



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**EFFECTOS DEL PICOLINATO DE
CROMO SOBRE LA CALIDAD
ESPERMÁTICA DEL
RATÓN ADULTO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA

SUSANA CHAVIRA GARCÍA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO



Ciudad de México

Noviembre, 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

**EFFECTOS DEL PICOLINATO DE CROMO SOBRE LA
CALIDAD ESPERMÁTICA DEL RATÓN ADULTO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA

SUSANA CHAVIRA GARCÍA

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

Noviembre, 2017



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que la alumna **CHAVIRA GARCÍA SUSANA**, con número de cuenta **309211598**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **14 de noviembre de 2017** a las **13:00 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 Dr. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

SUPLENTE Dra. JUANA MONROY MORENO

[Handwritten signatures of the jury members]

El título de la tesis que presenta es: **Efectos del picolinato de cromo sobre la calidad espermática del ratón adulto.**

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 26 de septiembre de 2017

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR



RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

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

AGRADECIMIENTOS

*En especial a la **Dra. Patricia Rosas Saucedo**, mi más sincero agradecimiento por guiarme, por su gran apoyo tanto académico como a nivel personal, por su paciencia, por su tiempo, por las largas jornadas de trabajo, por todo el conocimiento que ha compartido conmigo, por siempre confiar en mí, por sus sabios consejos y por brindarme su amistad. Con toda mi admiración y respeto.*

A los miembros del jurado:

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Dra. Juana Monroy Moreno

Por sus enriquecedoras observaciones, comentarios y aportaciones en la revisión de esta tesis.

*Al **Dr. Juan José Rodríguez** por las facilidades otorgadas para aprender las técnicas para la realización de este proyecto.*

*A la **Dra. Adriana**, al **Dr. Román** y a la **Dra. Ely**, así como al personal del bioterio de la FES-Zaragoza por el cuidado y mantenimiento de los animales utilizados en esta investigación.*

*Al **Biól. Roberto Chavira** por su colaboración en la cuantificación de la concentración de testosterona.*

*A **Tania, Noé, Arely, Irene, Francisco y Alejandro**, por su gran apoyo en la realización de este proyecto.*

DEDICATORIAS

*A mis padres, **Elvira García** y **Leopoldo Chavira**, por siempre creer en mí y porque siempre me han brindado su apoyo y comprensión en todos los aspectos de mi vida; porque gracias a ustedes soy quien soy. Gracias por la fortaleza, esfuerzo y dedicación. Por motivarme a ser mejor persona, por ser mi inspiración. Le doy infinitas gracias a Dios y a la vida porque los tengo como padres. Gracias por TODO y por siempre dar más. Los amo.*

*A mi hermana **Lupita**, porque siempre estás presente en todo lo que hago y espero ser el mejor ejemplo para ti. Porque por más difícil que se ponga la vida, sé que siempre nos tendremos la una a la otra, gracias por siempre defenderme y quererme. Te quiero Lupis.*

*A mi abuelita **Melita**, en donde quiera que estés este logro es para ti, por tenerme presente hasta el último momento, por el amor que siempre me diste, por luchar hasta el final y ser inspiración para todos. Te quiero mucho.*

*A mi familia; en especial a mis tíos, **Lety, Félix, Lupe, Carlos, Daniel**; a mis primos, **Elena, Karla, Luis, Claudia, Hugo**; a mis sobrinos, **Vale, Faty, Noel, José María, Carlos, Araceli** y **Jorge**, gracias por siempre creer en mí y porque sé lo orgullosos que están de mí, espero nunca decepcionarlos.*

*A **Ari**, por ser más que mi mejor amiga, mi hermana por elección, por formar parte de mi vida, por tu amistad incondicional, por estar desde siempre y para siempre conmigo, por acompañarme en los momentos más difíciles pero también en los más importantes, por creer en mí, por escucharme, por los consejos, por alentarme y apoyarme. Siempre estaremos juntas en las buenas, en las malas y en las mejores. Te mega amo.*

A **Gael**, por ser mi mejor amigo, por todo lo que representas para mí, por siempre estar, por tu divertida compañía, por siempre sacarme una sonrisa y por tu amistad incondicional. Eres el mejor amigo, cómplice y hermano que puedo tener y sé que siempre estaremos juntos. Te amo.

A **Karla**, porque ni la distancia puede contra nuestra amistad, porque después de tantos años sabemos que siempre contaremos la una con la otra. KAS. Te quiero mucho.

A **Daniel**, por tu valiosa amistad, por siempre estar, porque desde hace más de 5 años me has brindado momentos llenos de risas y ocurrencias, porque sabes lo especial que eres para mí. Gracias por todo. Te quiero mucho mejor amigo.

A **Katia**, porque a pesar de que en esta etapa parece difícil encontrar amigos, estos más de 5 años de amistad me demostraron que no siempre es así. Gracias por las locuras, los momentos divertidos, por escucharme, por los consejos y por el cariño. Por todas las pruebas que hemos superado sabemos que esta amistad es para siempre. Te quiero mucho.

A **Mari** y **Celic**, por todos los momentos especiales que hemos vivido y porque a pesar de la distancia, cada reencuentro es como si siempre estuviéramos juntas. Las quiero.

A **Tania** y **Juan Carlos**, porque además de su apoyo en este proyecto me brindaron su amistad, por las risas, travesuras y porque sin ustedes los días en el laboratorio no serían iguales. Los quiero.

A mi mamá

A mi papá

ÍNDICE	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. El ratón como modelo experimental	3
2. Sistema reproductor masculino	3
3. Eje hipotálamo-hipófisis-testículo	7
4. Esteroidogénesis	9
5. Espermatogénesis y espermiogénesis	11
Espermatozoide	14
Semen	15
6. Factores que afectan la calidad espermática	16
7. Picolinato de cromo	16
Ácido picolínico	17
Cromo	18
8. Efectos del picolinato de cromo	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	55

RESUMEN

El picolinato de cromo (PicCr) es uno de los más populares suplementos alimenticios a base de CrIII, ya que incrementa su biodisponibilidad. Al PicCr se le ha atribuido la capacidad de reducir la grasa corporal e incrementar la masa muscular, lo que ha llevado al uso y abuso en su consumo. Sin embargo, en adultos jóvenes en edad reproductiva la ingesta diaria de 200 µg de PicCr por 21 días, afecta la calidad espermática. Por ello en este estudio se analizaron los efectos de la ingesta diaria y prolongada de diferentes dosis de PicCr sobre el peso corporal; el peso de los órganos y glándulas accesorias del sistema reproductor; los parámetros seminales y la concentración de testosterona en suero, utilizando al ratón macho adulto como modelo. Además, se evaluó si los efectos del PicCr sobre la calidad espermática y la esteroidogénesis persisten aún después de suspender la ingesta del suplemento. Los animales se dividieron en los siguientes grupos experimentales: Testigo, Vehículo (Vh), 0.12 µg de PicCr (dosis equivalente a la recomendada para consumo humano) y 1.2 µg de PicCr. Un lote se trató por 35 días (un ciclo espermático) y se sacrificó. Otro lote se trató por 105 días (tres ciclos espermáticos) y se sacrificó. El último lote fue de animales sometidos a la ingesta diaria de 0.12 o 1.2 µg de PicCr por 105 días y se sacrificaron 35 días después de haber terminado el tratamiento. Se registró el peso corporal al inicio y al término del tratamiento. A la autopsia se disecaron y pesaron los testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata. Las muestras espermáticas se obtuvieron de los conductos deferentes para evaluar la concentración, viabilidad, movilidad y morfología espermáticas. La concentración de testosterona en suero se evaluó por la técnica de ELISA.

Los resultados muestran que la ingesta diaria de PicCr por 35 días no modificó el peso corporal al finalizar el tratamiento respecto al peso inicial, independientemente de la dosis del suplemento. El peso de los testículos y epidídimos de los animales tratados con 1.2 µg de PicCr fue menor al observado en el resto de los grupos experimentales. En cuanto a los

parámetros seminales, la movilidad resultó disminuida al tratar a los animales con la dosis menor de PicCr, mientras que la concentración espermática fue menor con la dosis alta de PicCr respecto al grupo con Vh. La concentración de testosterona fue menor independientemente de la dosis de PicCr. Cuando la ingesta de 0.12 µg PicCr se prolongó por 105 días, el peso corporal final fue mayor al inicial. El peso de los órganos no se modificó con el consumo del suplemento. La mayoría de los parámetros seminales disminuyeron con el tratamiento prolongado con 0.12 µg de PicCr, mientras que la concentración de testosterona fue mayor con esta dosis. El peso corporal registrado después de 35 días de haber suspendido el tratamiento prolongado con 0.12 µg de PicCr se mantuvo significativamente mayor al peso inicial. Sólo el peso de las vesículas seminales fue menor, 35 días después del tratamiento independientemente de la dosis del suplemento. Los resultados de la espermatobioscopia mostraron que la concentración, la viabilidad y la movilidad espermáticas se recuperaron parcialmente después de 35 días de suspendido el tratamiento con 0.12 µg de PicCr, lo que no ocurre con la dosis alta. La concentración de testosterona no mostró diferencias significativas después de suspender la administración de PicCr.

