basal (ANDEVA seguido de prueba de Tukey).

Fig. 17. Distribución de la migración del ADN (μm) de las células de la granulosa tratadas con 30 ó 300 ng/ml de PicCr y sin tratamiento (Basal).

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que el PicCr adicionado a las células de la granulosa de mujer en cultivo provoca daños al ADN, aumenta la secreción de estradiol y progesterona tanto basal como estimulada con FSH y los efectos del PicCr no son la sumatoria de los efectos del AcPic y del Cr.

En las técnicas de cultivo de tejidos, el etanol es ampliamente utilizado como disolvente de las hormonas esteroides (Henderson y col., 1987; Krey y Kamel, 1990; Ortega, 2007). En cultivos de células de la granulosa la adición de etanol al medio de cultivo no afecta la proliferación celular (Saxena y col., 1990; Wimalasena y col., 1993), similar a lo observado en el presente estudio.

En fibroblastos de embrión de ratón en cultivo el agregado de DMSO, en la misma concentración que la usada en el presente estudio, inhibe la síntesis de ADN y proteínas (Nagashunmugam y col., 1989). El DMSO bloquea el paso de la fase G_0 a G_1 del ciclo celular e impide la expresión de genes involucrados en esta transición (Srinivas y col., 1991). Un efecto similar parece ocurrir en nuestros cultivos, ya que la tendencia al aumento en la proliferación que muestran las células de la granulosa al adicionarles androstenediona, se vio abatida al incorporar DMSO.

La insulina estimula la proliferación de células de la granulosa en cultivo (Spicer y col., 1993) y en cultivos de adipocitos el PicCr amplifica la respuesta celular a la insulina (Chen y col., 2006). Una probable explicación para el hecho que concentraciones bajas y medias de PicCr aumenten la proliferación sería que el PicCr incrementa la sensibilidad de las células de la granulosa a la insulina, como sucede en los adipocitos.

El agregado de concentraciones altas de PicCr a los cultivos de células CHO no modifica su supervivencia (Stearn y col., 1995b). En preadipocitos (Lien y col., 2007) y linfocitos (Jana y col., 2009) el agregado de PicCr disminuye la proliferación celular, siendo en estos últimos por el incremento en la generación de ERO (Jana y col., 2009). Esta controversia al parecer está

vinculada con la susceptibilidad intrínseca de cada tipo celular al PicCr (Stearns y col., 1995b; Jana y col., 2009). Ya que el DMSO actúa como inactivador de ERO (Rosenblum y El-Sabban, 1982), sugerimos que en nuestros cultivos podría estar atenuando los efectos de concentraciones altas (3,000 a 300,000 ng/ml) de PicCr como generador de ERO.

En células de la granulosa de bovino se describe la presencia de ARNm que codifica para 17β -HSD, P_{450} aromatasa y 3β -HSD y existe una correlación de la cantidad de las dos primeras enzimas con la acumulación de estradiol en el medio de cultivo y de la última con la de progesterona (Sahmi y col., 2004). Esta capacidad esteroideogénica de las células de la granulosa se mantiene bajo las condiciones de cultivo de nuestro estudio.

Földesi y colaboradores (1998) mostraron que las células de la granulosa de mujer mantenidas en cultivo son capaces de secretar estradiol sin el aporte androgénico o gonadotrópico. Al igual que en el presente estudio, las células fueron obtenidas de mujeres que recibieron terapia gonadotrópica de reemplazo, en la cual uno de los efectos de la FSH es el incremento en la síntesis y actividad de la aromatasa (Couse y col., 2006), por lo que no podemos descartar que la secreción de estradiol *in vitro* se deba a este hecho.

En cultivos de ovario de tilapia, la adición de etanol incrementa la concentración del ARNm para la P_{450} aromatasa con el subsecuente aumento en la concentración de estradiol (Kim y col. 2004). Lo que explicaría que en nuestros cultivos, el etanol amplificó la capacidad de secretar estradiol.

En el medio de cultivo de células de la granulosa la androstenediona actúa como sustrato, lo que explica el incremento en la concentración de estradiol (Saxena y col., 1990; Wimalasena y col., 1993). Además, la androstenediona estimula la expresión del gen que transcribe al ARNm que codifica para la P_{450} aromatasa (Simpson y col., 1994; Hamel y col., 2005). El aumento en la secreción de estradiol observado en el presente estudio cuando se agregó androstenediona al cultivo, se explican por ambos efectos de la hormona (sustrato y estimulante de la síntesis de la aromatasa).

Hasta el momento, no tengo una explicación de por qué la adición de androstenediona a los cultivos, disminuyó la secreción de progesterona.

Dado que el DMSO interfiere con el ciclo celular y con la síntesis de proteínas (Nagashunmugam y col., 1989; Srinivas y col., 1991), la inhibición de la síntesis de progesterona y estradiol por las células tratadas con androstenediona y DMSO podría explicarse por el bloqueo parcial de la síntesis de las enzimas involucradas en la biosíntesis de estos esteroides.

La proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis (StAR) transporta al colesterol al interior de la mitocondria. Las células de la granulosa en cultivo expresan el ARNm para la proteína StAR (Bao y col., 1998; Minegishi y col., 2000; Sahmi y col., 2004) y las enzimas P_{450scc} y 3β -HSD involucradas en la síntesis de progesterona (Sahmi y col., 2004). Si el PicCr remueve parcialmente al colesterol de la membrana plasmática (Chen y col., 2006), es probable que las elevadas concentraciones de progesterona evaluadas en los cultivos de células de la granulosa de mujer adicionados con PicCr, se obtengan por esta vía.

Para explicar la relación dosis-respuesta de un compuesto dado, recientemente se ha descrito un fenómeno llamado hormesis (Calabrese y Baldwin, 2002; Calabrese 2004; Mattson, 2008). Las curvas horméticas no siguen un patrón lineal, por el contrario adoptan diversas formas como puede ser en U, U invertida, J, sigmoidea, entre otras. En términos biológicos la hormesis representa la sobrecompensación de una célula u organismo para garantizar el mantenimiento de la homeostasis (Calabrese y Baldwin, 2002; Mattson, 2008). Al parecer los efectos del PicCr sobre la secreción de estradiol por las células de la granulosa siguen un patrón hormético, ya que a concentraciones bajas (0.3 y 3 ng/ml) o medias (30 ng/ml) la modificó, mientras que a concentraciones altas (3,000-300,000 ng/ml) no la afectó.

Los mecanismos que llevan a un comportamiento hormético son tan diversos como los agentes que lo presentan. Se ha descrito que las ERO se incrementan por acción del suplemento (Hepburn y col., 2003b; Jana y col., 2009). En células de la granulosa de mujer las ERO disminuyen la producción de estradiol (Appasamy y col., 2008). Por lo anterior una posible explicación para parte de los efectos del PicCr sobre la secreción de estradiol, sería vía

la generación de ERO, cuya producción a su vez, se han descrito como una vía de señalización hormética (Beristain, 2008).

Si bien concentraciones bajas de ERO participan en la regulación de la luteinización (Olivera y col., 2007), el hecho que el PicCr tenga la capacidad de acumularse en los tejidos (Stearns y col., 1995a; Quinto, 2009), permite sugerir que aunado a la biocumulación del suplemento, las concentraciones de ERO irían en aumento lo que llevaría a la deficiencia en la secreción de estradiol como ya se ha descrito por otros autores (Appasamy y col., 2008)

Diversos autores han descrito efectos benéficos para el PicCr, como potenciar la acción de la insulina (Chen y col., 2006), incrementar la masa muscular y reducir la grasa corporal (Anderson y col., 1997). En contraste otros investigadores han indicado que ocasiona efectos dañinos como disminución de la calidad espermática (Cuapio y col., 2009), generación de radicales libres, daño al ADN (Jana y col., 2009) e infertilidad (Hepburn y col., 2003c). Adicionalmente, otros grupos no han encontrado efectos del PicCr (Stout y col., 2009). Todos estos estudios ponen de manifiesto que los resultados dependen del modelo biológico, de los parámetros evaluados y de las concentraciones administradas.

En la mayoría de los estudios antes mencionados, independientemente del modelo biológico, evalúan los efectos del PicCr utilizando concentraciones 100 a 15,000 veces mayores a la recomendada para consumo humano ($200 \mu\text{g}/60 \text{ Kg} = 30 \text{ ng/ml}$; Gómez y Magaña, 2003; Havel, 2004). En el presente estudio, administramos este suplemento al cultivo de células de la granulosa en concentraciones menores y mayores a la recomendada, lo que facilitó evidenciar un posible efecto hormético en la proliferación celular y en la secreción de estradiol.

No se determinó la CL_{50} del PicCr en la proliferación de las células de la granulosa, ya que aún la concentración más alta no fue citotóxica, ni la CE_{50} debido a su comportamiento hormético en la secreción de estradiol

En células de la granulosa de mujer estimuladas con FSH, el etanol disminuye la secreción de progesterona a los tres días de cultivo y no la afecta a los 5 ó 9 días de cultivo (Saxena y col.,

1990). La secreción de progesterona por las células de la granulosa no sigue un patrón dosis-respuesta frente al tratamiento con concentraciones crecientes de etanol (Wimalasena y col., 1996). En nuestro estudio cuando las células de la granulosa fueron pretratadas con FSH, la administración de etanol disminuyó la secreción de progesterona al medio de cultivo. Por ello, proponemos que los efectos del etanol sobre la secreción de progesterona dependen del tiempo de incubación, presencia y concentración de FSH y concentraciones de etanol.

