



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**PARTICIPACIÓN DEL CROMO Y ÁCIDO PICOLÍNICO EN LA RESPUESTA
OVULATORIA DEL RATÓN HEMBRA ADULTO SOMETIDO A LA
INGESTA PROLONGADA DE
PICOLINATO DE CROMO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

JUAN CARLOS MARÍN ESQUIVEL

DIRECTORA DE TESIS

DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO



Ciudad de México

Febrero

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**PARTICIPACIÓN DEL CROMO Y ÁCIDO PICOLÍNICO EN LA
RESPUESTA OVULATORIA DEL RATÓN HEMBRA ADULTO SOMETIDO
A LA INGESTA PROLONGADA
DE PICOLINATO DE CROMO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

JUAN CARLOS MARÍN ESQUIVEL

**DIRECTORA DE TESIS
DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO**

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

**Para la realización de esta tesis se contó con el apoyo de la
DGAPA-PAPIIT clave IN223715, UNAM**



Ciudad de México

Febrero 2017

A mis Padres

Agradecimientos

Doctora Patricia Rosas Saucedo: Gracias por todo el apoyo brindado en la realización de este trabajo, por transmitirme parte de su conocimiento en el desarrollo de mi formación profesional y por todo lo que ha hecho por mí, muchas gracias.

A los miembros del jurado:

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dra. Leticia Morales Ledesma

M. en E.S. María Cristina Alvarado Domínguez

Dra. Juana Monroy Moreno

Por su colaboración, valiosos comentarios y sugerencias en la revisión de esta tesis.

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



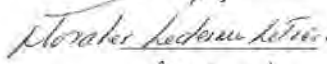


A Ibeth, Karla, Gabriela y Susana, por su gran apoyo en la realización de esta investigación.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
 "ZARAGOZA"
 DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 PRESENTE.**

Comunico a usted que el alumno **MARÍN ESQUIVEL JUAN CARLOS**, con número de cuenta **306097876**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **28 de febrero de 2017** a las **15:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:


- PRESIDENTE** Dra. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN 
- VOCAL** Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO 
- SECRETARIO** Dra. LETICIA MORALES LEDESMA 
- SUPLENTE** M. en E.S. MARÍA CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ 
- SUPLENTE** Dra. JUANA MONROY MORENO 

El título de la tesis que presenta es: **Participación del cromo y ácido picolínico en la respuesta ovulatoria del ratón hembra adulto sometido a la ingesta prolongada de picolinato de cromo.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.


ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 Ciudad de México, a 13 de diciembre de 2016



DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
 DIRECTOR



RECIBI
 OFICINA DE EXÁMENES
 PROFESIONALES Y DE GRADO


 VO. BO.
 M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
 JEFE DE CARRERA

ÍNDICE	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	5
1. Eje Hipotálamo-hipofisario	5
<i>Hipotálamo</i>	5
<i>Hipófisis</i>	6
GnRH-Gonadotropinas	7
2. Ovario	7
<i>Ovogénesis y Desarrollo Folicular</i>	8
<i>Ovulación</i>	11
<i>Cuerpo lúteo</i>	13
<i>Atresia folicular</i>	13
<i>Esteroidogénesis</i>	14
<i>Ciclo estral</i>	17
3. Picolinato de cromo	18
<i>Cromo</i>	19
<i>Ácido picolínico</i>	22
<i>Efectos del picolinato de cromo</i>	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	41
BIBLIOGRAFÍA	42

RESUMEN

El picolinato de cromo (PicCr) es un compuesto formado por un centro crómico (CrIII) rodeado de tres moléculas de ácido picolínico (AcPic). Es ampliamente comercializado como suplemento alimenticio capaz de reducir la grasa corporal y aumentar la masa muscular lo que ha llevado al uso y abuso en su consumo por adultos jóvenes en edad reproductiva.

Se han utilizado diversos sistemas biológicos de prueba que muestran que el PicCr es clastogénico, mutagénico, citotóxico y fetotóxico. En el varón la ingesta de PicCr disminuye la calidad espermática. En el ratón hembra adulto disminuye la respuesta ovulatoria frente al estímulo gonadotrópico.

La mayoría de los efectos del PicCr se atribuyen al centro de CrIII y no a su asociación con el AcPic, no obstante es un compuesto muy estable por lo cual es probable que ingrese integro a la célula y sus efectos se deban a la unión de CrIII y AcPic. Por lo que en el presente trabajo se analizaron los efectos de la ingesta prolongada de PicCr y de cada uno de sus componentes.

Para la realización de este estudio se utilizaron ratones hembra adultos de la cepa CD1 divididos en los siguientes grupos experimentales: testigo, que fueron animales a los cuales no se les realizó ningún tratamiento; PicCr (1.2 µg); aceite de maíz (Vh1) por ser el vehículo del PicCr; CrCl₃ (0.46 µg); AcPic (1.05 µg) y agua destilada (Vh2) por ser el disolvente del CrCl₃ y el AcPic. Cada compuesto se administró por vía oral por 60 días. Se utilizó el PicCr disponible para consumo humano. Los animales se sacrificaron el día del estro vaginal precedido de un proestro y se analizó la respuesta ovulatoria espontánea evaluando la tasa de animales ovulantes (TAO) y la media ± e.e.m. del número de ovocitos liberados. Los animales fueron pesados cada semana hasta el momento del sacrificio.

Los resultados obtenidos muestran que el peso corporal final no se modificó respecto al inicial en ninguno de los grupos experimentales. No se observaron diferencias significativas

entre los grupos Testigo y Vh1. Sin embargo en el grupo tratado con PicCr disminuyó la TAO (60% vs 91%, $p<0.05$) y el número de ovocitos liberados (6.7 ± 2.1 vs 12.6 ± 1.3 , $p<0.05$) comparado con el Vh1. Cuando se compara la respuesta ovulatoria de los grupos tratados con Vh2, AcPic y CrCl_3 , se observa una disminución en los animales sometidos a la ingesta diaria de AcPic que no llega a ser estadísticamente significativa. En comparación con los resultados del tratamiento con PicCr, la tasa de animales ovulantes es mayor en los grupos con AcPic y CrCl_3 (60% vs 86%, 100% respectivamente, $p<0.05$), mientras que la cuota ovulatoria de los animales con AcPic fue similar y la observada con el tratamiento con CrCl_3 fue mayor (6.7 ± 2.1 vs 12.0 ± 1.1 , $p<0.05$).

Estos resultados muestran que la ingesta diaria y prolonga de PicCr disminuye la respuesta ovulatoria espontánea efecto que no es ocasionado por el CrCl_3 o el AcPic de manera independiente.

INTRODUCCIÓN

La fertilidad es la capacidad de concebir y procrear y la infertilidad es la disminución de esta capacidad. A diferencia de ésta última, la esterilidad es la pérdida total de la fertilidad ya que es un estado irreversible (Barbieri, 2001).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la infertilidad como una enfermedad del sistema reproductivo, que es la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales no protegidas (OMS, 2002; Zegers y col., 2009).

La infertilidad es un problema que afecta a millones de personas a nivel mundial, se estima que entre el 8 y 15% de las parejas en el mundo presentan dificultades para concebir en algún momento de su vida reproductiva (OMS, 2002; Cui, 2010). En países como Estados Unidos de América, la infertilidad afecta del 8 al 15% de las parejas en edad reproductiva por lo que se considera un problema de salud pública (Udoff y Adashi, 1999; OMS, 2002).

Las causas de infertilidad se atribuyen en un 40% a factor masculino, 40% a factor femenino y el 20% restante a la combinación de ambos factores o a factor indeterminado (Udoff y Adashi, 1999). A nivel mundial, las principales causas de infertilidad se atribuyen a problemas anatómicos, genéticos, endócrinos, inmunológicos, la exposición a tóxicos ambientales o de origen idiopático (OMS, 2002). Aunado a estos factores de infertilidad, se suma la influencia del contexto socioeconómico, cultural y ambiental. La edad de la mujer es un punto clave, ya que por continuar con su avance profesional, posterga la edad en la que quiere quedar embarazada por primera vez, sin considerar que su índice de fertilidad alcanza su máximo a los 25 años y disminuye bruscamente a los 35 años de edad (Rosas, 2008).

En la actualidad la modernización y el desarrollo urbano han provocado que tanto hombres como mujeres se encuentren sometidos a un ritmo de vida acelerado, propiciando cambios

en los hábitos alimenticios, incrementando así el uso y abuso de suplementos alimenticios. Junto a estos factores la obesidad y los estereotipos de belleza marcan la tendencia a utilizar productos que promueven la quema de grasa y el aumento de la masa muscular, siendo uno de ellos el picolinato de cromo (PicCr). Estas propiedades del PicCr han fomentado que la industria lo incorpore a una gran variedad de productos para bajar de peso, haciendo de él uno de los suplementos alimenticios más populares y de libre acceso a la población.

El PicCr es un compuesto formado por tres moléculas de ácido picolínico (AcPic) y un centro de cromo trivalente (CrIII) (Berner y col., 2004), cuyo consumo se ha cuestionado en los últimos años, ya que se describe como clastogénico, mutagénico y citotóxico, además de comprometer la calidad espermática y disminuir la ovulación inducida por gonadotropinas (Stearns y col., 1995; Hepburn y col., 2003; Jana y col., 2009; Cuapio y col., 2009; Chávez, 2013). Algunos de estos efectos se atribuyen únicamente al CrIII y no al AcPic, por lo cual es importante evaluar en ratones hembra adultos los efectos de la ingesta prolongada de PicCr, CrIII o AcPic sobre la respuesta ovulatoria espontánea y analizar si los cambios en este parámetro se deben al ácido picolínico o al cromo trivalente.

MARCO TEÓRICO

1. Eje hipotálamo-hipofisario

Hipotálamo

El hipotálamo es uno de los componentes subcorticales del sistema límbico. Se encuentra en la porción más inferior del diencefalo, justo por debajo del tálamo, formando la base y parte de las paredes laterales del tercer ventrículo. Es una de las estructuras cerebrales más conservada a lo largo de la evolución y resulta imprescindible para el mantenimiento de la homeostasis (Tresguerres, 2010).

El hipotálamo regula la mayoría de las funciones endócrinas y vegetativas del organismo, además participa en el control de múltiples aspectos de la conducta emocional. Las neuronas hipotalámicas se agrupan formando una serie de núcleos que se encuentran distribuidos en cuatro áreas que en sentido anteroposterior son: 1) hipotálamo anterior o área preóptica, 2) área supraóptica, que está por encima del quiasma óptico, 3) hipotálamo medio o infundíbulo tubárico e 4) hipotálamo posterior o región mamilar, que es la región adyacente al mesencéfalo (Tresguerres, 2010).

En el hipotálamo se sintetizan una serie de hormonas (hipofisiotrópicas) responsables de la regulación, síntesis y liberación de las hormonas hipofisarias, de las cuales las principales son la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la hormona liberadora de tirotropina (TRH), la hormona liberadora de la prolactina (PRH), la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH). Dichas hormonas son empaquetadas en gránulos y transportadas a lo largo de los axones hacia la eminencia media, donde son liberados por exocitosis en capilares del sistema porta hipotálamo-hipofisario (Tresguerres, 2010; Barrett y col., 2013) (Figura 1).