Los resultados de este estudio muestran en el ratón macho adulto, que la ingesta de PicCr en la dosis similar a la recomendada para consumo humano y por un ciclo espermático, disminuye la movilidad espermática, efecto que se agudiza al prolongar el tratamiento a tres ciclos, ya que disminuyen la mayoría de los parámetros seminales, lo que no ocurre con la dosis alta. Los efectos de la ingesta de PicCr sobre el peso corporal y de los órganos, los parámetros seminales, así como la concentración de testosterona están en función de la dosis y el tiempo de tratamiento. Los resultados de los parámetros evaluados un ciclo espermático después de suspender la ingesta del suplemento, no alcanzan los valores del grupo testigo.

INTRODUCCIÓN

1. El ratón como modelo experimental

Un organismo modelo se define como cualquier especie animal que, mantenida bajo determinadas condiciones controladas, es utilizada como instrumento de medida para la obtención de datos y generación de información (Fuentes y col., 2008; Wolpert y col., 2009).

Entre los vertebrados, el ratón *Mus musculus* es un animal ampliamente utilizado en los laboratorios de investigación experimental por las características que lo distinguen y que lo hacen un excelente modelo biológico para diversos ensayos, como su tamaño, que facilita su cuidado, manejo y confinamiento, alta tasa de fecundidad, corto tiempo de generación, vida media relativamente corta y bajo costo de manutención, aunado a la abundancia de bibliografía (Fuentes y col., 2008; Wolpert y col., 2009).

La cepa CD-1, es el ratón no consanguíneo con excelentes características reproductivas (fertilidad de más del 90%, 12 crías promedio por camada) y maternas, es de temperamento dócil y se cuenta con la información sobre sus constantes fisiológicas (Rosas, 1990; Harlan, 2011). Por ello se emplea como modelo en investigación microbiológica, farmacológica, toxicológica, oncológica, teratológica, gerontológica y reproductiva, entre otras (Harlan, 2011).

2. Sistema reproductor masculino

El sistema reproductor masculino está formado por dos gónadas llamadas testículos, un sistema de conductos (eferentes, deferentes y eyaculatorios, epidídimos y uretra), glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales o de Cowper),

escroto y pene (Figura 1). Sus funciones son la producción y almacenamiento de gametos masculinos (espermatozoides) y la síntesis y liberación de esteroides sexuales y hormonas proteicas (Urroz, 2000; Knoblaugh y True, 2012).

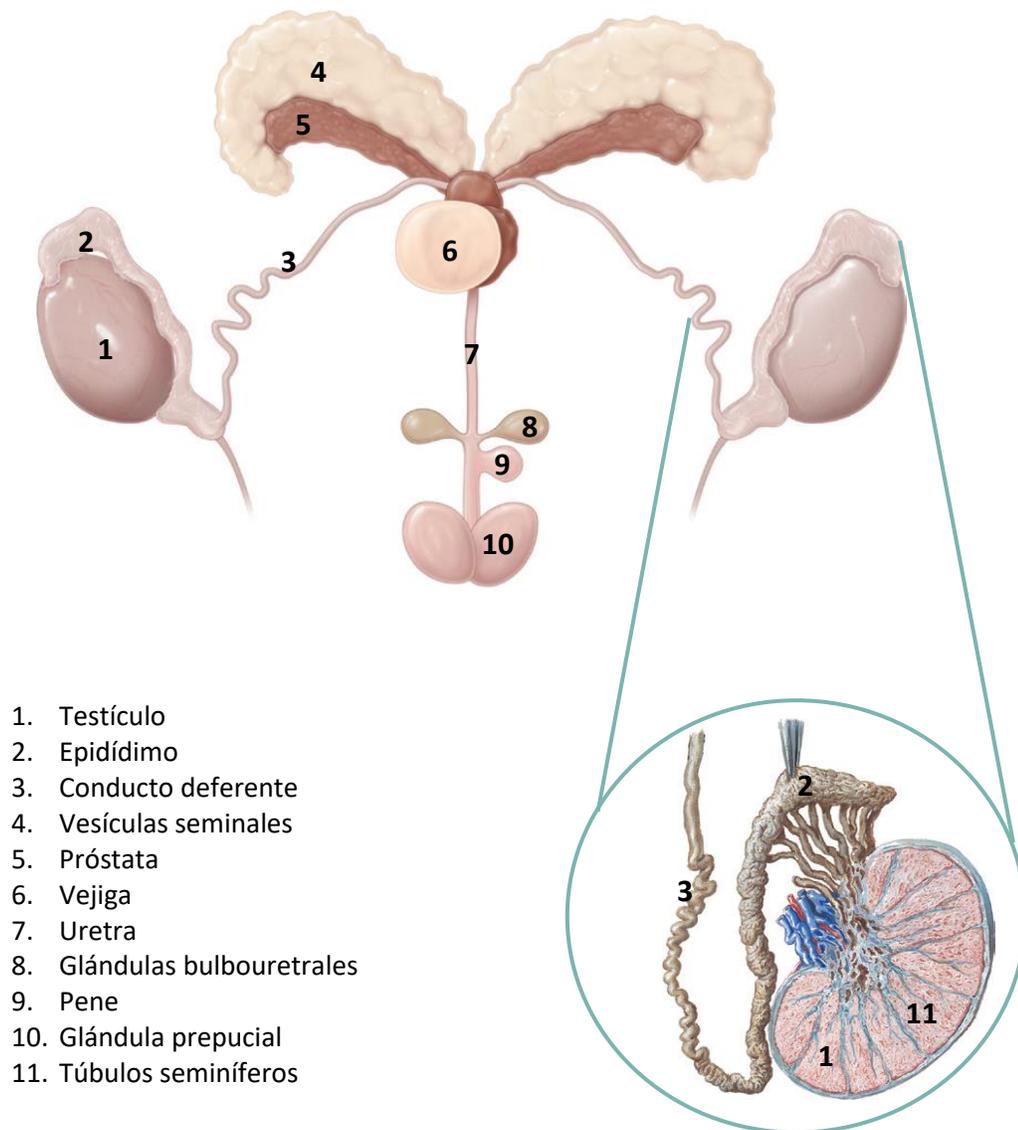


Figura 1. Esquema del aparato reproductor del ratón macho (Tomado y modificado de Knoblaugh y True, 2012).

Testículos. Son órganos pareados de forma ovoide que se encuentran en el interior de las bolsas escrotales por fuera de la cavidad abdominal. Contienen a los túbulos seminíferos que son conductos que albergan a los diferentes tipos celulares de la línea germinal. En los túbulos también se ubican las células de Sertoli que se extienden desde la lámina basal hasta la luz del túbulo, rodean a los gametos en diferenciación y se encargan de nutrirlos y darles sostén. Entre los túbulos se encuentra el espacio intersticial, donde se localizan las células de Leydig o esteroidogénicas (Bearden y Fuquay, 1982; Olivera y col., 2006; Knoblaugh y True, 2012).

Epidídimo. Consta de tres regiones, la cabeza que es un área aplanada situada en la punta del testículo; el cuerpo que se extiende a lo largo del eje longitudinal del testículo y se continúa con la cola. Sus funciones son las siguientes (Bearden y Fuquay, 1982; Knoblaugh y True, 2012):

- Transporte: A medida que se producen los espermatozoides en los túbulos seminíferos se desplazan hacia la (*rete testis*) y continúan por los conductos eferentes, los que desembocan en la cabeza del epidídimo.
- Concentración: Ocurre cuando los líquidos que suspenden a los espermatozoides en los testículos son absorbidos por las células epiteliales del epidídimo. La absorción de estos líquidos ocurre principalmente en la cabeza.
- Almacenamiento: La mayor parte de los espermatozoides se almacena en la cola del epidídimo, porque ahí las condiciones son óptimas para preservar la viabilidad por un tiempo prolongado.
- Maduración: Cuando los espermatozoides recientemente formados entran a la cabeza a partir de los conductos eferentes, no tienen la capacidad de moverse ni de fertilizar, durante su paso por el epidídimo adquieren esas capacidades. Mientras están en el epidídimo, los espermatozoides pierden la gota citoplasmática que se forma en el cuello de cada espermatozoide durante la espermiogénesis.

Conducto deferente. Es un tubo que sale de la cola del epidídimo. En su trayecto inicial está sostenido por pliegues del peritoneo, luego pasa a lo largo del cordón espermático y se une a la uretra, cerca de la apertura de la vejiga. Tiene como función el transporte de los espermatozoides (Bearden y Fuquay, 1982; Knoblauch y True, 2012).

Vesículas seminales. Son glándulas pares que desembocan en común con los conductos deferentes, con los que forman un corto conducto eyaculador que se une a la uretra. Su secreción es rica en proteínas, lípidos y monosacáridos de gran importancia para la conservación y movilidad de los espermatozoides (Bearden y Fuquay, 1982; Knoblauch y True, 2012).

Próstata. Glándula única situada en la porción inicial de la uretra. Su secreción es alcalina y contribuye a neutralizar la acidez propia del conducto genital de la hembra, con lo cual asegura la viabilidad de los espermatozoides que llegan a esta zona (Bearden y Fuquay, 1982; Knoblauch y True, 2012).