El etanol eleva la concentración de estradiol en el medio de cultivo de células de la granulosa en presencia o no de FSH (Wimalasena y col., 1996) debido a un aumento en la actividad aromatasas (Kim y col., 2004). Un resultado semejante observamos en nuestro estudio.

En nuestro estudio el tratamiento con FSH y androstenediona resultaron en un aumento significativo de la secreción de estradiol, lo cual se explica por los efectos que ambas hormonas tienen como estimulantes de la aromatasas y su acción como sustrato (Saxena y col., 1990; Wimalasena y col., 1993; Simpson y col., 1994; Földeshi y col., 1998; Guet y col., 1999; Hamel y col., 2005).

Al igual que lo observado anteriormente, el daño provocado por el DMSO sobre la secreción de progesterona y estradiol por las células de la granulosa, permanece aún después de la estimulación de las células con FSH.

Diversos estudios utilizando diferentes modelos experimentales muestran que el mantenimiento de concentraciones elevadas y constantes de progesterona o estradiol suprimen la secreción de tónico-fásica de GnRH, lo que resulta en la inhibición de los ARNm de las subunidades que conforman a las gonadotropinas (Kyeong-Hoon y Kaiser, 2006) y disminución de la liberación de LH (Batra y Miller, 1985; Krey y Kamel, 1990). Dado que ciertas concentraciones de PicCr incrementan la secreción de ambos esteroides, en condiciones basales o estimuladas por FSH, es posible pensar que la ingesta de este suplemento ocasionaría un desbalance hormonal que pueda culminar con la inhibición de la ovulación (Schreiber y Barnhart, 2009).

A la fecha no existen estudios sobre el metabolismo del PicCr. Dada la magnitud de respuesta

de las células de la granulosa al tratamiento con PicCr, CrCl_3 o AcPic, es un hecho que tanto el suplemento como sus componentes son capaces de estimular la esteroidogénesis. Sin embargo, las concentraciones de progesterona y estradiol secretadas al medio por las células de la granulosa expuestas a cada uno de sus componentes, no guardan la misma relación que se observa con PicCr, por lo que sugerimos que este suplemento no se disocia al menos durante las 24 h que dura el tratamiento.

La integridad del ADN determina que las células funcionen adecuadamente y puedan llevar a cabo las reacciones metabólicas necesarias en la vida de un organismo (Alberts y col., 1996).

El ensayo cometa alcalino detecta rupturas de cadena doble y sencilla del ADN, así como sitiosapurínicos y apirimídínicos (álcali-lábiles) (Tice y Vasquez, 1999; Collins y col., 2008). El PicCr se ha clasificado como un compuesto clastogénico (Stearns y col., 1995b), es decir que provoca rupturas al ADN. El hecho que al exponer a las células de la granulosa al PicCr incrementa la longitud total de los cometas, confirma esta aseveración.

Las células eucariontes poseen diversos sistemas de reparación del daño al ADN, la mayoría conlleva un proceso de escisión para suprimir el daño (nucleótidos o bases) (Alberts y col., 1996). En el ensayo cometa, la migración del ADN puede ser pequeña, si las lesiones ya fueron reparadas o aumentar por la eliminación en curso del daño (Sancar y col., 2004; Brendler-Schwaab y col., 2005). Parte del daño evaluado mediante esta técnica puede ser reflejo del daño ocasionado por el PicCr y de la actividad de los mecanismos de reparación, lo que justificaría el incremento en la proporción de células de la granulosa con daño medio y alto. Estudios posteriores de la cinética de reparación del ADN de las células de la granulosa frente al tratamiento con PicCr, aportarán mayor información al respecto.

No obstante este es el primer estudio enfocado a evaluar el daño primario al ADN en células de la granulosa de mujer provocado por el PicCr.

Las alteraciones al ADN detectadas por el ensayo cometa pueden ser originadas por estrés oxidativo (Dusinka y Collins, 2008; Beristain, 2008). Estudios *in vivo* e *in vitro* muestran que el PicCr incrementa las ERO, capaces de actuar sobre el ADN y provocar daño oxidante

(Hepburn y col., 2003b; Jana y col., 2009), lo cual explicaría las modificaciones observadas en este estudio.

Se han planteado dos hipótesis sobre los posibles mecanismos por los que el PicCr podría inducir daño genético. La primera se basa en que el centro crómico de la molécula de PicCr al interactuar con agentes reductores como el ascorbato y los trioles (por ejemplo glutatión) puede ser fácilmente reducido, pasando del estado de oxidación III al II que puede reaccionar con O₂ y vía el ciclo de Fenton formar radicales •OH, provocando daño oxidante al ADN (Speetjeens 1999; Levina y Lay, 2005). Otro modelo que recientemente se ha propuesto es la oxidación del centro de cromo producida por oxidantes biológicos como el peróxido de hidrógeno o por sistemas enzimáticos comunes como la glucosa oxidasa o la xantina oxidasa, lo que puede ocurrir a 37°C bajo condiciones de pH 7.4. La consecuencia de esta oxidación puede ser el cambio del estado oxidado III al VI con intermediarios IV y V que son de nuevo reducidos e interactuar con biomoléculas para formar aductos (Zhitkovich y col., 2002; Levina y col., 2007) y generar ERO (Levina y col., 2007). Cualquiera que sea el mecanismo que siga el PicCr provoca un daño al ADN, tal como nuestros resultados lo indican.