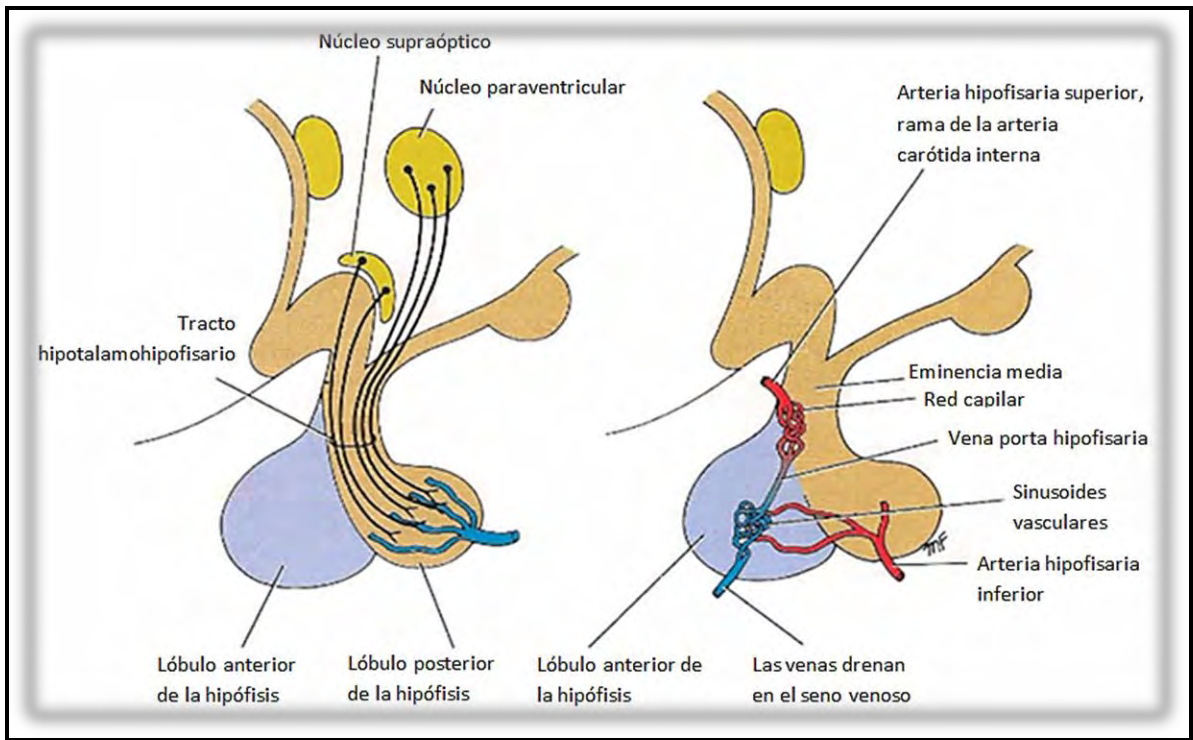


Figura 1. Sistema porta hipotálamo-hipofisario (Tomado y modificado de Snell, 2009).

Hipófisis

La hipófisis es una glándula endócrina conectada al hipotálamo que se encuentra en la superficie interior de la base del cráneo en la fosa hipofisaria del esfenoides. Está constituida por dos partes: 1) adenohipófisis, que es una estructura altamente vascularizada y contiene células glandulares secretoras de hormonas, algunas de las cuales actúan sobre glándulas endócrinas como la tiroides la corteza suprarrenal y las gónadas, 2) neurohipófisis, constituida en gran parte por las terminaciones de los axones provenientes de neuronas ubicadas en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo que sintetizan y liberan oxitocina y vasopresina (Halász, 1999).

La adenohipófisis secreta seis hormonas: la adrenocorticotropina (ACTH) controla la secreción de las hormonas de la corteza suprarrenal, que a su vez regula el metabolismo de

glucosa, proteínas y grasas. La hormona estimulante de la tiroides (TSH) estimula la secreción de tiroxina y triyodotironina en la glándula tiroides, estas hormonas controlan la velocidad de las reacciones químicas intracelulares de todo el organismo. La hormona de crecimiento (GH) actúa sobre todo el organismo estimulando la formación de proteínas y la proliferación y diferenciación celular. La prolactina (PRL) estimula el desarrollo de las glándulas mamarias y la producción de leche. La hormona estimulante de los folículos (FSH) y hormona luteinizante (LH) regulan la función de las gónadas y la síntesis de hormonas sexuales (Barrett y col., 2013).

GnRH-Gonadotropinas

Las neuronas productoras de GnRH se encuentran dispersas por todo el hipotálamo, pero son más abundantes en el núcleo arcuato y el hipotálamo anterior. La GnRH es un decapeptido (pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) y es el responsable de la estimulación de la síntesis y liberación de FSH y LH (Tresguerres y Castillo, 2005). Sin embargo, para que este efecto se produzca es necesario que GnRH se libere al sistema porta de forma pulsátil, lo que depende de la capacidad de las neuronas GnRHérgicas para descargarlo sincronizadamente, constituyendo así el generador de pulsos hipotalámicos. El patrón de secreción pulsátil es uno de los factores responsables de la regulación diferencial de la FSH y LH y resulta fundamental a la hora de regular la glicosilación y, en consecuencia, la actividad biológica de las gonadotropinas (Tresguerres, 2010).

2. Ovario

Los ovarios son las gónadas de la hembra, cuyas funciones son la producción de gametos (ovocitos) y la síntesis de hormonas esteroides como progesterona, andrógenos y estrógenos y de hormonas peptídicas como inhibina, activina y relaxina (Yao y Bahr, 1999; Sánchez, 1999). Ambas funciones están íntimamente relacionadas, ya que la endócrina permite la producción de ovocitos sanos, además de regular el eje hipotálamo-hipofisario

(retroalimentación) y la determinación de las características sexuales por sus acciones en los tejidos periféricos y en el sistema nervioso central (SNC) (Yao y Bahr, 1999; Sánchez, 1999).

En los mamíferos los ovarios son dos órganos que se encuentran alojados uno a cada lado de la cavidad pélvica y están fijados a la superficie posterior del ligamento ancho por medio de un pliegue peritoneal denominado mesovario. El aporte nervioso, vascular y linfático llega por medio de este ligamento, que en conjunto con otras estructuras fibromusculares, mantienen a los ovarios en posición a la entrada de las trompas uterinas y unido al útero (Yao y Bahr, 1999; Sánchez, 1999; Tresguerres y Castillo, 2005).

En el ovario se distinguen tres zonas: la corteza que es la zona más externa del ovario donde se encuentran los folículos; la médula compuesta por tejido conectivo, abundantes vasos sanguíneos, vías linfáticas y fibras nerviosas; y el hilio que es el punto de anclaje del ovario con el mesovario, contiene nervios, vasos sanguíneos y tejido conectivo de sostén (Geneser, 2000; Tresguerres y Castillo, 2005).

Ovogénesis y Desarrollo folicular

Durante el desarrollo embrionario cerca del extremo caudal del embrión en la pared del saco vitelino aparecen las células germinales progenitoras de los gametos o células germinales primordiales (CGP), las cuales migran hacia el primordio gonadal mediante movimientos ameboideos utilizando moléculas de reconocimiento (quimiotaxis) en la matriz extracelular (Merchant-Larios y Moreno-Mendoza, 2003).

Al llegar a su destino las CGP entran en mitosis y se diferencian en ovogonias, las cuales continúan dividiéndose por mitosis incrementando en número. En el ovario fetal inmaduro, las células germinales situadas en la periferia aumentan de tamaño y entran en proceso de meiosis, misma que se interrumpe en la etapa de diploteno de la profase I, en este momento

las ovogonias se transforman en ovocitos primarios (Van Voorhis, 1999; Merchant-Larios y Moreno-Mendoza, 2003).

El ovocito primario permanece en reposo meiótico por el resto de la vida intrauterina incluso años después del nacimiento. Su núcleo es grande y de cromatina fina, contiene un único nucléolo, existe una gran cantidad de mitocondrias próximas al núcleo, el aparato de Golgi está asociado a numerosas vesículas y la cantidad de ribosomas es baja (Merchant-Larios y Moreno-Mendoza, 2003).

La foliculogénesis es el proceso mediante el cual se forman los folículos primordiales. Este proceso se inicia cuando los ovocitos I (20 a 70 μm de diámetro) son rodeados por una capa de células epiteliales planas (foliculares o pregranulosas) y una membrana basal que los separa entre ellos y del resto del ovario, los ovocitos que no son rodeados por las células epiteliales eventualmente degeneran. Estos folículos constituyen la población de reserva, misma que se agota progresivamente durante la vida reproductiva como resultado de dos procesos, la atresia o la entrada a la fase de crecimiento. En la rata y en el ratón, la foliculogénesis comienza y culmina en la primera semana de vida posnatal (Domínguez y col., 1991; Van Voorhis, 1999; Yen, 2001).

Se considera al folículo como la unidad anatómica y funcional del ovario, ya que a partir de esta estructura se originan los tres compartimientos del ovario: a) folicular, formado por todos los folículos en diferentes etapas de desarrollo; b) luteal, formado a partir de las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos que ovularon y c) intersticial, formado por las células de la teca interna de los folículos atrésicos (Domínguez y col., 1991).

El primer signo de crecimiento folicular es el aumento en el tamaño del ovocito I y la conversión de las células aplanadas que lo rodean a células cúbicas (células de la granulosa) y forman un epitelio estratificado con gran capacidad de proliferación y síntesis hormonal,

proceso en el que los estrógenos actúan de manera sinérgica con FSH. El ovocito es separado por una capa de mucopolisacáridos y glucoproteínas sintetizados por el ovocito y las células de la granulosa denominada zona pelúcida. La unidad ahora se denomina folículo primario (Domínguez y col., 1991; Van Voorhis, 1999; Yen, 2001).

El ovocito I comienza a rodearse de siete u ocho capas de células de la granulosa, las células del estroma cerca de la membrana basal se alinean en paralelo entre sí y forman la teca externa y la teca interna. Las células de la teca externa se encuentran más a la periferia del folículo, son morfológicamente más fusiformes y se funden en el estroma circundante. La teca interna es una capa de células altamente vascularizada, con organelos característicos de una célula secretora de esteroides, en particular de andrógenos que sirven de sustrato a las células de la granulosa en la producción de estrógenos. Conforme continúa la multiplicación de las células de la granulosa, comienzan a aparecer pequeñas cavidades llenas de fluido que finalmente se unen y forman el antro folicular. Las células de la granulosa que inmediatamente rodean el ovocito constituyen el *cumulus oophorus* y son desplazadas progresivamente hacia un lado de la cavidad folicular. Este clase de folículo se le llama secundario o antral (Van Voorhis, 1999; Yen, 2001)

Conforme el folículo continúa su crecimiento, las células de la teca interna incrementan la secreción de andrógenos y las células de la granulosa aumentan su proliferación y la capacidad para sintetizar estrógenos, en consecuencia la cavidad folicular crece considerablemente. El folículo se denomina terciario o preovulatorio y se encuentra listo para la ovulación. En la rata, el crecimiento del folículo dura 19 días, desde que pasa de ser un folículo primordial hasta el momento de la ovulación (Domínguez, 1991; Van Voorhis, 1999; Yen, 2001) (Figura 2).

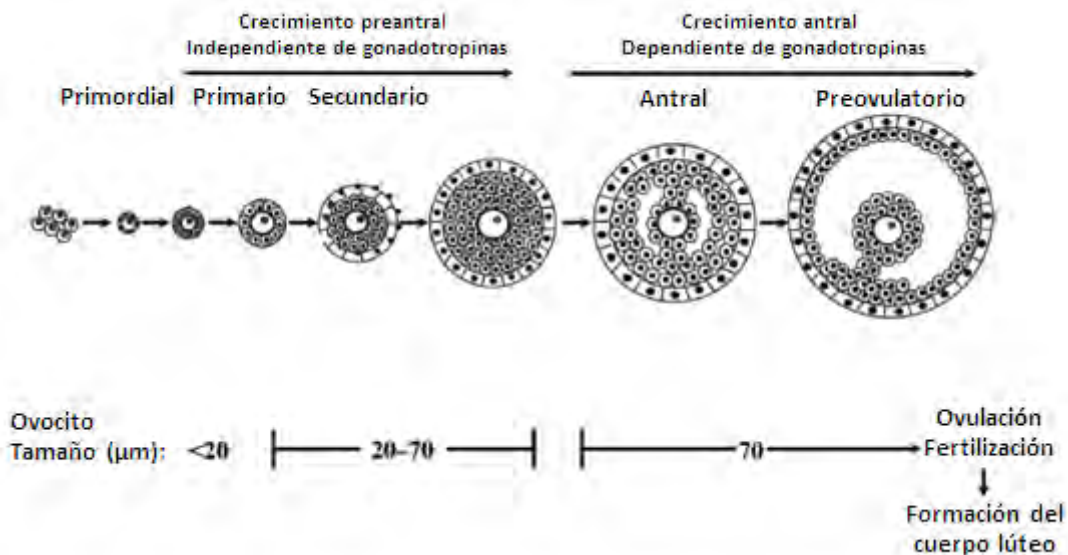


Figura 2. Clasificación de los folículos del ratón. De izquierda a derecha, el desarrollo folicular postnatal comienza de la etapa primordial a la antral. Antes de la formación del antro, el crecimiento folicular es independiente de las gonadotropinas hipofisarias. Después de la ovulación, las células de la granulosa y de la teca experimentan luteinización. Clasificación en base al diámetro de los ovocitos correspondientes a cada tipo (Tomado y modificado de Rajkovic y col., 2006).