Uretra. Sirve como conducto excretor tanto para la orina como para el semen. Se extiende desde su unión con el conducto deferente hasta la porción terminal del pene (Bearden y Fuquay, 1982; Knoblauch y True, 2012).

Glándulas bulbouretrales. Son pequeños órganos pares situados a cada lado de la uretra. Su producto de secreción es rico en mucina fundamentalmente lubricante y se libera independientemente de la eyaculación (Urroz, 2000; Knoblauch y True, 2012).

Pene. Es el órgano copulatorio en los machos. Está compuesto por cuerpos esponjosos y cavernosos y por el glande. En su interior se encuentra la uretra (Bearden y Fuquay, 1982; Knoblauch y True, 2012).

3. Eje hipotálamo-hipófisis-testículo

El eje hipotálamo-hipófisis-testículo (HHT) es el eje de regulación neuroendócrina del proceso reproductor del macho. La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es un decapeptido sintetizado por un grupo específico de neuronas hipotalámicas, localizadas principalmente a nivel de los núcleos arcuato, periventricular y paraventricular y el área preóptica y liberado a la circulación porta-hipotálamo-hipofisaria. Su vida media es breve (<10 minutos) y tras llegar a la hipófisis anterior, estimula la síntesis y liberación de dos hormonas glicoprotéicas: la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Ambas gonadotropinas, sintetizadas por una misma población celular (gonadotropos), son liberadas a la circulación sistémica para actuar a nivel de testículo. La LH estimula a las células de Leydig induciendo la síntesis de testosterona, mientras que la FSH tiene como blanco las células de Sertoli, las cuales inducen la maduración de los espermatozoides (Casabiell, 2006; Tresguerres, 2010; Hall, 2012).

La actividad y el mantenimiento de la función testicular dependen de la adecuada secreción pulsátil de GnRH por parte del hipotálamo, que a su vez determina la liberación pulsátil de la FSH y LH por la hipófisis, hacia el torrente sanguíneo y de ahí al testículo (Casabiell, 2006; Uribe 2014).

La testosterona secretada por los testículos en respuesta a la LH, ejerce una retroalimentación negativa sobre el hipotálamo. Cuando la secreción de testosterona es excesiva, la retroalimentación negativa inhibe la secreción de GnRH hipotalámica, que a su vez reduce la secreción de LH y de FSH por la adenohipófisis, lo que disminuye la biosíntesis de testosterona hasta alcanzar la concentración normal. A la inversa, concentraciones bajas de testosterona permiten que el hipotálamo secrete gran cantidad de GnRH, con el correspondiente aumento de la secreción adenohipofisaria de LH y FSH, que resulta en el incremento de la síntesis testicular de testosterona (Hall, 2012) (Figura 2).

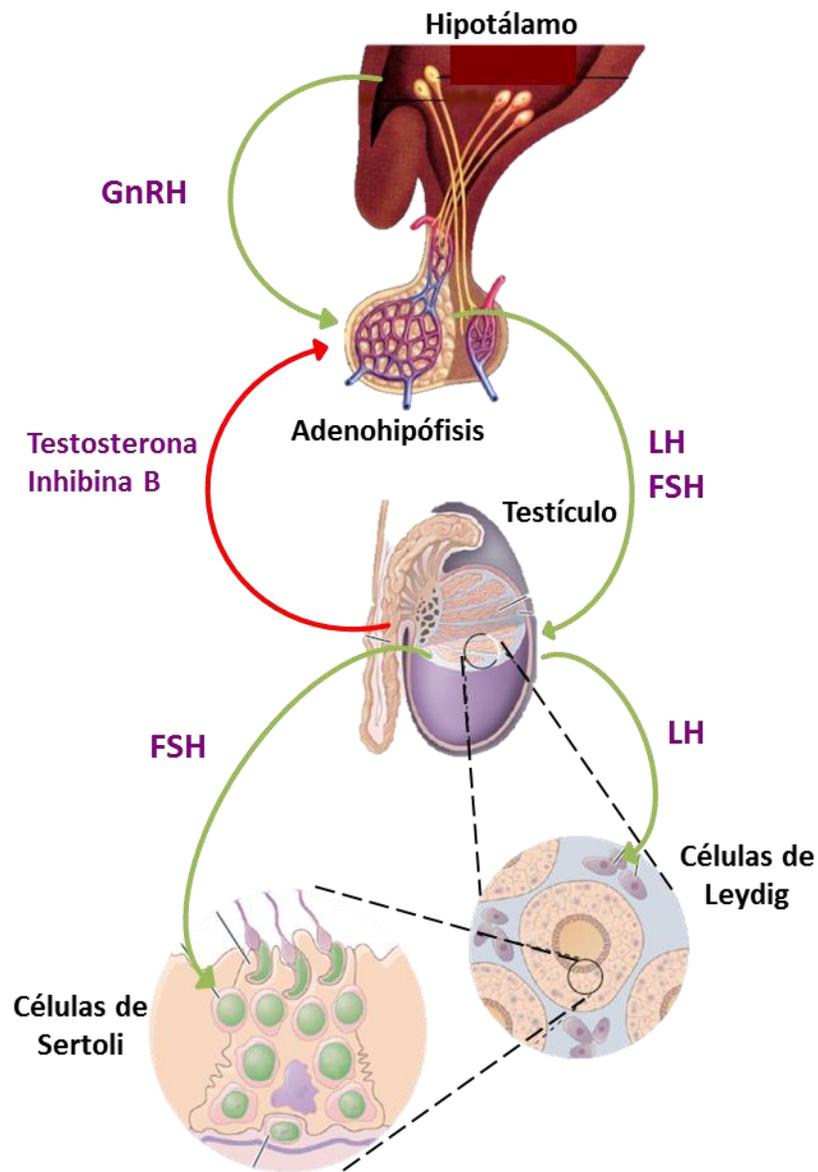


Figura 2. Eje Hipotálamo-hipófisis-testículo (Tomado y modificado de Longo, 2012).

La secreción de FSH es inhibida por la testosterona y el estradiol. Además existe otro regulador negativo específico de naturaleza no esteroidea, la inhibina, producida por las células de Sertoli. Esta hormona ejerce un efecto negativo sobre la secreción de FSH en la adenohipófisis y un efecto menor sobre el hipotálamo, suprimiendo la secreción de GnRH (Hall, 2012) (Figura 2).

La acción combinada de las gonadotropinas regula las funciones del testículo que son la esteroidogénesis y la espermatogénesis. Ambos procesos, además de estar regulados hormonalmente por el eje HHT, también dependen de una compleja serie de interacciones locales de tipo autócrino y parácrino entre las células germinales y las células de Sertoli, así como entre las células de Leydig y las células mioides peritubulares (Casabiell, 2006; Rodríguez y col., 2008; Uribe 2014).

4. Esteroidogénesis

La esteroidogénesis es el conjunto de reacciones metabólicas en la síntesis de las hormonas esteroideas (Casabiell, 2006). En el testículo, la LH regula el crecimiento y la diferenciación de las células de Leydig que se localizan en las regiones intertubulares, adyacentes a los vasos sanguíneos y a los túbulos seminíferos. Este tipo celular es el responsable de la producción de testosterona, esencial en la diferenciación sexual, en el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, así como en el mantenimiento de la espermatogénesis (Jara y González, 2011).

La testosterona se sintetiza en las células de Leydig utilizando el colesterol que se obtiene de diferentes fuentes: el que circula en la sangre como lipoproteínas de baja densidad (LDL), el que se sintetiza *de novo* dentro del testículo a partir de acetil coenzima A y el que se libera de los ésteres de colesterol almacenados en el interior de la célula en forma de gotas lipídicas (Van Voorhis, 1999; Tresguerres, 2010).

El comienzo de la esteroidogénesis es inducido por la unión de la LH a la porción extracelular de su receptor acoplada a proteínas G. La activación de la proteína G promueve la producción de AMP cíclico y estimula la vía de la fosfoquinasa A, la cual origina o causa la transcripción del gen que codifica para la proteína reguladora de la esteroidogénesis

aguda (StAR). La StAR forma un puente lipídico en la mitocondria que permite el paso del colesterol (C27) de la membrana externa a la interna, donde se convierte en pregnenolona (C21) por la enzima que escinde la cadena lateral del colesterol (P450_{scc}) (Tresguerres, 2010) (Figura 3).