En resumen, debido a las modificaciones en la esteroidogénesis de las células de la granulosa, al daño al ADN de las mismas y al comportamiento hormético del PicCr, sugerimos que el uso, abuso o consumo prolongado del PicCr como suplemento alimenticio sería perjudicial a la salud reproductiva.

CONCLUSIONES

- ⊕ Las células de la granulosa de mujer, bajo condiciones de cultivo, mantienen su capacidad de secretar estradiol.
- ⊕ En las células de la granulosa *in vitro*, el etanol estimula la secreción de estradiol.
- ⊕ En las células de la granulosa en cultivo, el dimetilsulfóxido inhibe la secreción de progesterona y estradiol.
- ⊕ El PicCr a concentraciones bajas y medias aumenta la proliferación de las células de la granulosa mantenidas en cultivo, mientras que dosis altas no la afectan.
- ⊕ El PicCr adicionado al cultivo de células de la granulosa de mujer, incrementa la secreción de progesterona espontánea y estimulada por FSH.
- ⊕ El PicCr tiene un efecto hormético sobre la secreción espontánea de estradiol por las células de la granulosa.
- ⊕ La dosis de PicCr equivalente a la recomendada para consumo humano, incrementa la secreción de estradiol estimulada por FSH.
- ⊕ El PicCr provoca daño al ADN de las células de la granulosa.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos llevaron a plantear las siguientes preguntas:

- ⊕ A la fecha no hay información sobre el metabolismo del PicCr y los resultados obtenidos en este estudio muestran que la respuesta esteroideogénica de las células de la granulosa a la adición de ácido picolínico o cromo no es el reflejo de la obtenida con el PicCr, entonces ¿el PicCr ingresa intacto a la célula de la granulosa?
- ⊕ Si el PicCr es un generador de ERO ¿la concentración de ERO se incrementará en función de la concentración de PicCr en las células de la granulosa en cultivo?
- ⊕ Los cambios en la secreción de progesterona y estradiol por las células de la granulosa en cultivo, en respuesta al tratamiento con PicCr ¿se deberán a que el PicCr modifica la concentración de los ARNm para las enzimas 17-HSD y P₄₅₀ aromatasas y su expresión? ¿las ERO estarán involucradas en este proceso?
- ⊕ El daño al ADN de las células de la granulosa observado en este estudio ¿es ocasionado por el compuesto en sí o es resultado de la actividad de las enzimas de reparación?

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD. (1996). *Biología Molecular de la célula*. 3ª ed. Ediciones Omega. Barcelona. 93-135, 237-280.
- Anderson RA, Bryden NA y Polansky MM. (1997). Lack of toxicity of chromium chloride and chromium picolinate in rats. *Journal of the American College of Nutrition*. **16**, 273–279.
- Appasamy M, Jauniaux E, Serhal P, Al-Qahtani, Groome NP y Muttukrishna S. (2008). Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation. *Reproductive endocrinology*. **89**, 912-921.
- Audesirk T y Audesirk G. (1997). *Biología. La Vida en la Tierra*. 4ª edición. Pearson. México.
- Bao B, Calder MD, Xie S, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS y Garverick HA. (1998). expression of steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid is limited to theca of healthy bovine follicles collected during recruitment, selection, and dominance of follicles of the first follicular wave. *Biology of reproduction*. **59**, 953-959.
- Batra SK y Miller W. (1985). Progesterone decreases the responsiveness of ovine pituitary cultures to luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology*. **117**, 1436-1440.
- Beristáin AS. (2008). Influencia del envejecimiento sobre la eficiencia del sistema antioxidante, daño oxidativo y capacidad de reparación del ADN en sujetos sanos de la ciudad de México. Tesis de Maestría. FES-Zaragoza, UNAM; 114.
- Bernao A, Meseguer I, Aguilar MV, Martínez MC, González Muñoz MJ. (2004). Effect of different doses of chromium picolinate on protein metabolism in infant rats. *Journal of trace elements in medicine and biology*. **18**, 33-39.
- Berner TO, Murphy MM y Slesinski. (2003). Determining safety of chromium tripicolinate for addition to foods as a nutrient supplement. *Food and Chemical Toxicology*. **42**, 1029-1042.
- Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhler S y Speit G. (2005). The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*. **20**, 245-254.