Ovulación

Una vez que el folículo ha madurado se producirá su ruptura con la liberación del ovocito junto con las células del *cumulus oophorus*. La liberación del ovocito es un proceso mediado por hormonas. En las últimas etapas del desarrollo folicular, las células de la granulosa bajo la influencia de las altas concentraciones de estrógenos, expresan receptores a LH. Las células de la granulosa ahora sintetizan progesterona, que aunado a las altas concentraciones de estrógenos, incrementan aún más el número de receptores a LH y en la hipófisis promueve la liberación preovulatoria de esta gonadotropina (Espey y Richards, 2006) (Figura 3).

En la expulsión física del ovocito, la LH promueve la liberación y activación de enzimas proteolíticas responsables de la pérdida por una parte de los nexos y desmosomas en las células de la granulosa y de la teca interna y por otra de la degradación de la pared del folículo, lo que conduce a la ruptura y liberación del complejo cúmulo-ovocito (Domínguez y col., 1991; Yen, 2001).

En respuesta al aumento en las concentraciones de LH, el ovocito I completa la primera fase de la meiosis e inicia la segunda división meiótica que se detiene en metafase y se convierte en ovocito II. La segunda fase de la meiosis se reiniciará sólo si el ovocito es fecundado (Domínguez y col., 1991)

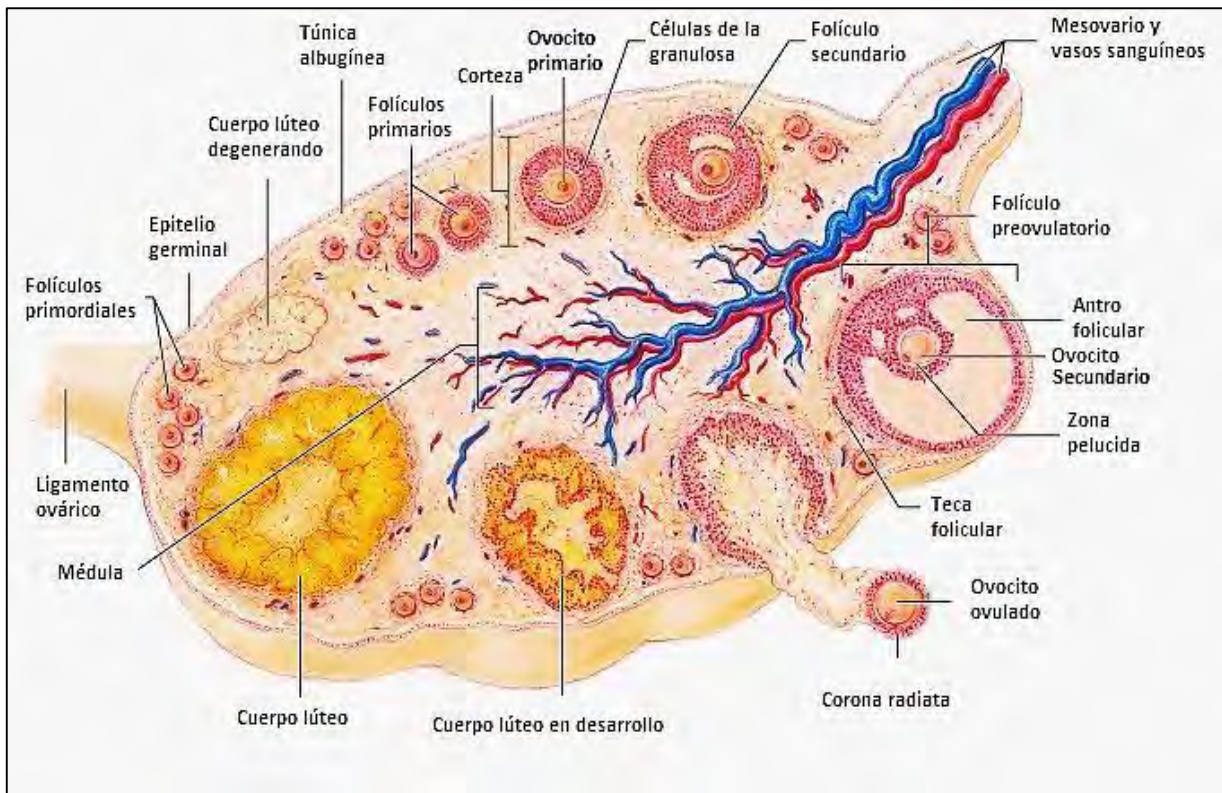


Figura 3. Esquema que muestra la secuencia del crecimiento y desarrollo de un folículo, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Tomado y modificado de: <http://cienciasdejoseleg.blogspot.mx/2014/08/anatomia-de-los-ovarios.html>).

Cuerpo lúteo

El cuerpo lúteo es una glándula endocrina transitoria que se forma en el ovario a partir de las células de la granulosa y de la teca interna del folículo después de la ovulación. Las células de la granulosa crecen de tamaño y se multiplican y las de la teca interna penetran en la cavidad que se genera a la expulsión del ovocito. Las células se denominan células luteínicas de la granulosa y células luteínicas de la teca. El número de cuerpos lúteos que se forman es el mismo que el número de folículos que ovulan (Juengel y col., 1999).

La función del cuerpo lúteo es la síntesis de progesterona que se requiere para la preñez, además en el eje hipotálamo-hipofisario ejerce una retroalimentación negativa para prevenir ovulaciones adicionales y reprimir la receptividad sexual de la hembra. En las hembras, la duración de los ciclos reproductivos (período de una ovulación a la siguiente) está en función de la persistencia del cuerpo lúteo. Si no hay preñez el cuerpo lúteo deja de producir progesterona y degenera con la finalidad de que se produzca una nueva ovulación y el apareamiento (Juengel y col., 1999).

Atresia folicular

Se define atresia folicular como el proceso normal por el cual se eliminan del ovario todo aquellos folículos que, habiendo iniciado el proceso de crecimiento y diferenciación, no ovulan. La atresia ocurre en cualquier etapa del desarrollo folicular, en la vida fetal, prepuberal, puberal y adulta (Domínguez y col., 1991).

El inicio de la atresia folicular parece estar determinado por alteraciones del ovocito, el cual pierde su capacidad para mantener el control metabólico del folículo. Morfológicamente en los folículos atrésicos se distingue la involución del ovocito y el incremento de los espacios intracelulares de las células de la granulosa (descamación). Las células de la granulosa pierden gradualmente los receptores a gonadotropinas, lo que se traduce en la disminución

de la capacidad de aromatización de los andrógenos, por lo que su concentración aumenta dentro y alrededor del folículo. Este fenómeno sería uno de los pasos fundamentales en el desarrollo de la atresia, dado que la capacidad del folículo para mantener la síntesis de estrógenos es primordial para evitarla. Durante el proceso de atresia, también disminuye la capacidad de síntesis de andrógenos por las células tecales, sin embargo éstas mantienen la capacidad de sintetizar progesterona (Domínguez y col., 1991; Oliver y col., 1999; Van Voorhis, 1999).

Durante la atresia folicular, tanto las células de la granulosa como los ovocitos presentan cambios en su morfología. En las etapas iniciales, se observan núcleos picnóticos en algunas células de la granulosa, especialmente en aquellas en contacto con el antro. La picnosis, es la apariencia de núcleos oscuros debido a la fragmentación del material genético. Como consecuencia la proliferación de células de la granulosa es prácticamente inexistente, la muerte celular y la pérdida de la matriz intracelular son visibles. Las células de la granulosa muertas se acumulan en el líquido folicular, hay una evidente ruptura de la membrana basal y los leucocitos comienzan a invadir el folículo (Oliver y col., 1999).

En las etapas finales de la atresia, la contracción folicular progresa hasta la desaparición casi completa del folículo, muy pocas células de la granulosa permanecen en el folículo y se separan más de la membrana basal, eventualmente el ovocito degenera (Oliver y col., 1999).

Esteroidogénesis

Los ovarios sintetizan y liberan pregnenolona, progesterona, 17α -hidroxiprogesterona, dehidroepiandrostenodiona, androstenodiona, testosterona, estrona y 17β -estradiol; estas hormonas esteroides son sintetizadas usando como sustrato al colesterol que se obtiene a partir de tres fuentes: lipoproteínas de baja (LDL) o alta (LDH) densidad que se encuentran en el plasma sanguíneo, el que se sintetiza de *novo* dentro del ovario a partir de acetyl-CoA y

el colesterol que es almacenado en el interior de las células esteroideogénicas en gotitas lipídicas en forma de ésteres. Los principales tipos celulares involucrados en la biosíntesis de esteroides son las células de la granulosa, de la teca y del cuerpo lúteo, ya que poseen el sistema enzimático necesario para realizar este proceso (Hinshelwood, 1999; Tresguerres y Castillo, 2005).

El colesterol es transportado por la proteína reguladora de la esteroideogénesis aguda StAR hacia las membranas mitocondriales, donde comienza la biosíntesis esteroidea con la conversión del colesterol a pregnenolona que es el precursor común de todos los esteroides, esta reacción es catalizada por la enzima P₄₅₀SCC. A partir de este paso la biosíntesis de esteroides puede seguir dos vías, la Δ -4 y la Δ -5 (Hinshelwood, 1999; Tresguerres y Castillo, 2005).

En la vía Δ -4 la pregnenolona es convertida a progesterona por la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD); la progesterona a 17 α -hidroxiprogesterona mediante la enzima 17 α -hidroxilasa y por acción de la C₁₇₋₂₀ liasa, a androstenediona y ésta a su vez es transformada a testosterona por la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) (Hinshelwood, 1999).

La vía Δ -5 se caracteriza por la conversión de pregnenolona a 17 α -hidroxipregnenolona por medio de la enzima 17 α -hidroxilasa. La hormona 17 α -hidroxipregnenolona es transformada a dehidroepiandrosterona (DHEA) por acción de la enzima C₁₇₋₂₀ liasa, que a su vez es convertida a androstenediona por la enzima 3 β -HSD y finalmente la androstenediona es transformada a testosterona por medio de la enzima 17 β -HSD (Hinshelwood, 1999; Tresguerres y Castillo, 2005).

El último paso para la biosíntesis de estrógenos es la aromatización de los andrógenos mediante la enzima P₄₅₀ aromatasa donde la androstenediona es aromatizada a estrona y la testosterona a 17 β -estradiol (Hinshelwood, 1999; Tresguerres y Castillo, 2005) (Figura 4).