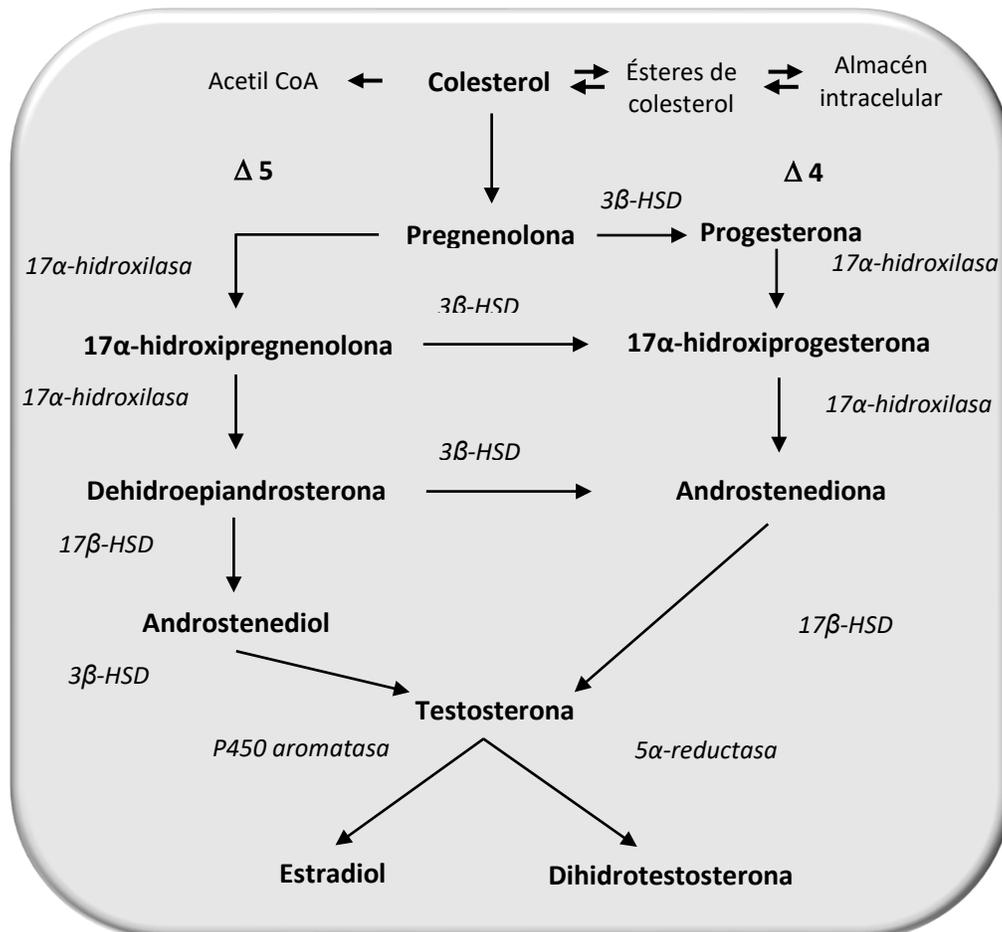


Figura 3. Esteroidogénesis testicular (Tomado de Gal y col., 2007).

La pregnenolona sigue dos rutas, la $\Delta 5$ y la $\Delta 4$. En la primera la enzima citocromo P450 17 α -hidroxilasa (17 α -hidroxilasa) da origen a la 17 α -hidroxipregnenolona (C21), ésta se transforma en dehidroepiandrosterona (DHEA) (C19) por acción de la enzima 17 α -hidroxilasa. Posteriormente la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) convierte la DHEA en androstenediol (C19) y la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) lo transforma en testosterona (C19). En la ruta $\Delta 4$ la pregnenolona por medio de la 3 β -HSD forma la progesterona (21), ésta por efecto de la 17 α -hidroxilasa origina la 17 α -hidroxiprogestero (C21), que por medio de la misma enzima se transforma en androstenediona (C19). Finalmente esta última forma testosterona, por la enzima 17 β -HSD (Gal y col., 2007; Jara y González, 2011). La testosterona se convierte en otro andrógeno de mayor actividad, la dihidrotestosterona (DHT) (C19) por acción de la enzima 5 α -reductasa (Toorians y col., 2003). En los tejidos periféricos, la mayor parte de los efectos de la testosterona son directos y se llevan a cabo tras convertirse en DHT; los efectos indirectos son cuando la testosterona se transforma a 17 β -estradiol (C18), por la acción del complejo enzimático P450 aromatasa (Becerro, 2008) (Figura 3).

5. Espermatogénesis y espermiogénesis

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual se desarrollan y diferencian los gametos masculinos, partiendo de espermatogonias hasta transformarse en espermatozoides. En el ratón este proceso tiene una duración de 35 días (Bustos-Obregón y Díaz, 1999) (Figura 4).

La espermatogénesis se lleva a cabo en los túbulos seminíferos, donde las espermatogonias se ubican en la base del epitelio tubular, pegadas a la membrana basal de los mismos y soportadas por las células de Sertoli. Existen dos clases de espermatogonias, las tipo A y las tipo B, las primeras son una población que surge de las células madre espermatogónicas que comienzan a proliferar por mitosis; algunas permanecen como células troncales,

manteniendo el número apropiado de espermatogonias durante toda la vida reproductiva del individuo; el resto experimentan un limitado número de divisiones mitóticas (A1-A4 e intermedias), siendo la última división la que da origen a las espermatogonias tipo B. Estas últimas se mantienen unidas por puentes citoplasmáticos que les permite sincronizarse y dividirse a la vez. Las células descendientes de las tipo B, son los espermatocitos primarios (espermatocitogénesis) que entran a la meiosis I, dando como resultado dos espermatocitos secundarios que ingresan a la meiosis II y se obtienen dos espermatidas (McLaren y Southee, 1997; Maeda y col., 2000) (Figura 4).

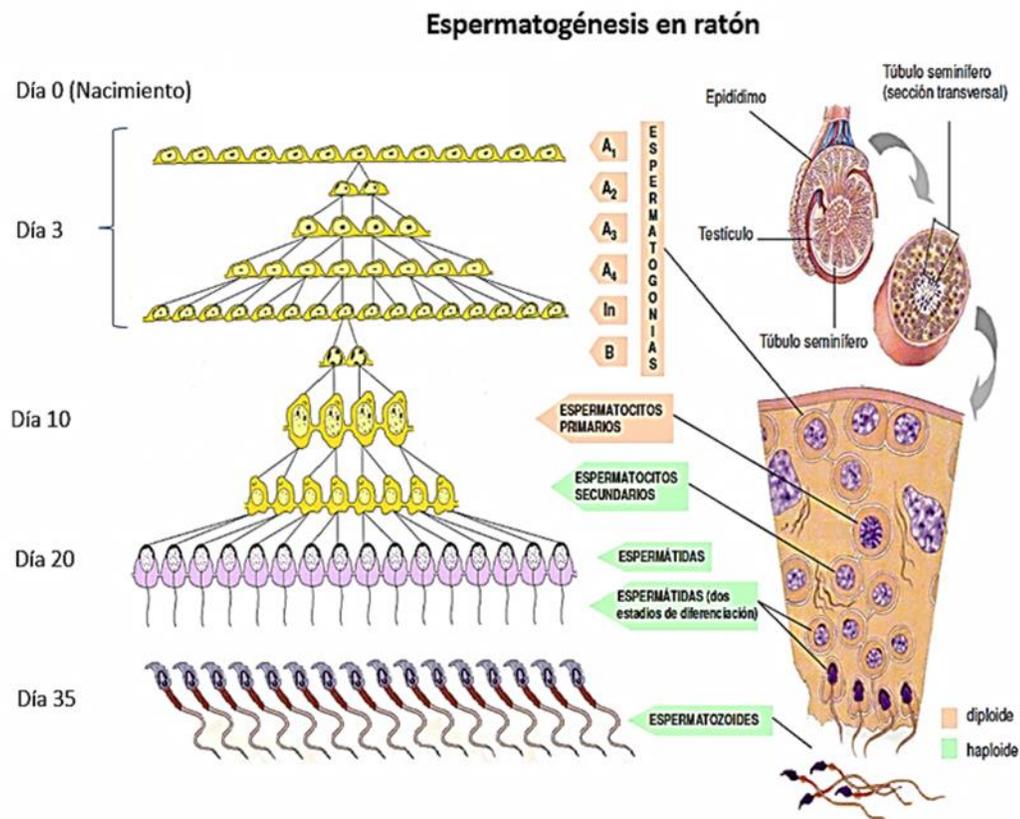


Figura 4. Representación esquemática de la espermatogénesis en ratón (Tomada y modificada de Sans, 2004).

La maduración de las espermátidas en espermatozoides se le denomina espermiogénesis y se divide en cuatro fases (Olivera y col., 2006):

- Fase de Golgi. El organelo del mismo nombre se acerca al núcleo, desprende vesículas que se le sobreponen y poco a poco se unen para convertirse en el acrosoma que se localiza en la parte apical del núcleo. Los centriolos situados en forma de T, muy cercanos al aparato de Golgi, van migrando hacia lo que será la base del núcleo. El centriolo proximal se sitúa en la parte basal del núcleo y a partir del centriolo distal crece el axonema conformado por dos microtúbulos centrales y nueve pares de microtúbulos periféricos.
- Fase de capuchón. El acrosoma se aplana formando una capucha sobre el núcleo. El núcleo se compacta mucho más al cambiar las histonas por protaminas, de tal forma que no puede haber ni replicación, ni transcripción.
- Fase acrosómica. La espermátida gira de tal forma que el acrosoma queda en dirección de la membrana basal; se depositan gránulos en el acrosoma, el citoplasma se desplaza hacia la base de la cabeza y se localiza por debajo de la unión núcleo axonema; las mitocondrias se agrupan alrededor de este último en su parte cercana al núcleo, formando la pieza media. En esta fase el espermatozoide adquiere su morfología definitiva.
- Fase de maduración. Se observan las características finales de los espermatozoides. Cabeza: forma característica de cada especie, cubierta en sus dos terceras partes por el acrosoma. Flagelo: compuesta por las piezas media, principal y final; en la pieza media se encuentran las mitocondrias en forma de hélice. En esta fase se elimina gran parte del citoplasma por desplazamiento del mismo hacia la pieza terminal del flagelo originando la llamada gota citoplasmática. El proceso de maduración termina con la espermiación o liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero. Mediante movimientos peristálticos los espermatozoides son transportados de la *rete testis* a los ductos eferentes y de allí al epidídimo en cuya cola se almacenan (Olivera y col., 2006) (Figura 5).