-
- Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. (2003). Definición y causas de la infertilidad. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*. **54**, 227, 248.
 - Byskov AG. (1978). The anatomy and ultrastructure of rete system in the fetal mouse ovary. *Biology of reproduction*. **19**, 720-735.
 - Calabrese EJ y Baldwin LA. (2002). Defining hormesis. *Human and Experimental Toxicology*. **21**, 91-97.
 - Calabrese EJ. (2004). Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine. *EMBO*. **5**, S37-S40.
 - Charli JL, Ponce G y Joseph-Bravo P. (1991). Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRH-érgicas hipotalámicas. En: Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. Ed. R. Domínguez. PUIS-UNAM. Miguel Ángel Porrúa. México; 60.
 - Chen G, Liu P, Pattar GR, Tackett L, Bhonagiri, Strawbridge AB y Elmendorf JS. (2006). Chromium activates glucose transporter 4 trafficking and enhances insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via a cholesterol-dependent mechanism. *Molecular Endocrinology*. **20**, 857-870.
 - Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC y Stetina R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. **23**, 143-151.
 - Couse JF, Hewitt SC y Korach KS. (2006). Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction Vol.1. 6ª ed. Ed. Neill JD, Plant TM, Pfaff DW, Challis JRG, Kretser DM, Richards JS y Wassarman PM. Elsevier. San Diego, EUA; 593-678.
 - 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 of Andrology. *Journal of Andrology* **30**, supp P118. Barcelona, España.
 - Dissen GA y Ojeda SR. (1999). Ovarian Innervation. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 2. Eds. E Knobil y JD Neill. Academic Press. EUA; 583-589.
 - Domínguez R, Chávez R y Cruz ME. (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. Ed. R. Domínguez. PUIS-UNAM. Miguel Ángel Porrúa. México; 163-192.

-
- Domínguez R. (1997). Endocrinología de las Gónadas. En: Curso internacional precongreso. Actualización en fisiología. Ed. SMCF y PUIS-UNAM. México; 271-280.
 - Dusinska M y Collins AR. (2008). The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*. **23**, 191-205.
 - Evans GW y Johnson JE. (1980). Characterization and quantitation of a zinc-binding ligand in human milk. *Pediatric Research*. **14**, 876-880.
 - Fawcett D.W. (1995). Tratado de Histología. 12ª. Interamericana. McGraw-Hill. México. 489-491.
 - Felig P, Broadus AE y Frohman LA. (1981). Mc Graw Hill. México; 719-720.
 - Feng W. (2007). The transport of chromium (III) in the body: Implications for function. En: The Nutritional Biochemistry of Chromium (III). Ed. Vincent J. Elsevier. EUA. 121-138.
 - Fernandez-Pol JA. (1977). Iron: Possible cause of the G₁ arrest induced in NRK cells by picolinic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **78**, 136-143.
 - Fernandez-Pol JA. (1978). Morphological changes induced by picolinic acid in cultured mammalian cells. *Experimental and Molecular Pathology*. **29**, 348-357.
 - Földesi I, Breckwoldt M y Neulen J. (1998). Oestradiol production by lutenized human granulosa cells: evidence of the stimulatory action of recombinant human follicle stimulating hormone. *Human Reproduction*. **13**, 1455-1460.
 - Food and Nutrition Board, Institute 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. Washington DC, EUA.
 - Gammelgaard B, Jensen K, Steffansen B. (1999). *In vitro* metabolism and permeation studies in rat jejunum organic chromium compared to inorganic chromium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **13**, 82-88.
 - Geneser F. (2000). Histología. 3ª. Medica Panamericana. México; 421-427.
 - Gerendai I, Kocsis K y Halász. (2002). Supraspinal connections of the ovary: Structural and functional aspects. *Microscopy Research and Technique*. **59**, 474-483.

-
- Gómez GA y Magaña GP. (2003). Papel del cromo y del cinc en el metabolismo de la insulina. *Revista Medica IMSS*. **42**, 347-352.
 - González MJ, Meseguer I, Martínez MC, Aguilar MV y Bernao A. (2006). Repercusiones del picolinato de cromo en el metabolismo proteico en función de la edad. *Nutrición hospitalaria*. **21**, 709-714.
 - Goldberg GS, Moreno AP y Lampe PD. (2002). Gap Junctions between Cells Expressing Connexin 43 or 32 Show Inverse Permselectivity to Adenosine and ATP. *The journal of biological chemistry*. **277**, 36725–36730.
 - Gore-Langton RE y Armstrong DT. (1994). Follicular steroidogenesis and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E y Neill JD. Raven Press. 2ª edición. NY; 571-627.
 - Govindaraju K, Ramasami T y Ramaswamy D. (1989). Chromium (III)-Insulin Derivatives and their implication in glucosa metabolism. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **35**, 137-147.
 - Grant RS, Coggan SE y Smythe GA. (2009). The physiological action of picolinic acid in the human brain. *International Journal of Tryptophan Research* **2**: 71-79.
 - Greenwald G y Roy S. (1994). Follicular Development and Its Control. In: *The Physiology of Reproduction*. Ed. E Knobil and J.D Neill, Raven Press. NY. 629-724.
 - Guet P, Royere D, Paris A, Lansac J, Driancourt MA. (1999). Aromatase activity of human granulosa cells *in vitro* effects of gonadotrophins and follicular fluid. *Human Reproduction*. **14**, 1182-1189.
 - Guyton AC y Hall JE. (1998). Mc Graw-Hill Interamericana. 6ª edición. México. 651-655 p.p.
 - Hafez E. (1989). Foliculogénesis, maduración del óvulo y ovulación. En: *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 5ª ed. E.S.E. Hafez Interamericana-McGraw-Hill. México. 142-181.
 - Hamel M, Vanselow J, Nicola ES y Price CA. (2005). Androstenedione increases cytochrome p450 aromatase messenger ribonucleic acid transcripts in nonluteinizing bovine granulosa cells. *Molecular Reproduction and Development*. **70**, 175-183.