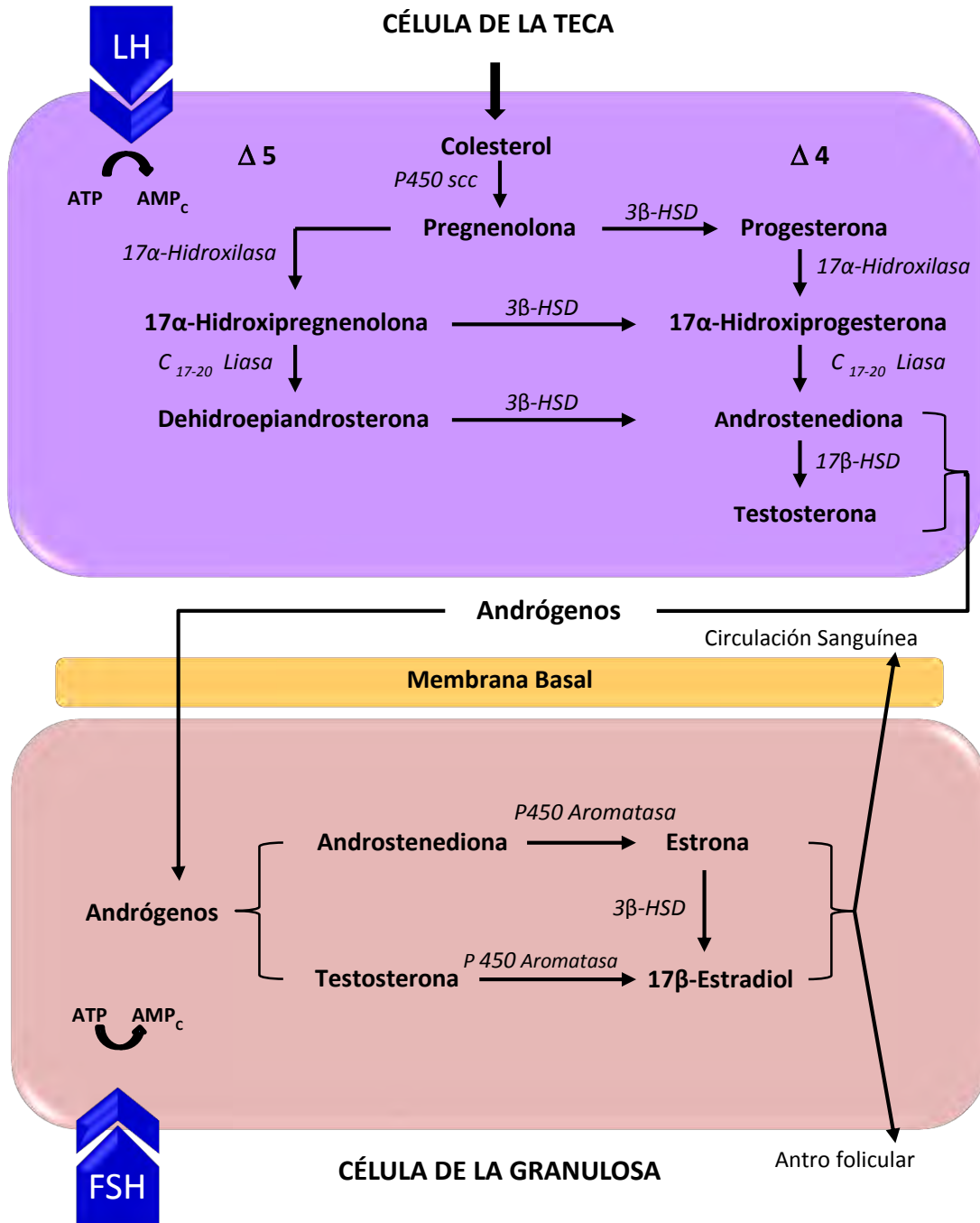


Figura 4. Esquema que muestra las rutas biosintéticas de los esteroides sexuales (Tomado y modificado de Tresguerres, 2010).

Ciclo estral

El ciclo menstrual (primates no humanos y mujer) o ciclo estral (rata, ratón, hámster, cobaya, entre otros) comprende una serie de cambios cíclicos regulares y periódicos a lo largo de la vida reproductiva de la hembra, que preparan al aparato reproductor para la fecundación y la preñez (Sánchez, 1999; Barrett y col., 2013).

El ciclo estral en rata y ratón dura entre 4 y 5 días y puede ser influenciado por factores exteroceptivos como luz y temperatura. Con base en la citología vaginal se divide en cuatro fases: estro, metaestro (diestro-1), diestro (diestro-2) y proestro (Sánchez, 1999; Allen, 2005).

Estro. Es el periodo de celo en el que la hembra presenta los patrones de conducta sexual característicos como la lordosis (curvatura fisiológica de la columna vertebral en la región cervical o lumbar para expresar la disponibilidad sexual); el acercamiento, la monta y la cópula con el macho son permitidos. En esta fase ocurre la ovulación y los ovocitos se encuentran en el oviducto. El folículo que ha liberado el ovocito comienza a estructurarse como cuerpo lúteo, mientras tanto, una nueva serie de folículos primarios comienzan a desarrollarse. En la mucosa vaginal se encuentran numerosas mitosis que desplazan a las capas superficiales (epitelio escamoso y cornificado) que son exfoliadas a la luz de la vagina. La presencia de estas células anucleadas en el frotis vaginal es indicativa del estro y señal probable de ovulación.

Diestro 1. La monta y la cópula con el macho ya no son permitidas. La secreción de progesterona por el cuerpo lúteo y la del estradiol por los folículos inhiben la secreción de gonadotropinas. La vascularización y la motilidad del útero están disminuidas. En el frotis vaginal se aprecia infiltración leucocitaria junto con algunas células cornificadas.

Diestro 2. Durante esta fase tiene lugar la regresión del cuerpo lúteo (luteólisis), siempre y cuando no haya habido fecundación. Mientras tanto, la secreción de estradiol por los folículos en crecimiento sigue aumentando. El útero es pequeño y no contráctil. En la citología vaginal predominan los leucocitos con muy pocas células anucleadas y ocasionalmente células nucleadas.

Proestro. Los folículos han adquirido el tamaño preovulatorio y secretan grandes cantidades de estradiol. Esta hormona ejerce ahora un efecto estimulante (retroalimentación positiva) sobre la secreción de gonadotropinas. La LH induce la ovulación y la transformación del folículo a cuerpo lúteo. El útero por acción del estradiol, se hace extremadamente contráctil y en la mucosa vaginal se observa la presencia de células epiteliales nucleadas.

4. Picolinato de cromo

El PicCr está formado por tres moléculas de ácido picolínico (AcPic) que rodean a un átomo de cromo trivalente (Cr^{III}), con un peso molecular de 418.3 g/mol (Berner y col., 2004) (Figura 5).

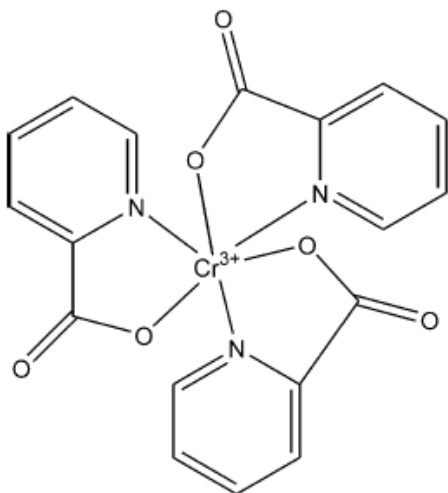


Figura 5. Estructura química del picolinato de cromo (Tomado y modificado de Berner y col., 2004).

Cromo

El cromo es un mineral que existe químicamente en varios estados de oxidación de -2 a +6, siendo el cromo trivalente (CrIII) y el hexavalente (CrVI) las formas con más estabilidad química (Gómez y Magaña, 2003; Havel, 2004).

El CrIII es un elemento esencial requerido de manera natural en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Se encuentra en una gran variedad de alimentos (Tabla 1), por lo que una dieta balanceada aportaría la concentración adecuada de este micronutriente que es de 25 µg/día para mujeres y 35 µg/día para hombres de 19 a 50 años de edad (Anderson, 1997; Food and Nutrition Board, 2002; Gómez y Magaña, 2003; Havel, 2004).

El CrIII es absorbido en el intestino delgado principalmente en el yeyuno, sin embargo el mecanismo de absorción no se conoce con precisión. La deficiencia de este micronutriente está asociada con hiperglucemia, baja tolerancia a la glucosa y concentraciones elevadas de insulina en plasma (Anderson, 1997; Gómez y Magaña, 2003; Berner y col., 2004).

Tabla 1. Contenido de CrIII en algunos alimentos (Tomado de Havel, 2004).

Alimento	Tamaño por porción	Cromo por porción (µg)
Margarina	5 g	0.02-0.1
Leche entera	1 taza	0.1
Mantequilla	5 g	0.1-0.3
Huevos	1	Menos de 0.5
Leche desnatada	1 taza	Menos de 0.5
Zanahorias	1 mediana	0.5
Apio	1 tallo	0.5
Naranja	1	0.5
Pechuga de pollo	85 g	0.5
Queso americano	30 g	0.6
Pescado	85 g	0.6-0.9
Vino tinto	100 ml	0.6-8.5
Pan de trigo entero	1 rebanada	0.8-1.0
Tomate	1 mediano	0.9
Harina de avena	1 taza	0.9 -1.2
Pavo	85 g	0.9-1.7
Plátano	1 mediano	1.0
Champagne	85 ml	1.0-3.3
Arroz blanco	1 taza	1.2
Hojuelas de maíz	1 taza	1.8
Carne de res	85 g	2
Jugo de naranja	1 taza	2.2
Judías verdes	1 taza	2.2
Rosquilla	1	2.6
Levadura de cerveza	30 g	3.3
Galletas de chocolate	4	3.4
Té y café	1 taza	8.0

En 1987 se describe la existencia de un oligopéptido que tiene la capacidad de unirse al cromo al que llamaron cromodulina (Yamamoto y col., 1987). Vincent (2000) propone que después de que la insulina es liberada rápidamente a la circulación (Figura 6a), en respuesta al aumento de las concentraciones de glucosa en sangre, la unión de la insulina a su receptor permite la entrada de iones de CrIII del torrente sanguíneo al interior de la célula mediante la proteína transferrina (endocitosis) (Figura 6b). Cuando el CrIII es liberado en el citoplasma, cuatro iones se unen a la forma inactiva de la cromodulina (apocromodulina) (Figura 6c). La cromodulina se une a la parte interna del receptor de insulina e induce un cambio conformacional (Figura 6d). El complejo insulina-receptor-cromodulina activa la región tirosina cinasa en la subunidad β del receptor creando un sistema de autoamplificación de la señal de insulina.

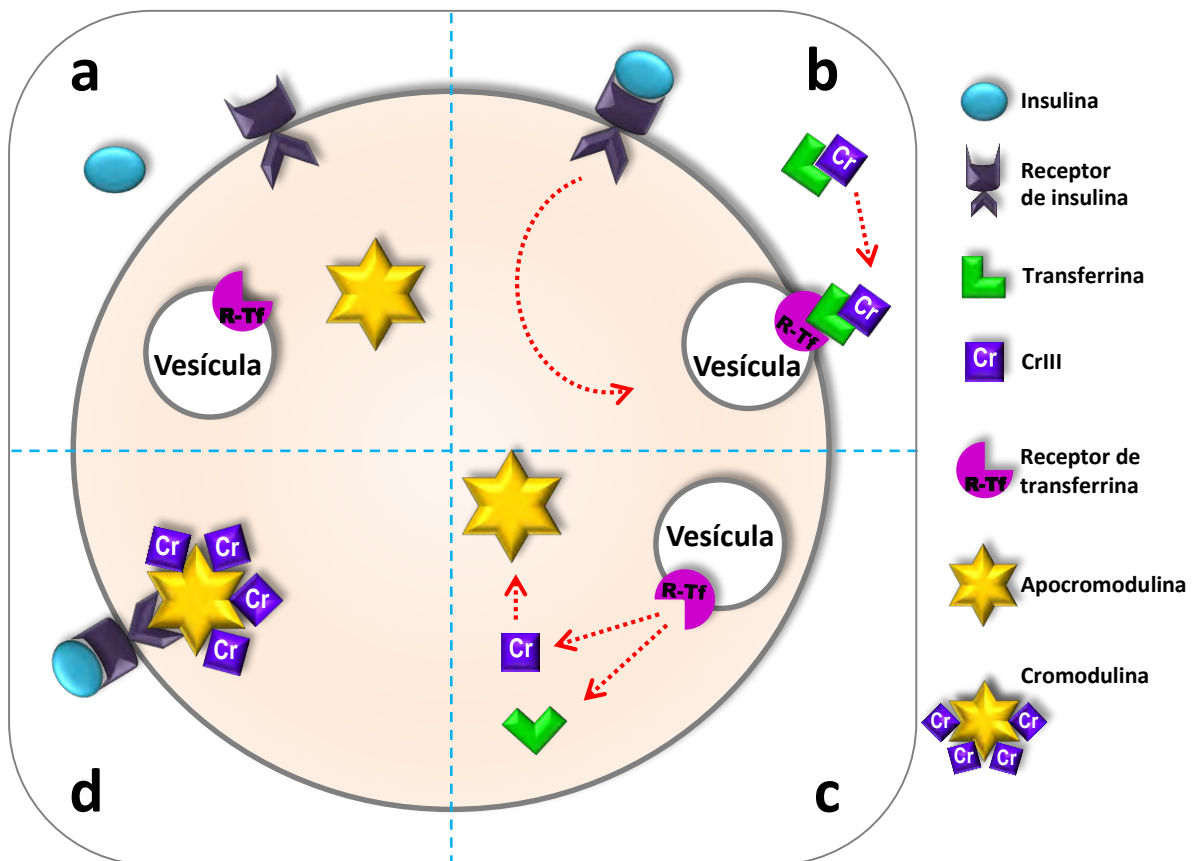


Figura 6. Esquema que muestra el mecanismo propuesto para el ingreso de CrIII presente en la sangre al interior de la célula y la formación de cromodulina (Tomado y modificado de Vincent, 2000).