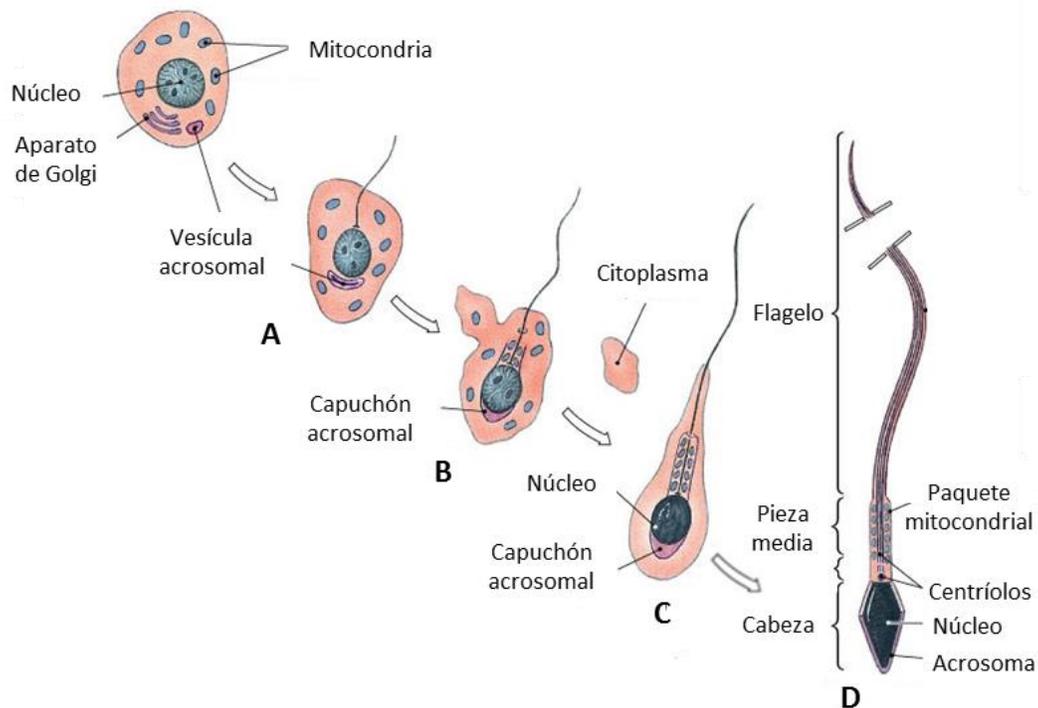


Figura 5. Esquema que muestra las fases de la espermiogénesis. A) Fase de Golgi, B) Fase de capuchón, C) Fase acrosómica y D) Fase de maduración (Tomado y modificado de <https://s3.amazonaws.com/engrade-myfiles/4075479637250125/Espemiogenesis.jpg>).

Espermatozoide

El espermatozoide es una célula diferenciada producto de la espermatogénesis, está compuesta por la cabeza y el flagelo (Darszon y col., 2005) (Figura 6).

La cabeza incluye el núcleo (que contiene el ADN), la cubierta post acrosomal (que cubre la porción posterior del núcleo) y el acrosoma. Este último cubre la parte anterior del núcleo y contiene las enzimas necesarias para la penetración de la corona radiada y la zona pelúcida durante la fertilización. Si el acrosoma está mal formado, dañado o ausente, el espermatozoide no será capaz de participar en la fertilización (Bearden y Fuquay, 1982).

El flagelo se compone de la pieza media, principal y final. La pieza media es una porción engrosada que se encuentra cerca del centriolo proximal, formada por el manto mitocondrial, contiene enzimas que convierten la fructosa y otros sustratos en compuestos de alta energía que pueden ser utilizados por el espermatozoide (Bearden y Fuquay, 1982).

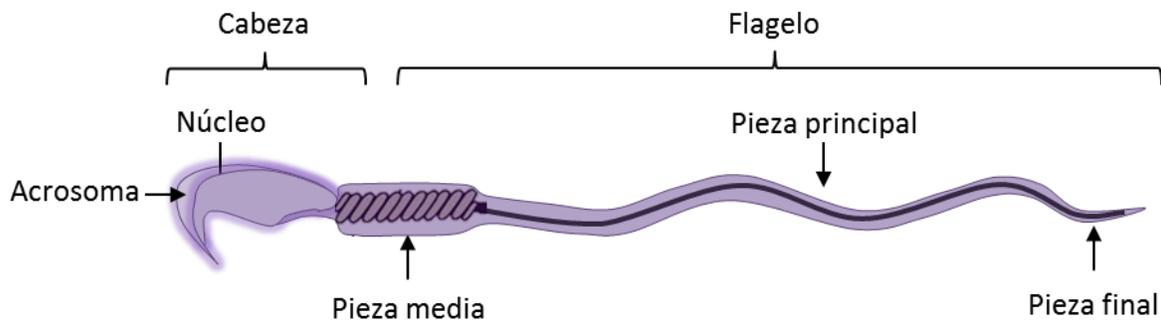


Figura 6. Espermatozoide de ratón (tomada y modificada de Darszon y col., 2005).

La pieza principal y la pieza final difieren entre sí, ya que esta última no tiene una cubierta protectora. Una de las principales características del flagelo es el filamento axial, el cual es un pequeño haz de delgadas fibrillas que empiezan en el centriolo proximal y corren a lo largo de todo el flagelo. Las contracciones de estas fibrillas provocan el latiguelo del flagelo, lo cual impulsa hacia adelante al espermatozoide. Esto da como resultado un patrón de movimiento ondulado y rotatorio que permite que el espermatozoide se mueva progresivamente hacia adelante (Bearden y Fuquay, 1982).

Semen

El plasma seminal sirve a la vez de vehículo y de medio nutritivo y protector de los espermatozoides. Está compuesto de minerales, carbohidratos, ácidos orgánicos, lípidos, esteroides, aminoácidos, espermina, glutatión y proteínas (Poirot y Cherruau, 2005).

6. Factores que afectan la calidad espermática

Según la OMS la infertilidad es una enfermedad del sistema reproductivo definida por la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales sin protección (OMS, 2010; Zegers y col., 2010). En los últimos años la prevalencia de infertilidad ha aumentado a nivel mundial (Pérez, 2007; Rosas, 2007). Aproximadamente del 10 al 15% de las parejas en edad reproductiva son infértiles (Jungwirth y col., 2012) y de éstas el 40% está asociado al factor femenino, el otro 40% al factor masculino y el 20% a ambos (Udoff y Adashi, 1999; Sigman y col., 2009; Tapia, 2012).

Entre los factores de infertilidad masculina se encuentran alteraciones anatómicas, genéticas, endócrinas, inmunes y de origen idiopático, entre otras (Udoff y Adashi, 1999; OMS 2002). La disminución en la calidad del semen también puede deberse a diversos factores como temperatura, radiaciones, fármacos, estrés, drogas, alcohol, tabaco, así como aspectos nutricionales por ejemplo hábitos alimenticios, deficiencias de macro y micronutrientes, entre otras (Rosas, 2007).

Recientemente la presión por conservar un peso corporal adecuado, ya sea por problemas de salud como la obesidad o por cumplir con prototipos de belleza, promueve la utilización de productos que aceleran la quema de grasa y el aumento de la masa muscular, siendo uno de ellos el picolinato de cromo.

7. Picolinato de cromo

El picolinato de cromo (PicCr) es un compuesto formado por tres moléculas de ácido picolínico (AcPic) rodeando a un átomo de cromo trivalente (CrIII) (Berner y col., 2003).

Ácido picolínico

El ácido picolínico (AcPic) o ácido piridina 2-carboxílico es un derivado del metabolismo del aminoácido L-triptófano por la vía de la quinurenina. El AcPic tiene actividad quelante (sustancia que forma complejos con iones metálicos) al unirse con elementos como el cromo, zinc, manganeso, cobre, hierro o molibdeno, favoreciendo su excreción (Evans y Bowman, 1992; Tomioka y col., 2007; Grant y col., 2009). Se ha detectado en una gran variedad de fluidos biológicos como el plasma sanguíneo, el líquido cefalorraquídeo, la leche materna, el jugo pancreático y el homogenado intestinal (Fernández-Pol y col., 1977; Evans y Johnson, 1980; Grant y col., 2009). Este ácido es esencial para el proceso metabólico de ciertos elementos minerales.