-
- Havel PJ. (2004). A scientific review: The role of chromium in insulin resistance. *Nutrition* **21**.
 - Henderson K M, McNatty KP, Smith P, Gibb M, O’Keeffe LE, Lun S, Health DA y Prisk D. (1987). Influence of follicular health on the steroidogenic and morphological characteristic of bovine granulosa cells *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*. **79**, 185-193.
 - Hepburn DDD y Vincent JB. (2003a). Tissue and subcellular distribution of chromium picolinate with time after entering the bloodstream. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **94**: 86-93.
 - Hepburn DDD, Burney JM, Woski SA y Vincent JB. (2003b). The nutritional supplement chromium picolinate generates oxidative DNA damage and peroxidized lipids *in vivo*. *Polihedron* **22**, 455-463.
 - Hepburn DDD, Xiao J, Bindom S, Vincent JB y O’Donell JO. (2003c). Nutritional supplement chromium picolinate causes sterility and lethal mutations in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**, 3766-3771.
 - Hinshelwood M. (1999). Steroidogenesis, Overview. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 4. Eds. E Knobil y JD Neill. Academic Press. EUA; 644-653.
 - Jana M, Rajaram A y Rajaram. (2009). Chromium picolinate induced apoptosis of lymphocytes and the signaling mechanism thereof. *Toxicology and applied pharmacology*. **237**, 331-344.
 - Kim BH, Rahman MS, Kim SJ; Lee YD y Takemura A. (2004). Alcohol treatment promotes conversion of testosterone to estradiol-17 β in female tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiology and Biochemistry*. **29**, 263–268.
 - Krey L y Kamel F. (1990). Progesterone modulation of gonadotropin secretion by dispersed rat pituitary cells in culture. I. Basal and gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **68**,85-94.
 - Kyeong-Hoon J y Kaiser UB. (2006). Gonadotropin-Releasing Hormone Regulation of Gonadotropin Biosynthesis and Secretion. En: Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction Vol.1. 6^a ed. Ed. Neill JD, Plant TM, Pfaff DW, Challis JRG, Kretser DM, Richards JS y Wassarman PM. Elsevier. San Diego, EUA. 313-336.

-
- Lamson DW y Plaza SM. (2002). The safety and efficacy of high-dose chromium, Review. *Thorne research*. **7**, 218-235.
 - Levina A y Lay P. (2005). Mechanistic studies of relevance to the biological activities. *Coordination Chemistry Reviews*. **249**, 281–298.
 - Levina A y Lay PA. (2008). Chemical properties and toxicity of chromium (III) Nutritional Supplements. *Chemical Research in Toxicology*. **21**, 563-571.
 - Levina A, Mulyani I y Lay P. (2007). Redox chemistry and biological activities of chromium (III) complexes. En: *The Nutritional Biochemistry of Chromium (III)*. Ed. Vincent J. Elsevier. EUA; 225-256.
 - Lewis B. (2004). GENES VIII. Pearson Prentice Hall. EUA; 1-7.
 - Lien T-F, Wu C-P y Horng Y-M. (2007). Chromium picolinato depressed proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Nutrition Research*. **27**, 176-180.
 - Lindeberg M, Carlström K, Ritvos y Hovatta. (2006). Gonadotrophin stimulation of non-luteinized granulosa cells increases steroid production and the expression of enzymes involved in estrogen and progesterone synthesis. *Human Reproduction*, **22**: 401-406.
 - Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL y Darnell J. (2004). *Molecular Cell Biology*. 5ª ed. Freeman y compañía. EUA.
 - Magoffin DA. (2005). Ovarian theca cell. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **37**, 1344-1349.
 - Mattson MP. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*. **7**, 1–7.
 - McGee EA y Hsueh A. (2000). Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocrine Reviews*. **21**, 200-214.
 - Melvin H.W. (2002). *Nutrición para la salud, la condición física y el deporte*. Editorial Paidotribo. 262-264.
 - Merchant-Larios H y Chimal-Monroy J. (1989). The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. En: *Developments in ultrastructure of reproduction*. Alan R. Liss. 55-63.
 - Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N. (2003). Diferenciación celular durante el

desarrollo de la gónada. En: *Biología Celular y Molecular*. Ed. Jimenez LF y Merchant-Larios H. Pearson Education. 713-737.