El CrIII es almacenado en riñón, hígado músculo, bazo, corazón, páncreas y hueso. Este elemento es excretado por el riñón y en menores cantidades en el sudor, heces y cabello (Gómez y Magaña, 2003; Hepburn y Vincent, 2003).

La acción que ejerce el CrIII sobre el metabolismo de grasas y carbohidratos ha conducido al consumo de este elemento en forma de suplementos alimenticios, tal es el caso del PicCr, un compuesto que se comercializa ampliamente por su capacidad para reducir la grasa corporal y aumentar la masa muscular por la acción que ejerce sobre la insulina. Los efectos de la amplificación de la señal de la insulina son: mayor incorporación de glucosa, lípidos y aminoácidos al interior de la célula. El PicCr es una formulación que permite la absorción del CrIII de una manera más eficiente (2-5 %) en comparación con lo que se absorbe a partir de la dieta (0.5-2%) (Anderson y col., 1996; Anderson y col., 1997; Anderson, 1998; Hepburn y col., 2003).

Ácido picolínico

El ácido picolínico (AcPic) es un isómero del ácido nicotínico (Fernandez-Pol y col., 1977; Evans y Johnson, 1980). Existen diferentes sinónimos para nombrar este compuesto tales como piridina-2 carboxílico, 2-ácido piridina carbixílico, o-ácido piridina carboxílico y α -ácido piridincarboxílico (Grant y col., 2009).

El AcPic es ampliamente investigado por su característica física de agente quelante de metales pesados como el zinc y fierro. Es considerado un ingrediente no activo que permite a solubilizar los metales por la formación de un complejo de quelato. Se ha detectado la presencia de AcPic en una gran variedad de fluidos biológicos como el plasma sanguíneo, líquido cefalorraquídeo, homogenado intestinal, jugo pancreático y leche materna (Fernandez-Pol y col., 1977; Evans y Johnson, 1980; Grant y col., 2009). Se sintetiza a partir del aminoácido L-triptófano a través de la vía de la kinurenina o kinuramina (Grant y col., 2009).

Tabla 2. Concentraciones endógenas de ácido picolínico (Grant y col., 2009).

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

En el cultivo de células de riñón de rata, la adición de ácido picolínico en concentraciones suprafisiológicas (2.5 y 3 mM) inhibe la proliferación y altera la morfología celular induciendo cambios en el patrón de distribución de los elementos del citoesqueleto; los microfilamentos y microtúbulos se alinean en paralelo tomando las células una forma fusiforme y aplanada (Fernandez-Pol y col., 1977; Fernandez-Pol, 1978).

El AcPic estimula al sistema inmunológico al potenciar *in vitro* la función de los macrófagos, ya que estimula la producción de ácido nítrico en acción sinérgica con el interferón- γ (IFN- γ) (Melillo y col., 1993). También tiene efectos antivirales al ejercer actividad citotóxica en la células infectadas y promover la apoptosis de las mismas (Grant y col., 2009).

En el cultivo de células de ovario de hámster chino, el AcPic (1.5 a 2.0 mM) induce la ruptura de los cromosomas (efecto clastogénico) (Stearns y col., 1995).

En el cultivo de células de leucemia de humano (HL-60), el tratamiento con 5 mM de AcPic por 24 horas induce apoptosis, efecto que no se observa cuando se utilizan concentraciones menores (0.1 y 0.5 mM) (Ogata y col., 2001).

La adición de AcPic (227.76 µg/Kg de medio) en el alimento de *Drosophila melanogaster*, induce el retraso en el estadio de pupa y de eclosión (Hepburn y col., 2003).

En linfocitos de humano en cultivo el tratamiento con AcPic (300 µM) por 48 ó 72 h disminuye la viabilidad celular y la síntesis de ADN (Jana y col., 2009).

Efectos del picolinato de cromo

El consumo de PicCr es un tema controversial. Estudios realizados con diversos modelos biológicos han mostrado que provoca daño a diferentes niveles:

En el cultivo de células de ovario de hámster chino, el PicCr induce daño clastogénico por su capacidad de inducir aberraciones cromosómicas (Stearns y col., 1995).

En la rata, la inyección intravenosa de PicCr por 60 días, provoca aumento significativo en la orina de la concentración de 8-hidroxideoxiguanosina, un marcador del daño oxidante en el ADN (Hepburn y col., 2003).

En estudios de genotoxicidad utilizando como modelo biológico a la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, se observó que la adición de PicCr en el alimento en concentraciones equivalentes a la recomendada para consumo humano, induce retraso en el estadio de pupa y eclosión e incrementa la tasa de mutaciones letales y la frecuencia de hembras estériles (Hepburn y col., 2003).

En linfocitos de humano en cultivo, el PicCr disminuye la viabilidad celular y la síntesis de ADN e incrementa el daño oxidante, la fragmentación del ADN y la apoptosis, cuando se administra en concentraciones que van de 5 a 150 µM. Estos efectos se atribuyen al centro crómico y no a su asociación con el AcPic, sin embargo a mayores concentraciones el daño es causado por ambos componentes (Jana y col., 2009).

En varones adultos sanos en edad reproductiva, la ingesta diaria de 200 µg de PicCr por 21 días disminuye la vitalidad y la movilidad espermática y aumenta el porcentaje de espermatozoides con alteraciones morfológicas, parámetros que son relevantes en la fertilidad masculina (Cuapio y col., 2009).

En el cultivo de células de la granulosa de mujer, el PicCr induce aumento de la secreción de estradiol y progesterona y provoca el incremento de células con ADN fragmentado (Ortega, 2011).

En ratones hembra preñados el consumo de 200 mg/Kg/día de PicCr del día 6 al 17 de gestación, mostró que el PicCr provoca alteraciones morfológicas en el desarrollo de los fetos tales como bifurcación del arco cervical (Bailey y col., 2006). Los fetos de ratones hembra que fueron consumidores de PicCr antes de la preñez, presentaron incremento en la frecuencia de anomalías esqueléticas como falta de osificación en cabeza, extremidades, cola y esternones (Chávez, 2013).

En el ratón hembra adulto, la ingesta de PicCr disminuye la frecuencia de animales que ovulan en respuesta a la estimulación con la gonadotropina coriónica equina (eCG) y la gonadotropina coriónica humana (hCG), sin embargo no modifica el número de ovocitos que liberan (Chávez, 2013).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El PicCr es una forma biológicamente activa del CrIII, que se comercializa como un suplemento alimenticio capaz de reducir la grasa corporal y aumentar la masa muscular, propiedades que lo han popularizado ampliamente entre los jóvenes en edad reproductiva.

Sin embargo, se ha descrito en diferentes modelos biológicos que el PicCr actúa como agente, clastogénico, mutagénico, citotóxico, fetotóxico y disruptor endócrino. Además compromete la calidad espermática en varones y disminuye la respuesta ovulatoria frente al estímulo gonadotrópico exógeno en el ratón hembra. La mayoría de los estudios realizados con PicCr atribuyen sus efectos al CrIII y no a su asociación con el AcPic.

Con base en lo anterior, en el presente estudio se analizaron los efectos de la ingesta prolongada y excesiva de PicCr y de cada uno de sus componentes (CrIII y AcPic), sobre la respuesta ovulatoria espontánea del ratón hembra adulto.

HIPÓTESIS

Dado que en el ratón hembra adulto la ingesta prolongada de picolinato de cromo disminuye la tasa de animales que ovulan en respuesta al estímulo gonadotrópico exógeno, pero no la cuota ovulatoria, entonces sin este estímulo exógeno disminuirá tanto la frecuencia de animales que ovulan como el número de ovocitos que liberan. Debido a que el PicCr es una molécula muy estable, los efectos del CrIII y AcPic sobre la respuesta ovulatoria no serán reflejo de los provocados por el compuesto.

OBJETIVOS

- Analizar los efectos de la ingesta prolongada de PicCr, AcPic y CrIII, sobre el peso corporal del ratón hembra adulto.
- Estudiar en el ratón hembra adulto los efectos de la ingesta prolongada de 1.2 µg de PicCr sobre la respuesta ovulatoria espontánea.
- Analizar los efectos de la ingesta prolongada de AcPic o CrIII, en las concentraciones equivalentes a las presentes en 1.2 µg de PicCr, sobre la respuesta ovulatoria espontánea del ratón hembra adulto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones hembra vírgenes adultos de 3 meses de edad de la cepa CD1 (Harlan, México), mantenidos en condiciones convencionales de bioterio, con fotoperiodo de 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 5:00 a 19:00 h), humedad relativa del 40%, temperatura de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ y libre acceso al agua y al alimento.

Administración oral de PicCr, AcPic y CrIII

Se utilizó el PicCr disponible comercialmente para consumo humano (General Nutrition Center [GNC]), en tabletas de 550 mg con 200 μg de PicCr cada una (dosis diaria recomendada para el humano con peso corporal promedio de 60 Kg) (Gómez y Magaña, 2003; Havel, 2004), que equivale a 0.12 $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$. Con la finalidad de emular el abuso en el consumo de este suplemento, se administraron 1.2 μg de PicCr/ratón/día que corresponde a 10 veces más la dosis recomendada para consumo humano.

Las concentraciones de AcPic y CrIII utilizadas se obtuvieron considerando el peso molecular del PicCr (418.3 g/mol) y la proporción de 3:1, resultando de 12.4% para el CrIII en forma de CrCl_3 y de 87.6% para el AcPic, teniendo como base 1.2 μg de PicCr (Stearns y col., 1995).

Las tabletas de PicCr se pulverizaron en un mortero y se suspendieron en aceite de maíz (vehículo [Vh1]). El AcPic y el CrCl_3 se disolvieron en agua destilada (Vh2).

Diseño experimental

Los animales se dividieron en los siguientes grupos experimentales: **testigo**, animales sin tratamiento alguno; **PicCr**, animales tratados con 1.2 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ de Vh1/ratón/día; **AcPic**,

animales tratados con 1.05 µg/50 µl de Vh2/ratón/día; **CrCl₃**, animales tratados con 0.455 µg/50 µl de Vh2/ratón/día (CrIII=0.15 µg); **Vh1**, animales a los que sólo se les dieron 50 µl de aceite de maíz ratón/día; **Vh2**; animales con administración de 50 µl de agua destilada/ratón/día.

Los tratamientos se aplicaron vía oral por 60 días (3 ciclos ováricos) con la ayuda de un combitubo eppendorf de 2.5 ml acoplado a un repipeteador (Eppendorf). La administración de los compuestos se realizó diariamente entre las 10:00 y 11:00 h. Los animales fueron pesados cada semana hasta el momento del sacrificio.

Sacrificio y Autopsia

A todos los animales, seis días antes de finalizar el tratamiento, se les realizó la toma diaria de frotis vaginales. Cuando se observó un estro precedido de proestro, los animales se sacrificaron por sobredosis de éter. A la autopsia se buscó en los oviductos la presencia de ovocitos y se contaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

Análisis estadístico

Los datos del peso corporal y número de ovocitos liberados se expresaron como la media±e.e.m. El peso corporal se analizó por la prueba de “t” de Student y el número de ovocitos liberados por la prueba U de Mann Whitney.

La tasa de animales ovulantes (TAO) se calculó de la siguiente manera:

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

Y se analizó utilizando la prueba exacta de Fisher (GraphPad InStat Software). Se consideraron como significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor a 0.05.

RESULTADOS

Peso corporal

El peso corporal al finalizar los tratamientos no mostró diferencias significativas respecto al peso inicial en ninguno de los grupos experimentales (Figura 7).