Tabla 1. Concentraciones endógenas de ácido picolínico (Tomada y modificada de 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

Cromo

El CrIII es un elemento traza esencial para la realización de varias funciones del organismo (Gómez y Magaña, 2003), ya que participa en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (González y col., 2006). Su acción es la amplificación de la señal de la insulina, lo que acelera la captura de la glucosa y el metabolismo de los lípidos (Davis y Vincent, 1997; Trumbo y Ellwood, 2006). Se encuentra en una gran variedad de alimentos (Gómez y Magaña, 2003; Havel, 2004) (Tabla 2), 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 (Food and Nutrition Board, 2002) y del cual solo es absorbido del 0.5 al 2% (Anderson y col., 1983; Bunker y col., 1984; Anderson y col., 1997).

En 1987 se describe la existencia de un oligopéptido que tiene la capacidad de unirse al cromo al que llamaron cromodulina (Yamamoto y col., 1988). Vincent (2000) propone que después de que la insulina es liberada rápidamente a la circulación (Figura 7A), 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 7B). Cuando el CrIII es liberado en el citoplasma, cuatro iones se unen a la forma inactiva de la cromodulina (apocromodulina) (Figura 7C). La cromodulina se une a la parte interna del receptor de insulina e induce un cambio conformacional (Figura 7D). 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.

Tabla 2. Proporción de CrIII en algunos alimentos (Tomada y modificada de Gómez y Magaña, 2003; Havel, 2004).

Alimento	Tamaño por porción	Cromo por porción (µg)
Margarina	1 porción	0.02-0.1
Leche entera	1 taza	0.1
Mantequilla	1 porción	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
Brócoli	½ taza	0.9-11.0
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

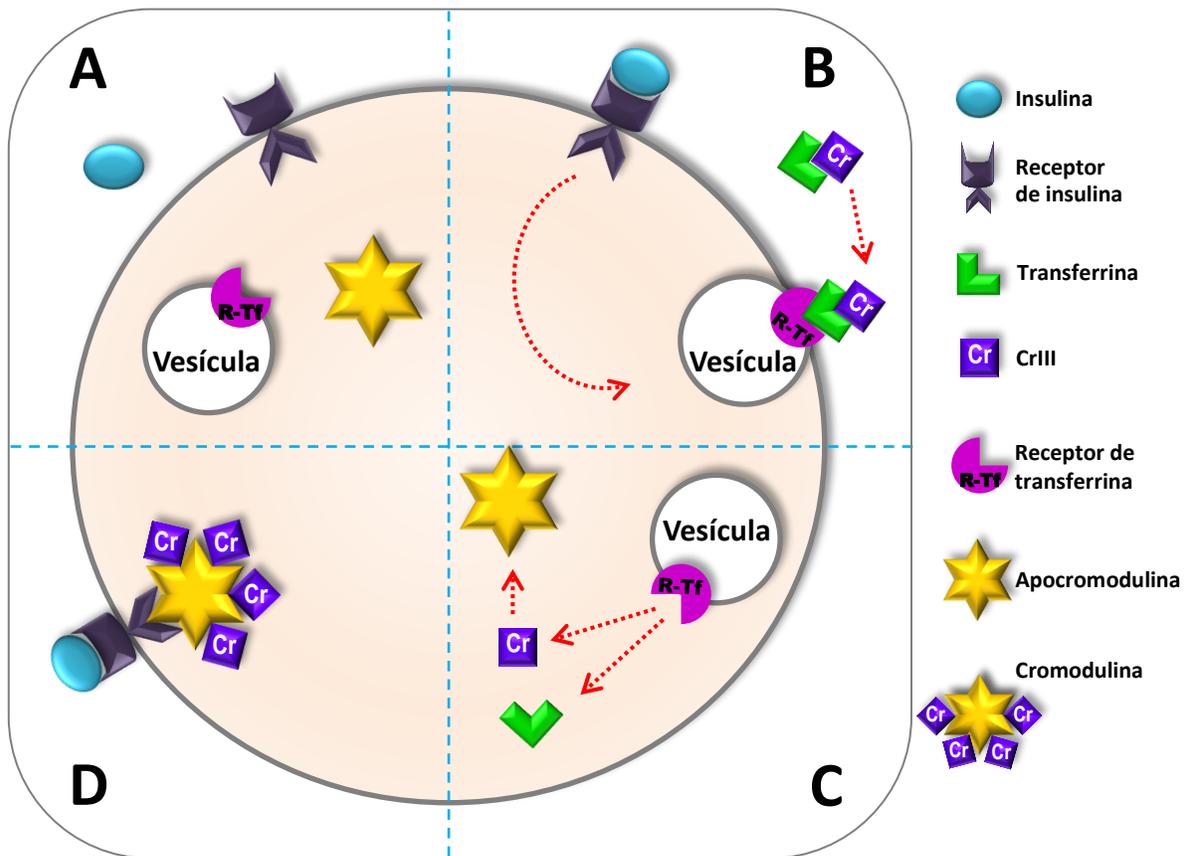


Figura 7. Esquema que muestra el mecanismo propuesto para el ingreso de CrIII presente en la sangre al interior de la célula y la formación de cromodulina (Tomado y modificado de Vincent, 2000).

8. Efectos del picolinato de cromo

El PicCr es un producto de venta libre en el mercado, comercializado como suplemento alimenticio capaz de disminuir la concentración de colesterol en plasma y promocionado como constructor muscular y reductor del apetito y la grasa corporal (Coleman, 1997; Campbell y col., 1999; Król y col., 2012). El PicCr se encuentra en presentaciones que van de la dosis recomendada para consumo humano, hasta 10 veces más (200-2000 µg/día) (NAS, 1989; ATSDR, 2000; Lamson y Plaza, 2002; Gómez y Magaña, 2003; Havel, 2004; <https://www.pharmcare.gr/vitamines-sympiromata/health-aid-chromium-picolinate-1800%CE%BCg-60%CF%84%CE%B1%CE%BC%CF%80%CE%BB%CE%AD%CF%84%CE%B5%CF%82-detail.html>).

El PicCr incrementa la biodisponibilidad del CrIII, ya que éste se absorbe de manera más eficiente (2 al 5%) respecto al obtenido de los alimentos (0.5 al 2%) (Havel, 2004; Gomes y col., 2005) por ser un quelato (complejo formado entre un agente quelante y un ion metálico) (Langwinsky y Patino, 2001).

Se ha mostrado que el PicCr induce aberraciones cromosómicas en las células de ovario de hámster chino (CHO) en cultivo (Stearns y col., 1995). En la rata la administración de PicCr por vía intravenosa provoca daño oxidante en el ADN, evaluado por el incremento de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) en la orina (Hepburn y col., 2003a). En *Drosophila melanogaster* se ha descrito el potencial genotóxico del PicCr, ya que la adición de este suplemento en el alimento incrementa la tasa de mutaciones letales y de hembras estériles (Hepburn y col., 2003b). En cultivo de linfocitos de humano, el PicCr se ha clasificado como citotóxico debido a que disminuye la viabilidad celular y la síntesis de ADN e incrementa el daño oxidante, la fragmentación del ADN y la apoptosis (Jana y col., 2009).

El PicCr tiene efectos fetotóxicos, ya que los fetos expuestos a PicCr durante la gestación, así como los fetos de hembras que fueron consumidoras de PicCr antes de la gestación, presentan mayor frecuencia de anormalidades esqueléticas (Bailey y col., 2006; Chávez, 2013). En células de la granulosa de mujer, el PicCr muestra ser un disruptor endócrino con comportamiento hormético sobre la secreción de 17β -estradiol (Ortega, 2011). La administración diaria de PicCr en ratones hembra adultos, disminuye la respuesta ovulatoria y la tasa de fertilidad (Chávez, 2013; Espinosa, 2016; Marín, 2017). En jóvenes adultos sanos, la ingesta diaria de PicCr en dosis recomendada durante 21 días disminuye la calidad espermática, ya que reduce la movilidad, vitalidad y morfología espermática (Cuapio y col., 2009), siendo el análisis de estos parámetros (espermatobioscopía) el estudio más importante en la evaluación de la fertilidad masculina (Acosta y col., 2016).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El PicCr es un suplemento alimenticio que se promociona por quemar la grasa corporal y aumentar la masa muscular. El PicCr es de venta libre en el mercado en presentaciones que van de la dosis recomendada para consumo humano hasta diez veces más y sin supervisión médica, lo cual ha llevado al uso y abuso en su consumo, ya sea en dosis elevadas, por tiempos prolongados o ambos.

Previamente mostramos en células de la granulosa de mujer, que el PicCr actúa como un disruptor endócrino. También que la ingesta diaria de PicCr por jóvenes adultos sanos disminuye progresivamente los parámetros seminales en un lapso de 21 días.

Si consideramos que la infertilidad es una enfermedad que va en aumento en el mundo y que alrededor del 40% de las parejas infértiles están asociadas al factor masculino, es claro que se requieren estudios sobre los efectos que el PicCr pueda tener sobre la salud reproductiva masculina.