- Merillo G, Cox GW, Radzioch y Varesio L. (1993). Picolinic acid, a catabolite of 1-tryptophan, is a costimulus for the induction of reactive nitrogen intermediate production in murine macrophages. *Journal of Immunology*. **150**, 4031-4040.
- Minegishi T, Tsuchiya M, Hirakawa T, Abe K, Inoue K, Mizutani T y Miyamoto K. (2000). Expresion of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in rat granulose cells. *Life Sciences*. **67**, 1015-1024.
- Morales ME, Merchant-Larios H, De la Garza CE, López N. (2006). Gametogénesis. I. Revisión de la literatura, con enfoque en la ovogénesis. *Medicina Universitaria*. **32**, 183-189.
- Nagashunmugam T, Srinivas S y Shanmugam. (1989). Effect of dimethyl sulfoxide on mouse embryo fibroblasts: inhibition of plasminogen activador inhibitor deposition and interference with early events of serum-stimulated growth. *Biology of cell*. **66**, 307-315.
- Ogata S, Inoue K, Iwata K, Okumura K y Taguchi H. (2001). Apoptosis induced by picolinic acid-related compounds in HL-60 cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. **65**, 2337-2339.
- Olivera M, Tarazona A, Ruiz, Giraldo C. (2007). Vías implicadas en la luteólisis bovina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. **20**, 387-393.
- OMS. (2002). Infertility. Report of a meeting on "Medical, Ethical and Social Aspects of Assisted Reproduction" held at WHO headquarters in Geneva. Eds. Vayena E, Rowe PJ y Griffin PD. Ginebra; 396.
- Ortega CC. (2007). Estudio de los efectos de la timulina sobre la liberación de FSH y LH por las células de adenohipófisis en cultivo. Influencia del día del ciclo estral y de los esteroides sexuales. Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM. 64 p.p.
- Parker KL y Schimmer BP. (2006). Embryology and Genetics of the Mammalian Gonads and Ducts. En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction Vol.1. 6ª ed. Ed. Nell JD, Plant TM, Pfaff DW, Challis JRG, Kretser DM, Richards JS y Wassarman PM. Elsevier. San Diego, EUA. 313-336.
- Quinto F. (2009). Pruebas de desempeño para la cuantificación de cromo en semen y

suero por espectrofotometría de absorción atómica electrotrémica con corrector zeeman (ZGFAA). Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM. 99 p.p.

- Rajkovic A, Pangas SA y Matzuk MM. (2006). Follicular development: mouse, sheep, and human models. En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction Vol.1. 6ª ed. Ed. Nell JD, Plant TM, Pfaff DW, Challis JRG, Kretser DM, Richards JS y Wassarman PM. Elsevier. San Diego, EUA. 313-336.
- Rodríguez-Mercado JJ, Mateos-Nava RA, Altamirano-Lozano MA. (2011). DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides in vitro. *Toxicology in Vitro*. En impresión Julio.
- Rosenblum WI y El-sabban F. (1982). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and glycerol, hydroxyl radical scavengers, impair platelet aggregation within and eliminate the accompanying vasodilation of, injured mouse pial arterioles disease. *Stroke*. **13**, 36-39
- Ruddick JP, Evans AK, Nutt DJ, Lightman SL, Rook GWA y Lowry CA. (2006). Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Cambridge University Press*. **8**, 1-27.
- Sadler TW. (2004). Langman Embriología Médica con orientación clínica. 9ª ed. Editorial Médica Panamericana. Argentina; 566.
- Sahmi M, Nicola ES, Silva JM y Price CA. (2004). Expression of 17 β - and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenases and steroidogenic acute regulatory protein in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **223**, 43-54.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz y Linn S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*. **73**, 39-85.
- Saxena S, Meehan D, Coney P y Wimalasena J. (1990). Ethanol has direct inhibitory effects on steroidogenesis in human granulosa cells: specific inhibition of LH action. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. **14**, 522-527.
- Sasseville M, Gagnon MC, Guillemette C Sullivan R, Gilchrist RB y Richard F. (2009). Regulation of gap junctions in porcine cumulus-oocyte complexes: contributions of granulosa cell contact, gonadotropins, and lipid rafts. *Molecular Endocrinology* **23**, 700-710.