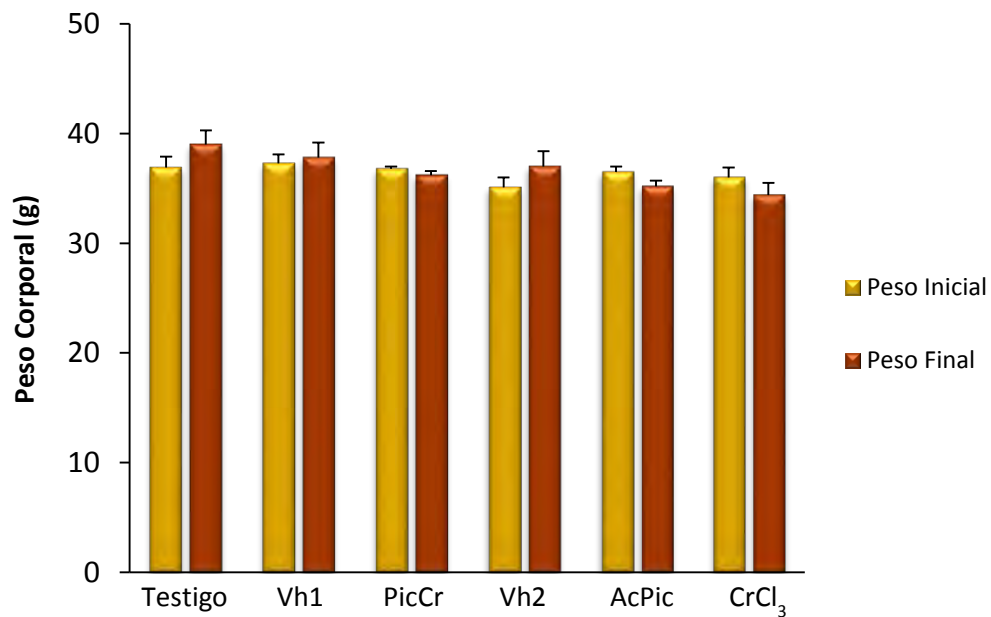
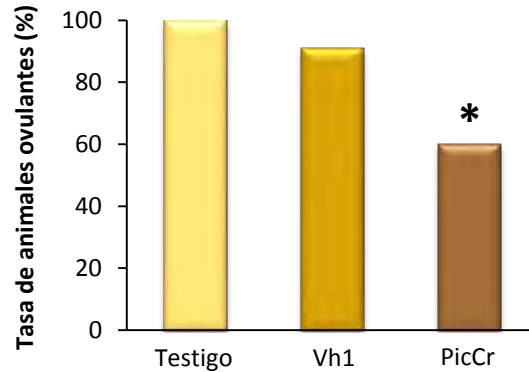


Figura 7. Media \pm e.e.m. del peso corporal (g) inicial y final de ratones hembra adultos sin tratamiento (testigo) o sometidos a la ingesta de Vh1 (aceite de maíz), PicCr (1.2 μ g), Vh2 (agua), de AcPic (1.05 μ g) y CrCl₃ (0.46 μ g) por 60 días.

Efecto de la ingesta de 1.2 μg de PicCr sobre la respuesta ovulatoria espontánea

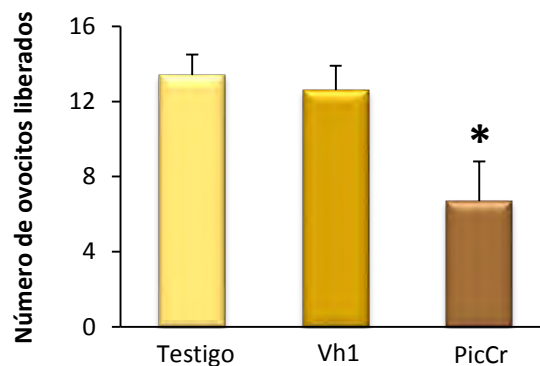
La tasa de animales ovulantes entre el grupo testigo y Vh1 no mostró diferencias significativas, mientras que el grupo con PicCr fue significativamente menor a ambos (Figura 8).



* $p < 0.05$ vs Testigo y Vh1 (Prueba exacta de Fisher)

Figura 8. Tasa de animales ovulantes de ratones adultos sin tratamiento (testigo) o sometidos a la ingesta de Vh1 (aceite de maíz), PicCr (1.2 μg), por 60 días y sacrificados en estro vaginal.

El número de ovocitos liberados fue similar en los grupos testigo y Vh1. Comparando con estos grupos, los animales tratados con PicCr presentaron disminución significativa de la cuota ovulatoria (Figura 9).



* $p < 0.05$ vs Testigo y Vh1 (Prueba de "U" de Mann Whitney)

Figura 9. Media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados por ratones hembra adultos sin tratamiento (testigo) o tratados con Vh1 (aceite de maíz) o PicCr (1.2 μg), por 60 días y sacrificados en estro vaginal.

Efecto de la ingesta de AcPic o CrCl₃ sobre la respuesta ovulatoria espontánea

La tasa de animales ovulantes de ratones hembra adultos sometidos a la ingesta de Vh2 (agua), AcPic o CrCl₃, no muestra diferencias significativas (Figura10).

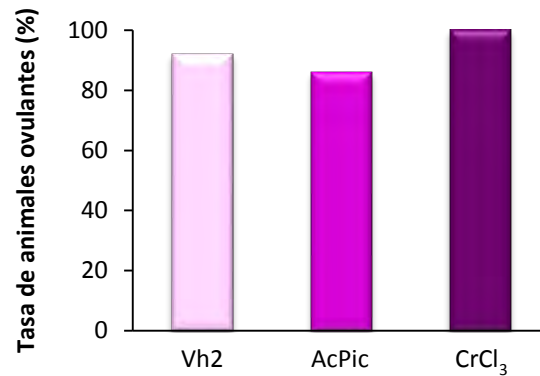


Figura 10. Tasa de animales ovulantes de ratones hembra adultos tratados con Vh2 (agua), AcPic (1.05 µg) o CrCl₃ (0.46 µg), por 60 días y sacrificados en estro vaginal.

El número de ovocitos liberados fue similar en los grupos Vh2, AcPic y CrCl₃ aunque el grupo tratado con AcPic tiende a disminuir la cuota ovulatoria no alcanza valores significativos (Figura 11).

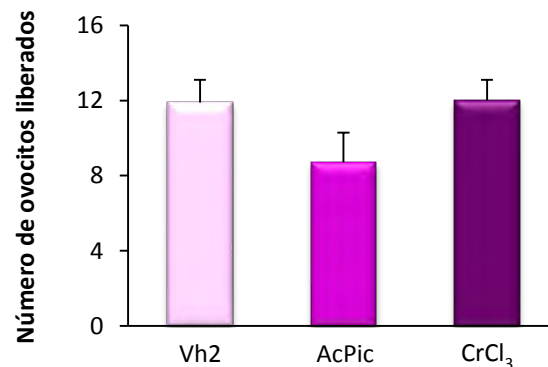


Figura 11. Media ± e.e.m. del número de ovocitos liberados por ratones hembra adultos tratados con Vh2 (agua), AcPic (1.05 µg) o CrCl₃ (0.46 µg), por 60 días y sacrificados en estro vaginal.

Efectos del PicCr, AcPic y CrCl₃ en la respuesta ovulatoria

La tasa de animales ovulantes entre los grupos tratados con AcPic y CrCl₃ no mostraron diferencias significativas. Con ambos tratamientos la frecuencia de ovulantes fue significativamente mayor que la observada en los animales sometidos a la ingesta de PicCr (Figura 12).

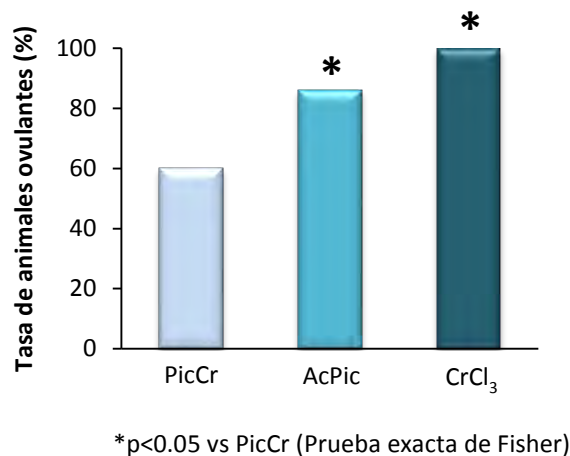


Figura 12. Tasa de animales ovulantes de ratones hembra adultos tratados con PicCr (1.2 µg), AcPic (1.05 µg) o CrCl₃ (0.46 µg), por 60 días y sacrificados en estro vaginal.

El número de ovocitos liberados por animal ovulante, no mostró diferencias entre el tratamiento con AcPic y el tratamiento con CrCl₃. Sin embargo, la cuota ovulatoria fue significativamente mayor en el grupo tratado CrCl₃ respecto al de PicCr (Figura 13).

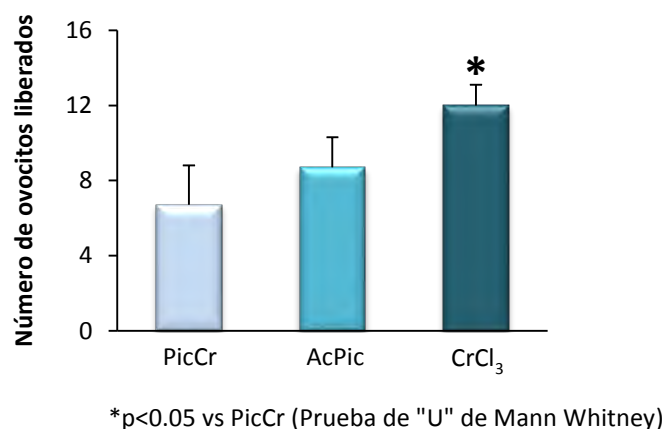


Figura 13. Media ± e.e.m. del número de ovocitos liberados por ratones hembra adultos tratados con PicCr (1.2 µg), AcPic (1.05 µg) o CrCl₃ (0.46 µg), por 60 días y sacrificados en estro vaginal.

DISCUSIÓN

Los resultados muestran que la ingesta prolongada de PicCr disminuye la respuesta ovulatoria espontánea, efecto que no es causado por el AcPic o el CrIII de manera independiente. Sin embargo, la cuota ovulatoria de los animales que consumieron AcPic fue más cercana a la observada con el tratamiento con el suplemento.

El consumo de suplementos alimenticios a base de CrIII se ha popularizado por sus características para la pérdida de peso y reducción de grasa corporal, especialmente entre quienes se integran a programas de reducción de peso. Sin embargo hasta el momento no existen evidencias que indiquen que los suplementos que contienen CrIII incrementen la masa muscular a un grado mayor al que se produce con una dieta saludable y ejercicio físico (Caffaratti y Briñon, 2005). En el año 2009 Stout y colaboradores, mostraron que la adición de PicCr a la dieta diaria de ratas y ratones adultos de ambos sexos, en concentraciones que van de la recomendada para consumo humano, hasta cinco veces más y por un periodo de dos años, no modificó el peso corporal a lo largo del estudio. Resultados similares obtuvieron Chávez (2013) y Espinosa (2016) al someter ratones hembra adultos a la ingesta diaria de PicCr por 60 días. En cuanto a los efectos del CrIII y el AcPic, Mackenzie y colaboradores (1958) observaron en ratas adultas que la administración de 25 ppm de CrCl_3 por doce meses no modifica el peso corporal. Estos hallazgos fueron corroborados en 1998 por la United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). Stout y col. (2009) mostraron que la suplementación con 2000, 10000 y 50000 ppm de AcPic a ratas y ratones adultos de ambos sexos durante dos años no tiene efectos sobre la composición corporal. En nuestros resultados tampoco se observaron cambios en el peso corporal a lo largo de la ingesta de PicCr, CrCl_3 o AcPic considerando tanto los datos semanales como el peso al inicio y al término de los tratamientos, lo que aunado a las evidencias anteriores, permiten sugerir que ni el PicCr ni sus componentes CrIII y AcPic en forma libre inducen cambios sobre la composición corporal.