Por ello, en este estudio se analizaron los efectos de la ingesta diaria y prolongada de diferentes dosis de PicCr sobre el peso corporal y de los órganos reproductores, los parámetros seminales y la concentración de testosterona en suero, utilizando como modelo al ratón macho. Además, se evaluó si los efectos del PicCr sobre la calidad espermática y la esteroidogénesis persisten aún después de suspender la ingesta del suplemento.

HIPÓTESIS

Si en el varón el consumo de picolinato de cromo es capaz de disminuir la calidad espermática, entonces en el ratón macho adulto la ingesta diaria de la dosis equivalente a la recomendada para consumo humano (uso) y diez veces más (abuso) de PicCr por uno o tres ciclos espermáticos resultará en la disminución de los parámetros seminales y la esteroidogénesis. Dichos efectos se normalizarán al suspender la ingesta del suplemento.

OBJETIVOS

1. Analizar los efectos de la ingesta diaria de PicCr por 35 días (un ciclo espermático) sobre el peso corporal, de testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata; la concentración, viabilidad, movilidad y morfología espermáticas, así como la concentración de testosterona en suero.
2. Analizar los efectos de la ingesta diaria y prolongada de PicCr por 105 días (tres ciclos espermáticos) sobre el peso corporal, de testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata; la concentración, viabilidad, movilidad y morfología espermáticas, así como la concentración de testosterona en suero.
3. Analizar el peso corporal, de testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata; la concentración, viabilidad, movilidad y morfología espermáticas y la concentración de testosterona en suero después de 35 días de suspender la ingesta prolongada de picolinato de cromo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) macho adultos (10 semanas de edad) de la cepa CD-1 (Harlan-México) mantenidos en condiciones convencionales de bioterio, con fotoperíodo de 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces de 5:00 a 19:00 h), 40% de humedad, 21±2°C de temperatura y libre acceso al agua y al alimento. Se formaron grupos experimentales de 10±2 animales. Todos los experimentos se llevaron a cabo en estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. El Comité de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, aprobó el protocolo de investigación.

Tratamientos con PicCr

Se utilizó el PicCr disponible comercialmente para consumo humano (General Nutrition Center, México [GNC]) en presentación de tabletas de 500 mg con 200 µg de PicCr cada una. Las concentraciones de PicCr se determinaron a partir de la dosis recomendada para consumo humano (200 µg de PicCr por día para un peso corporal aproximado de 60 Kg) (NAS, 1989; ATSDR, 2000). En el cuadro 1 se muestran las concentraciones de PicCr administradas en un volumen de 50 µl de aceite de maíz (vehículo [Vh]) por ratón con un peso corporal aproximado de 40 g.

Cuadro 1. Concentraciones de PicCr empleadas en los tratamientos.

	No. de veces a partir de la dosis recomendada	PicCr µg/50 µl/ratón/día
USO	1	0.12
ABUSO	10	1.2

El PicCr se administró por vía oral con la ayuda de un combitubo (eppendorf) (Brinkmann Instruments, Ltd. Canadá) de 2.5 ml acoplado a un repipeteador (eppendorf). La administración del compuesto se realizó diario entre las 9:00 y 10:00 h.

Grupos experimentales

Testigo: animales que no se sometieron a tratamiento alguno y se sacrificaron a la misma edad que los animales con tratamiento.

Vehículo: animales que se sometieron a la ingesta diaria de aceite de maíz por 35 o 105 días y se sacrificaron al término del tratamiento o 35 días después.

0.12 µg de PicCr: animales que se sometieron a la ingesta diaria del suplemento por 35 o 105 días y se sacrificaron al término del tratamiento o 35 días después.

1.2 µg de PicCr: animales que se sometieron a la ingesta diaria del suplemento por 35 o 105 días y se sacrificaron al término del tratamiento o 35 días después.

Cuantificación de la concentración de testosterona en suero

En todos los grupos experimentales se cuantificó la concentración de testosterona en suero empleando el kit DRG Testosterona ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (DRG International, Inc., USA). La sangre se obtuvo por punción cardiaca entre las 9:00 y 10:00 h, se centrifugó a 3000 rpm por 20 min y se recuperó el suero. De cada muestra de suero se tomaron 25 µl y se colocaron en los pocillos de la placa de ELISA, así como los estándares para realizar la curva patrón. Se adicionaron 200 µl del conjugado enzimático a cada pocillo, se mezcló por 10 segundos y se incubó por 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente las placas se lavaron tres veces con solución de lavado diluida (400 µl por pocillo) y se realizó un golpe seco de la placa contra papel absorbente para eliminar las gotas residuales. Se adicionaron 200 µl de solución de sustrato a cada pocillo y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Finalmente se detuvo la reacción enzimática adicionando a cada

pocillo 100 µl de solución de paro. Se determinó la absorbancia a 450 ± 10 nm con un lector de microplacas dentro de los 10 min siguientes a la adición de la solución de paro. Se realizó una curva patrón mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada estándar frente a su concentración y a partir de ésta curva, se obtuvieron las concentraciones usando el valor de absorbancia. La cuantificación de testosterona se realizó en el Laboratorio de Hormonas Esteroides del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

DISEÑO EXPERIMENTAL

Experimento I: Evaluación del peso corporal y de los testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata; de los parámetros seminales y de la concentración de testosterona en suero de animales sometidos a la ingesta diaria de PicCr por 35 días.

Se utilizaron animales de los cuatro grupos experimentales. Los tratamientos con Vh o PicCr se realizaron por 35 días. Todos los animales se pesaron al inicio del tratamiento y cada semana hasta el día del sacrificio. La sangre se obtuvo por punción cardíaca y se procesó como se indicó anteriormente para la cuantificación de testosterona en suero. A la autopsia se disecaron y pesaron en balanza de precisión los testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata.

La colecta de espermatozoides se realizó de los conductos deferentes colocando la muestra en 1 ml de solución Tyrode's (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) mantenida a 37°C en baño de agua.

En cada muestra espermática se analizaron los siguientes parámetros:

Concentración: Se colocaron 10 µl de la muestra seminal en la cámara de Neubauer, bajo el microscopio óptico a 400X se contaron los espermatozoides presentes en 5 campos y se multiplicó por el factor correspondiente (10^6).

Viabilidad: En un portaobjetos se realizó una dilución 1:1 empleando 10 µl de la muestra espermática y 10 µl de solución de eosina B (Sigma-Aldrich) al 0.5% en solución salina y se colocó un cubreobjetos. Se contaron 200 espermatozoides a 400X empleando el criterio de inclusión-exclusión, donde los teñidos de color rojo se consideraron no viables y los no teñidos y translucidos, viables.

Movilidad: Se colocaron 10 µl de la muestra espermática sobre un portaobjetos a 37°C. Se contabilizaron 200 espermatozoides a 400X, distinguiendo entre móviles y no móviles.

Morfología: En un portaobjetos, se realizó un frotis de la muestra espermática, se dejó secar a temperatura ambiente y se tiñó con hematoxilina-eosina. Se analizaron 250 espermatozoides 400X. Se consideró como anormal, aquel espermatozoide que presentó alteraciones morfológicas en cabeza y flagelo (Wyrobek y Bruce, 1975; Sakamoto y Hashimoto, 1986; La Maestra y col., 2015) (Figura 8).

Todas las evaluaciones de los parámetros seminales se llevaron a cabo por duplicado.

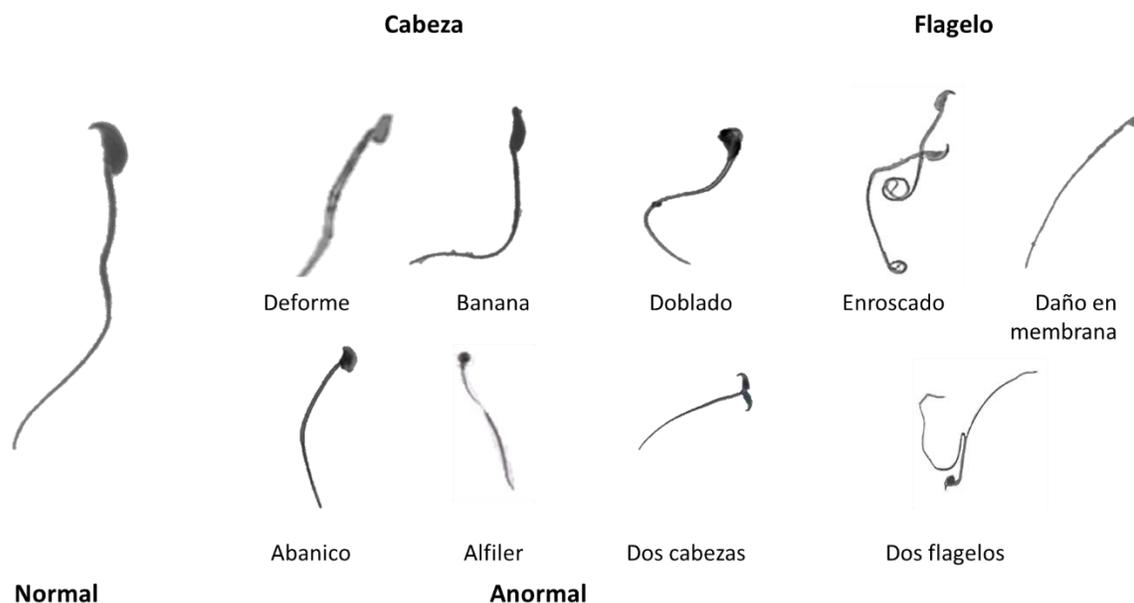


Figura 8. Morfología espermática (Tomado y modificado de Wyrobek y Bruce, 1975; Sakamoto y Hashimoto, 1986; La Maestra y col., 2015).