-
- Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC, Treier M. (2004). The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development and disease*. **131**, 933-942.
 - Schreiber CA y Barnhart K. (2009). Contraception. En: Yen and Jaffe's Reproductive endocrinology physiology, pathophysiology, and clinical management 6ª ed. Strauss JF y Barbieri RL. Saunders Elsevier. Philadelphia; 155-190.
 - Silverthorn DU. (2007). Fisiología humana, un enfoque integrado. 4ª ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires; 839.
 - Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MW, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Mendelson CR y Bulun SE. (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Reviews*. **15**, 342-355.
 - Speetjens JK, Collins RA, Vincent JB y Woski SA. (1999). The nutritional supplement chromium (III) Tris (picolinate) cleaves DNA. *Chemical Research in Toxicology*. **12**, 483-487.
 - Spicer LI, Alpizar E y Echterkamp SE. (1993). Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa growth factor I production in vitro cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like. *Journal Animal Science*. **71**, 1232-1241.
 - Srinivas S, Sironmani TA y Shanmugam G. (1991). Dimethyl sulfoxide inhibits the expression of early growth-response genes and arrest fibroblast at quiescence. *Experimental cell research*. **196**, 279-286.
 - Stearns DM, Belbruno JJ y Wetterhahn. (1995a). A prediction of chromium (III) accumulation in human chromium dietary supplements. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **9**, 1643-1649.
 - Stearns DM, Wise JP, Patierno SR y Wetterhahn. (1995b). Chromium (III) picolinate produces chromosome damage in chinese ovary cells. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **9**, 1650-1657.
 - Stout MD, Nyska A, Collins BJ, Witt KI, Kissling GE, Malarkey, Hooth MJ. (2009). Chronic toxicity and carcinogenicity studies of chromium picolinate monohydrate administered

- in feed to F344/N rats and B6C3F1 mice for 2 years. *Food and Chemical Toxicology*. **47**, 729-733.
- Strauss JF y Williams CJ. (2009). The ovary life cycle. En: Yen and Jaffe's Reproductive endocrinology physiology, pathophysiology, and clinical management 6ª ed. Strauss JF y Barbieri RL. Saunders Elsevier. Philadelphia; 155-190.
 - Striffer J, Polansky M y Anderson R. (1993). Dietary chromium enhances insulin secretion in perfused rat pancreas. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*. **6**, 75-81.
 - Strömstedt M y Byskov AG. (1999). Oocyte Mammalian. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 3. Eds. E Knobil y JD Neill. Academic Press. EUA; 468-480.
 - Tice R y Vasquez. (1999). Protocol for the application of the pH>13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. *Experimental Cell Research*. **175**, 184-191.
 - Tresguerres JAF y Castillo C. (2005). Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. En: Fisiología Humana. 3ª ed. Mc Graw Hill-Interamericana. Ed. JAF Tresguerres. España; 1007-1023.
 - Udoff LC y Adashi EY. (1999). Infertility. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 2. Eds. E Knobil y JD Neill. Academic Press. EUA; 824-832.
 - Varesio I, Clayton M, Blasi E, Ruffman R y Radzioch D. (1990). Picolinic acid, a catabolite of tryptophan, as the second signal in the activation of IFN- γ -primed macrophages. *The Journal of Immunology*. **145**, 4265-4271.
 - Vincent JB. (2000). The Biochemistry of chromium. *The Journal of Nutrition*. **130**, 715-718.
 - Vincent JB. (2004). Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. *Proceedings of the Nutrition Society*. **63**, 41-47.
 - Wimalasena J, Meehan D, Dostal R y De Silva M. (1993). Selective inhibition of luteinizing hormone action by ethanol in cultures human granulosa cells. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*. **17**, 340-344.
 - Wong KHH y Adashi EY. (1998). Granulosa cells. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 2. Eds. E Knobil y JD Neill. Academic Press. EUA; 569-572.

- Yamamoto A, Wada O y Suzuki H. (1988). Purification and properties of biologically active chromium complex from bovine colostrum. *Journal of Nutrition* 118, 39–45.
- Tomado de Vincent JB. (2004). Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. *Proceedings of the Nutrition Society*. **63**, 41–47.
- Yen J y Adashi E. (2001). El ciclo ovárico. En: Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico. 4ª ed. Samuel S.C. Yen J, Jaffe RB y Barbieri RL. Editorial Médica Panamericana. México; 164-202.
- Zafra-Stone S, Bagchi M, Preuss HG y Bagchi D. (2006). Benefits of chromium (III) complexes in animal and human health. En: The Nutritional Biochemistry of Chromium (III). Ed. Vincent J. Elsevier. EUA; 183-206.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour RM y Nygren K. (2010). Glosario de terminología en Técnicas de Reproducción Asistida. (TRA). *Red Latinoamericana de Reproducción Asistida, Organización Mundial de la Salud*; 11.
- Zhitkovich A, Quievryn G, Messer J y Motylevich Z. (2002). Reductive Activation with Cysteine Represents Chromium (III)-Dependent Pathway in the Induction of Genotoxicity by Carcinogenic Chromium (VI). *Environmental Health Perspectives*. **110**, 729-731.
- http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201_McKinley/f28-4a-_ovary_c.jpg