El éxito reproductivo de los mamíferos depende en gran parte de la función del eje hipotálamo-hipofisis-gónadas. En las hembras, el ciclo estral o menstrual refleja los cambios que ocurren entre las concentraciones de las gonadotropinas y las hormonas secretadas por el ovario. En la rata y el ratón el ciclo estral tiene una duración promedio de 4 a 5 días, donde cada día la citología vaginal indica los cambios hormonales que ocurren y que culminan con la ovulación el día del estro (Marcondes y col., 2002; Allen, 2005; Caligioni, 2009). En este estudio el seguimiento del ciclo estral en los ratones sometidos a la ingesta prolongada de PicCr, AcPic o CrCl₃ permitió analizar sus efectos sobre la respuesta ovulatoria espontánea al tener como condición predictiva de la ovulación un estro vaginal precedido de proestro.

Estudios *in vitro* muestran que la comunicación entre las células de la granulosa y el ovocito es esencial para el crecimiento normal del ovocito en los folículos primarios; la muerte del ovocito induce apoptosis de las células de la granulosa, lo que resulta en atresia folicular (Tsafriri, 1997; Hsueh y col., 2000). Ortega en el 2011, muestra en cultivo de células de la granulosa de mujer, que la adición de PicCr en concentraciones que van desde la dosis recomendada para el humano hasta 10 veces más, daña la integridad del ADN evaluada por el ensayo cometa (Collins y col., 2008). También se ha mostrado en linfocitos de humano en cultivo, que el agregado de PicCr promueve la apoptosis, disminuye la síntesis de ADN y la proliferación celular (Jana y col., 2009). Estas evidencias permiten sugerir que la reducción de la respuesta ovulatoria observada en este estudio por la ingesta de 1.2 µg de PicCr puede estar asociada con daño al ADN tanto de las células de la granulosa como del propio ovocito, lo que podría resultar en un aumento de la frecuencia de folículos atrésicos.

En ratones sometidos a la ingesta prolongada de PicCr y estimulados con eCG y hCG, disminuye la frecuencia de animales que ovulan pero la cuota ovulatoria no se modifica (Chávez, 2013). En el ovario de los roedores la eCG previene la entrada de los folículos a la atresia o los rescata de la misma, por lo que los autores proponen que el tratamiento con dosis altas de eCG provoca el reclutamiento de un mayor número de folículos sanos, que

llegan a la ovulación bajo el estímulo de hCG (Peters y col., 1975; García, 1997; Prieto, 2002). Nuestros resultados muestran que el PicCr en la concentración de 10 veces más la recomendada para consumo humano y administrada por tiempos prolongados (3 ciclos ováricos) disminuye la frecuencia de animales que ovulan así como el número de ovocitos que liberan, con lo que se puede sugerir que la estimulación gonadotrópica exógena enmascaró los efectos del PicCr sobre la cuota ovulatoria al rescatar a los folículos de la atresia.

Otra posible explicación a la disminución de la respuesta ovulatoria de las hembras tratadas con PicCr podría ser el efecto de disruptor endócrino (sustancia o mezcla exógena capaz de alterar el equilibrio del sistema endocrino y causar efectos adversos en la salud de un organismo) descrito para el cromo y otros metales como el arsénico, cadmio, mercurio y plomo (Mendola y col., 2008; Chichizola y col., 2009; Lavicoli y col., 2009; Bergman y col., 2012). Los resultados obtenidos por Ortega (2011) sobre los efectos del PicCr en la esteroidogénesis *in vitro* de las células de la granulosa de mujer apoyan esta interpretación, ya que este suplemento estimula la secreción de estradiol y progesterona tanto basal como estimulada con FSH, lo que se traduciría en un desbalance hormonal que podría estar comprometiendo la ovulación.

Se ha descrito que el PicCr es clastogénico, mutagénico y citotóxico, además de inducir alteraciones esqueléticas en fetos de ratón de madres que consumieron el suplemento durante la preñez (Stearns y col., 1995; Hepburn y col., 2003; Bailey y col., 2006; Jana y col., 2009). En la mayoría de estos estudios los efectos del PicCr se atribuyen al centro crómico y no a su asociación con el AcPic. Sin embargo se ha mostrado que el CrIII en forma de CrCl_3 no induce ninguno de estos efectos (Stearns y col., 1995; Hepburn y col., 2003; Bailey y col., 2006). La biodisponibilidad del CrIII es mayor cuando se encuentra asociado al AcPic en comparación con lo que se absorbe en la dieta (2-5% y 0.5-2% respectivamente) (Gargas y col., 1994; Anderson y col., 1996) o en forma de sal unido a cloro (0.4%) (Anderson y col.,

1983). La baja biodisponibilidad del CrIII en forma de CrCl_3 probablemente está vinculada con la solubilidad del compuesto, de manera que al disociarse y liberar al ión, éste tendría la posibilidad de ingresar a la célula insulino-dependiente por endocitosis vía la transferrina descrita por Vincent (2000, 2001). El hecho que la ingesta diaria de CrCl_3 no modificó la frecuencia de animales que ovulan ni la cuota ovulatoria, indica que el CrIII en forma libre no es el responsable de la disminución de estos parámetros observada con el consumo de PicCr.

Se ha identificado al PicCr como un compuesto hidrófobo, lipófilo y de carga neutra, lo que le permite atravesar las barreras hidrofóbicas como es la membrana plasmática (Speetjens y col., 1999; Kareus y col., 2001). Hepburn y Vincent, (2003) han mostrado en ratas que el PicCr administrado por vía intravenosa tiene una vida media de 30 minutos en el torrente sanguíneo, ingresa intacto a órganos como hígado, riñón y músculo esquelético, en donde se distribuye principalmente en citosol, núcleo y mitocondrias. Dentro del tejido el PicCr se disocia y libera al CrIII, el cual se une a la apocromodulina y forma cromodulina. Una vez que interactúa esta última con el receptor de insulina, es eliminada en la orina. No obstante múltiples inyecciones del suplemento dan lugar a la acumulación del CrIII en los tejidos, probablemente en forma de PicCr, por lo que se ha sugerido que la cromodulina excretada en orina pueda estar generando a partir de la pérdida del centro cromo del suplemento almacenado en los tejidos (Vincent, 2000; Hepburn y Vincent, 2003). Con base en lo anterior una posible explicación a la disminución de la respuesta ovulatoria por la administración prolongada de altas dosis de PicCr, sería la probable acumulación intracelular de CrIII en forma de PicCr, la pérdida del equilibrio del sistema de ingreso mediado por insulina y la eliminación del complejo cromodulina.

Se ha descrito que el AcPic es clastogénico (Stearns y col., 1995), reduce la proliferación celular y la síntesis de ADN y modifica la conformación del citoesqueleto (Fernandez-Pol y col., 1977; Fernandez-Pol, 1978; Jana y col., 2009). Los tratamientos con AcPic sólo afectaron la cuota ovulatoria de manera similar a lo observado con la administración de PicCr. Este

hecho apoya la interpretación de que el daño al ADN tanto del ovocito como de las células de la granulosa resultaría en el aumento de folículos atrésicos y por ende disminución de la ovulación (Tsafiriri y col., 1997; Hsueh y col., 2000). Sin embargo no se puede descartar un posible efecto sobre la proliferación de las células de la granulosa y el ciclo celular.

Ortega (2011), muestra en células de la granulosa de mujer en cultivo que la adición de AcPic estimula la secreción de estradiol y progesterona, lo que se traduciría en un desbalance hormonal que estaría comprometiendo la ovulación. Por lo que otra posible explicación a la disminución del número de ovocitos liberados por la ingesta de AcPic, sería sus efectos como disruptor endócrino (Chichizola y col., 2009; Lavicoli y col., 2009).

Bailey y colaboradores (2006) administraron en el alimento de hembras preñadas PicCr (200 mg/kg/día) y sus equivalentes de CrCl₃ y AcPic y observaron que el porcentaje de fetos con bifurcaciones en el arco cervical fue testigo < CrCl₃ < AcPic < PicCr. La *D. melanogaster* tratada con los tres compuestos por separado, también presentó este comportamiento en el desarrollo de la línea germinal (Hepbur y col., 2003). En la presente investigación, los efectos en la respuesta ovulatoria siguieron un patrón similar testigo < CrCl₃ < AcPic < PicCr. En los tres estudios, los resultados de la evaluación del daño ocasionado por el AcPic resultan ser más cercanos a los provocados por el PicCr. Considerando lo anterior, el AcPic es capaz de generar por si solo efectos dañinos que al parecer no son iguales o equivalentes a los inducidos por el PicCr.

El PicCr puede ser reducido por agentes biológicos como el ascorbato (vitamina C), mismo que se encuentra en algunos tejidos del cuerpo humano en concentraciones fisiológicas de 28 mM y en riñón e hígado de rata en concentración de 1 mM. Se ha mostrado que la adición de 120 nM de PicCr (equivalente a la recomendada para el consumo humano) al ADN del plásmido pUC19 en presencia de ascorbato (5 mM) reduce los iones de Cr^{III} a Cr^{II}, la oxidación del centro cromo genera radicales OH⁻ (hidroxilo), O₂⁻ (superóxido) también

conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO) (Speetjens y col., 1999). El estrés oxidante es un estado que se caracteriza por un desequilibrio entre la producción de ERO y la capacidad antioxidante de las células, cuando el balance de estas ERO se pierde, se genera el llamado estrés oxidante (Pérez, 2013). En el cultivo de células de ovario de hámster chino, el PicCr induce la generación intracelular de ERO, mismas que pueden escindir el ADN y producir aberraciones cromosómicas (Stearns y col., 1995). El aumento en las concentraciones de 8-OHdG detectado en la orina de ratas inyectadas con PicCr indica daño oxidante (Hepburn y col., 2003). En el cultivo de linfocitos de humano, el incremento en las ERO por la adición de PicCr altera el potencial de la membrana mitocondrial, conduciendo a la liberación de citocromo-C al citosol y así aumentar la actividad de la caspa-3 lo que finalmente lleva a la apoptosis (Jana y col., 2009). Retomando lo anterior podemos sugerir que el PicCr puede dañar el ADN por la producción de ERO y actuar como uno de los eventos anteriores a la vía de señalización que conduce a la apoptosis, lo que finalmente se traduciría en aumento de la atresia folicular (datos no mostrados) y por ende disminución de la respuesta ovulatoria.

En resumen estos resultados nos permiten sugerir que la ingesta diaria de PicCr disminuye la respuesta ovulatoria, probablemente promoviendo la apoptosis folicular por la generación de ERO. El hecho que la administración de CrIII en forma de sales de cloruro no cause efectos sobre la respuesta ovulatoria, probablemente está vinculado con la baja biodisponibilidad del ión en esta formulación y el mecanismo de ingreso a la célula, mientras que el AcPic posiblemente ejercería sus efectos sobre el ciclo celular alterando la proliferación celular.

CONCLUSIONES

- La ingesta de dosis altas de PicCr por tiempo prolongado, no modifica el peso corporal del ratón hembra adulto.
- La ingesta diaria y prolongada de PicCr disminuye la respuesta ovulatoria espontánea del ratón hembra adulto.
- La ingesta prolongada de CrCl_3 no modifica la respuesta ovulatoria espontánea.
- La ingesta prolongada de AcPic disminuye la cuota ovulatoria del ratón hembra adulto a valores similares a los causados por el PicCr.
- La disminución de la respuesta ovulatoria espontánea no es causada por el CrIII o AcPic de manera independiente.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen E. (2005). The estrous cycle in the mouse. *American Journal of Anatomy*. **30**, 297-371.
- Anderson R, Bryden N, Polansky M y Gautschi K. (1996). Dietary chromium effects on tissue chromium concentrations and chromium absorption in rats. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*. **9**, 11-25. En: Hepburn D, Xiao J, Bindom S, Vicent B y O'Donnell J. (2003). Nutritional Supplement chromium picolinate causes sterility and lethal mutations in *Drosophila melanogaster*. *Proceeding of the National Academy of Science*. **100**, 3766-3771.
- Anderson R, Bryden N, y Polansky M. (1997). Lack of toxicity of chromium chloride and chromium picolinate in rats. *Journal of the American College of Nutrition*. **16**, 273-279.
- Anderson R, Polansky M, Bryden N, Patterson N, Veillon C y Glinsmann W. (1983). Effects of chromium supplementation on urinary Cr excretion in human subjects and correlation of Cr excretion with selected clinical parameters. *The Journal of Nutrition*. **113**, 276-281.
- Anderson R. (1997). Chromium as an essential nutrient for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. **26**, S35-S41.
- Anderson R. (1998). Effects of chromium on body composition and weight loss. *Nutrition Reviews*. **56**, 266-270
- Bailey M, Boohaker J, Sawyer R, Behling J, Rasco J, Jernigan J, Hood R y Vincent J. (2006). Exposure of pregnant mice to chromium picolinate results in skeletal defects in their offspring. *Birth Defects Research*. B. **77**: 244-249.
- Barbieri R. (2001). Infertilidad. En: Endocrinología de la reproducción. 4ª ed. Editorial Médica Panamericana. S. Yen, R. Jaffe y R. Barbieri Eds. Argentina. 600-633 pp.
- Barrett K, Barman S, Boitano S y Brooks L. (2013). Fisiología Endocrina y de la Reproducción. En: Ganong Fisiología Médica 24ª ed. Mc Graw Hill Interamericana. K. Barrett, S. Barman, S. Boitano y L. Brooks Eds. México. 297-452 pp.
- Bergman A, Heindel J, Jobling S, Kidd K y Zoeller R. (2012). State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals, United Nations Environment Programme and the World Health Organization.
- Berner T, Murphy M y Slesinski R. (2004). Determining the safety of chromium tripicolinate for addition to foods as a nutrient supplement. *Food and Chemical Toxicology*. **42**, 1029-1042.
- Caffaratti M y Briñon M. (2005). Suplementos dietarios: Picolinato de cromo (Revisión) Centro de Información de Medicamentos (CIME).

-
- Caligioni S. (2009). Assessing reproductive status stage in mice. *Current Protocols in Neuroscience*. **4**, 41.
 - Chávez N. (2013). Efecto de la ingesta diaria de picolinato de cromo sobre la respuesta ovulatoria, la tasa de fertilidad y el desarrollo prenatal de la progenie del ratón adulto. Tesis. Carrera de Biología FES Zaragoza UNAM.
 - Collins A, Oscoz A, Brungborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith C y Stetina R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. **23**, 143-151.
 - Cuapio P, Rosas P, Rocha F, Domínguez R y Pellicer A. (2009). Effects of chromium picolinate on seminal parameters of young adult males. *Journal of Andrology*. **30**, P118.
 - Cui W (2010) Mother or nothing: the agony of infertility. *Bull World Health Organ* **88**, 881–882 doi:10.2471/BLT.10.011210.
 - Domínguez R, Chávez R y Cruz M. (1991). La regulación del crecimiento y del folículo ovárico. En: Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. R Domínguez Ed. PUIS-UNAM. Porrúa, México. 162-182 pp.
 - Espey L y Richards S (2006). Ovulation. En: *Physiology of Reproduction Volume 1*. 3ª ed. E. Knobil y Neill's Eds. St. Louis. Academic Press. 425-474 pp.
 - Espinosa I. (2016). Efectos de la ingesta crónica de picolinato de cromo en la respuesta ovulatoria espontánea de ratones hembra adultos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
 - Evans G y Johnson P. (1980). Characterization and quantitation of a zinc-binding ligand in human milk. *Pediatric Research*. **14**, 876-880.
 - Fernandez-Pol J, Bono V y Johnson G. (1977). Control of growth by picolinic acid: Differential response of normal and transformed cells. *Proceedings of the National Academic Sciences*. **74**, 2889-2893.
 - Fernandez-Pol J. (1978). Morphological changes induced by picolinic acid in cultured mammalian cells. *Experimental and Molecular Pathology*. **29**, 348-357.
 - 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.
 - García R, Ballesteros L, Hernández P, Rosales A, Espinosa R, Soto H, Díaz de León L, Rosado A. (1997). Metalloproteinase activity during growth, maturation and atresia in the ovarian follicles of the goat. *Anim. Reprod. S.* **47**: 211-228.
 - Gargas L, Norton R, Paustenbach D y Finley B. (1994). Urinary excretion of chromium by humans following ingestion of chromium picolinate. Implications for biomonitoring. *Drug Metabolism and Disposition*. **22**, 522-529.
 - Geneser F. (2000). Histología. 3ª ed. Medica Panamericana. México; 421-427pp.

-
- Gómez A y Magaña P. (2003). Papel del cromo y del cinc en el metabolismo de la insulina. *Revista Médica IMSS*. **42**, 347-352.
 - Grant R, Coggan S y Smythe G. (2009). The physiological action of picolinic acid in the human brain. *International Journal of Tryptophan Research*. **2**, 71-79.
 - Halász B. (1999). Pituitary Gland, Overview. En: *Encyclopedia of Reproduction Volume 3*. Academic Press. E. Knobil y J Neill Eds. San Diego. 823-830 pp.
 - Havel P. (2004). A scientific review: The role of chromium in insulin resistance. *Nutrition* **21**.
 - Hepburn D y Vincent J. (2003). In vivo distribution of chromium from chromium picolinate in rats and implications for the safety of the dietary supplement. *Chemical Research in Toxicology*. **15** (2), 93-100.
 - Hepburn D, Burney M, Woski A y Vincent B. (2003). The nutritional supplement chromium picolinate generates oxidative DNA damage and peroxidized lipids in vivo. *Polyhedron*. **22**, 455-463.
 - Hepburn D, Xiao J, Bindom S, Vicent B Y O'Donnell J. (2003). Nutritional Supplement chromium picolinate causes sterility and lethal mutations in *Drosophila melanogaster*. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. **100**, 3766-3771.
 - Hinshelwood M. (1999). Steroidogenesis, Overview. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Volume 4. Academic Press. E. Knobil y J Neill Eds. San Diego Eds. E Knobil y JD Neill. 644-653 pp.
 - Hsueh A, McGee E, Hayashi M y Hsu S. (2000). Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **163**: 95-100.
 - Jana M, Rajaram A y Rajaram R. (2009). Chromium picolinate induced apoptosis lymphocytes and the signaling mechanisms thereof. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **237**, 331-344.
 - Juengel L, McIntush W, Niswender D. (1999). Corpus Luteum. En: *Encyclopedia of Reproduction Volume 1*. Academic Press. E. Knobil y J Neill Eds. San Diego. 703-708 pp.
 - Kareus S, Kelley C, Walton H y Sinclair P. (2001). Release of Cr(III) from Cr(III) picolinate upon metabolic activation. *Journal of Hazardous Materials*. **84**(2-3), 163-174.
 - Lavicoli I, Fontana L y Bergamaschi A. (2009). The Effects of Metals as Endocrine Disruptors. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, **12**:206-223.
 - Mackenzie R, Byerrum R y Decker C. (1958). Chronic toxicity studies II. Hexavalent and trivalent chromium administered in drinking water to rats. *Am. Med. Assoc. Arch. Ind. Health* **18**, 232-234. En: Berner T, Murphy M y Slesinski R. (2004). Determining the safety of chromium tripicolinate for addition to foods as a nutrient supplement. *Food and Chemical Toxicology*. **42**, 1029-1042.
 - Marcondes F, Bianchi F y Tanno A. (2002). Determination of the estrous cycle phases of

-
- rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal Biological*. **62** (4A), 609-614.
- Melillo G, Cox G, Radzio 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.
 - Mendola P, Messer L y Rappazzo K. (2008). Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult female. Environmental and female reproductive health. *Fertility and Sterility*. **89**: 81-94.
 - Merchant-Larios H y Moreno-Mendoza N. (2003). Diferenciación celular durante el desarrollo de la gónada. En: *Biología Celular y Molecular*. Ed. Jiménez LF Y Merchant-Larios H. Pearson Education. 723-737pp.
 - 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.
 - Oliver H, Chen D y Yeh J. (1999). Follicular atresia. En *Encyclopedia of Reproduction Volume 2*. Academic Press. E. Knobil y J Neill Eds. San Diego. 373-375 pp. Oliver H, Chen D y Yeh J. (1998). Follicular atresia. En *Encyclopedia of Reproduction Volume 2*. Academic Press. E. Knobil y J Neill Eds. San Diego. 373-375 pp.
 - OMS. (2002). Infertility. Report of a meeting on “ Vayena E, Rowe J y Griffin D. Ginebra. 396 p.
 - Ortega C. (2011). Efectos del picolinato de cromo sobre la esteroidogénesis y la integridad cromosómica de las células de la granulosa en cultivo. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. FES Zaragoza, UNAM.
 - Pérez M HH. (2013). Daño al ADN y capacidad de reparación en adultos mayores con hipertensión arterial y diabetes mellitus. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
 - Peters H, Byskov A, Himelstein-Braw R y Faber M. (1975). Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *Journal Reproduction Fertile*. **45**: 559-566.
 - Prieto Gómez B y Velázquez Paniagua M. (2002). Monografía Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadofinas. *Rev. Fac. Med. UNAM*. **45**: 252-257.
 - Rajkovic A, Stephanie A, Pangas y Matzuk M. (2006). Follicular Development: Mouse, Sheep and Human Models. En: Knobil Neill's Physiology of Reproduction. 3ª ed. E. Knobil y Neill's Eds. St. Louis. Academic Press. 383-410 pp.
 - Rosas M. (2008). Infertilidad femenina. Un problema multifuncional. *OFFARM*. **27**(8), 90-98.
 - Sánchez E. (1999). Fisiología del ovario. En *Fisiología Humana*. 2ª ed. Mc Graw Hill Interamericana. J. Tresguerres Eds. Madrid. 1021-1032 pp.
 - Snell S. (2009). Neuroanatomía Clínica. 6ª ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos

-
- Aires. 413-427 pp.
- Speetjens J, Collins R, Vincent J, y Wolski S. (1999). The nutritional supplement chromium (III) Tris (picolinate) cleaves DNA. *Chemical Research in Toxicology*. **22**, 483-487.
 - Stearns D, Wise J, Patierno S y Wetterhahn K. (1995). Chromium (III) picolinate produces chromosome damage in Chinese hamster ovary cells. *FASEBJ*. **9**, 1643-1648.
 - Stout M, Nyska A, Collins B, Witt K, Kissling G, Malarkey y Hooth M. (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.
 - Tresguerres J. (2010). Fisiología del Sistema Endocrino. En Fisiología Humana. 4ª ed. Mc Graw Hill Interamericana. J. Tresguerres. Eds. México. 839-1104 pp.
 - Tresguerres JAF y Castillos C. (2005). Fisiología del eje hipotálamo-hipófisis-ovárico. En: Fisiología Humana. 3ª ed. Mc Graw Hill-Interamericana. Ed. JAF Tresguerres. España; 1007-1023pp.
 - Tsafiri A. (1997). Follicular development: impact on oocyte quality. En: Fauser BCJM (Ed.) FSH: action and intraovarian regulation. *Parthenon*. Nueva York. 83-105 pp.
 - Udoff L y Adashi E. (1999). Infertility. En: Encyclopedia of Reproduction Volume 2. Academic Press. E. Knobil y J Neill Eds. San Diego. 824-832pp.
 - US Environmental Protection Agency (EPA). (1998). *Toxicological Review of Trivalent Chromium* (CAS No. 160 65-83-1). In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). Washintong, DC. August. En: Berner T, Murphy M y Slesinski R. (2004). Determining the safety of chromium tripicolinate for addition to foods as a nutrient supplement. *Food and Chemical Toxicology*. **42**, 1029-1042.
 - Van Voorhis B. (1999). Follicular Development. En: Encyclopedia of Reproduction Volume 2. Academic Press. E. Knobil y J Neill Eds. San Diego. 376-389 pp.
 - Vincent J. (2000). The Biochemistry of chromium. *The Journal of Nutrition*. **130**, 715-718.
 - Vincent J. (2001). The bioorganic chemistry of chromium (III). *Elsevier Science Polyhedron*. **20**, 1-26.
 - Yao H y Bahr M. (1999). Ovary, Overview. En: Encyclopedia of Reproduction Volume 3. Academic Press. E. Knobil y J Neill Eds. San Diego. 590-597 pp.
 - Yen J y Adashi E. (2001). Ciclo ovárico. En Endocrinología de la reproducción. 4ª ed. Editorial Médica Panamericana. S. Yen, R. Jaffe, R. Barbieri. Eds. Argentina. 164-202 pp.
 - Zegers H, Adamson G, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E y Van Der Poel S, (2009). Glosario de terminología en técnicas de reproducción asistida (TRA). Versión revisada y preparada por el International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) y la Organización Mundial de la Salud (OMS).