Experimento II: Evaluación del peso corporal y de los testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata; de los parámetros seminales y de la concentración de testosterona en suero de animales sometidos a la ingesta diaria y prolongada de PicCr por 105 días.

Se usaron ratones de los cuatro grupos experimentales. La ingesta de Vh o PicCr se llevó a cabo por 105 días. Se realizó el seguimiento del peso corporal al igual que en el experimento anterior. La sangre se colectó y se procesó para la cuantificación de testosterona en suero. A la autopsia se disecaron y pesaron en balanza de precisión los testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata. Las muestras espermáticas obtenidas se procesaron como se detalló previamente.

Experimento III. Evaluación del peso corporal y de los testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata; de los parámetros seminales y de la concentración de testosterona en suero después de 35 días de suspender la ingesta prolongada de PicCr.

Se utilizaron animales sometidos a la ingesta diaria de 0.12 y 1.2 μg de PicCr por 105 días. Todos los animales se sacrificaron 35 días después de haber terminado el período de tratamiento.

Se registró el peso corporal desde el inicio del tratamiento hasta el sacrificio. Los órganos y las muestras espermáticas y de suero se obtuvieron y procesaron de la misma forma que en el experimento I.

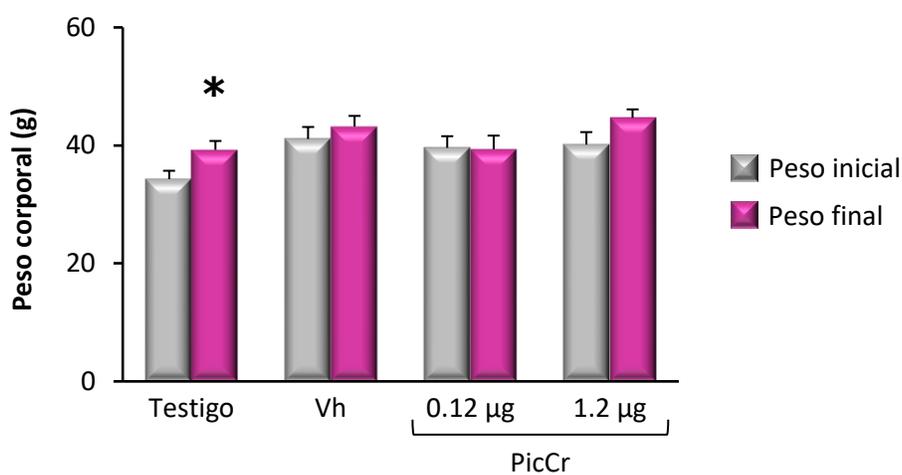
Análisis estadístico

El peso corporal se expresó en gramos y el peso de los testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata en miligramos/10 g de peso corporal (peso relativo). Los datos de la concentración espermática en millones/ml. Los resultados de espermatozoides viables, móviles y con morfología normal se expresaron en porcentaje y la concentración de testosterona en ng/ml. Los resultados se muestran como media \pm e.e.m. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de "t" de Student empleando el paquete estadístico GraphPad InStat 3. Se consideraron como significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor al 0.05.

RESULTADOS

Efectos de la ingesta diaria de PicCr por 35 días sobre el peso corporal, de testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata; los parámetros seminales y la concentración de testosterona en suero.

El peso corporal al finalizar los tratamientos con Vh o PicCr (0.12 y 1.2 μg) no mostró diferencias significativas respecto al peso inicial. Sin embargo, en el grupo testigo el peso corporal registrado 35 días después del peso inicial fue significativamente mayor (Figura 9).



* $p < 0.05$ vs Peso inicial

Figura 9. Media \pm e.e.m. del peso corporal inicial y final de ratones macho adultos sin tratamiento (testigo) o sometidos a la ingesta de vehículo (Vh) o PicCr (0.12 y 1.2 μg) por 35 días.

La masa testicular de los grupos testigo y Vh fue similar. En los animales sometidos a la ingesta de 0.12 μg de PicCr, el peso de los testículos fue significativamente mayor comparado con el Vh, mientras que en los animales tratados con 1.2 μg de PicCr fue menor al resto de los grupos experimentales. El peso de los epidídimos después del tratamiento con Vh o

0.12 μg de PicCr por 35 días fue menor comparado con el testigo. En los animales con ingesta de 1.2 μg de PicCr, el peso de los epidídimos fue menor respecto a los demás grupos. El peso de las vesículas seminales fue similar entre los grupos experimentales. Respecto al peso de la próstata, únicamente el Vh mostró diferencias estadísticas comparando con el testigo (Figura 10).

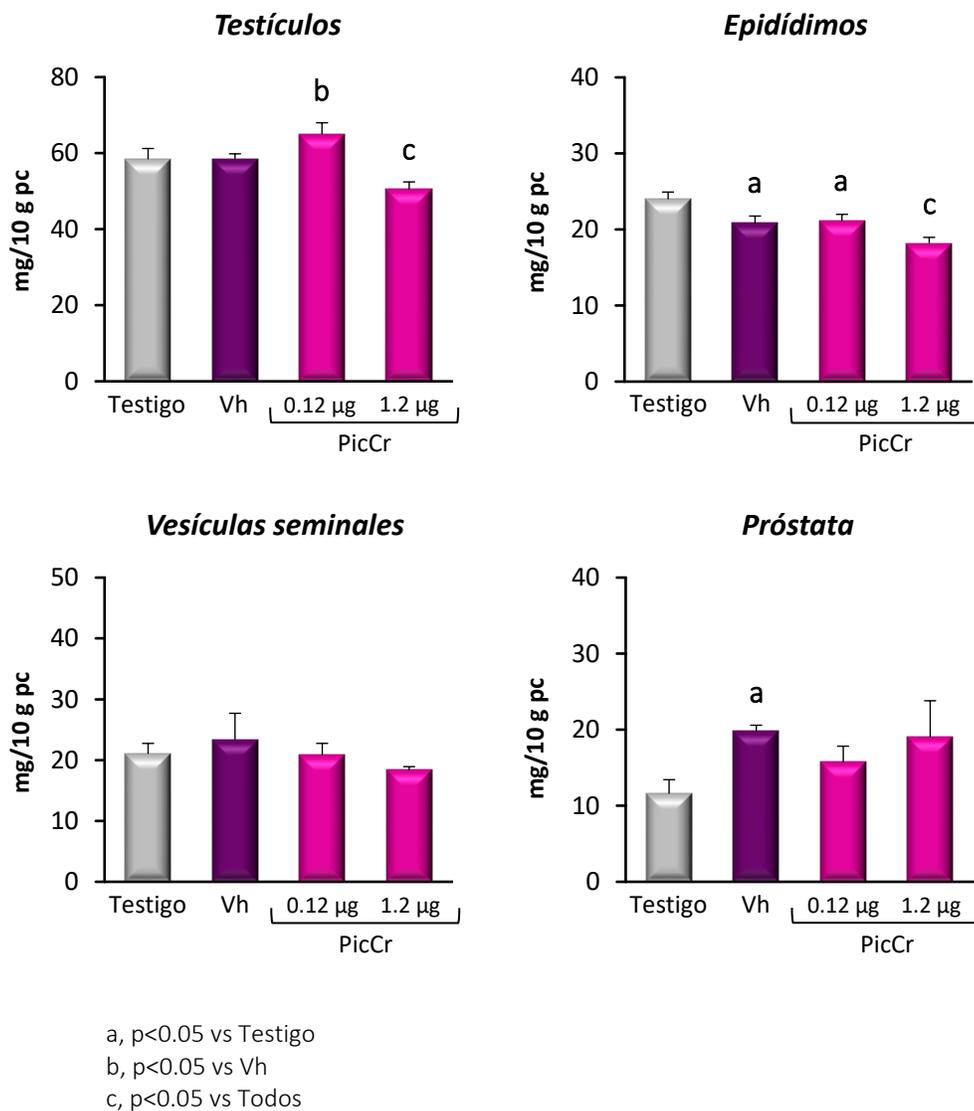


Figura 10. Media \pm e.e.m. del peso de los testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata de ratones adultos sin tratamiento (testigo) o sometidos a la ingesta de vehículo (Vh) o PicCr (0.12 y 1.2 μg) por 35 días.

En cuanto a los parámetros seminales, los machos tratados con Vh por 35 días no mostraron diferencias significativas en relación al testigo, independientemente del parámetro evaluado. Sin embargo, el número de espermatozoides fue significativamente menor en los animales con ingesta de 1.2 µg de PicCr comparado con el grupo con Vh. La frecuencia de espermatozoides móviles por la ingesta de 0.12 µg de PicCr fue significativamente menor respecto al Vh. La viabilidad y morfología espermáticas fueron similares entre los grupos experimentales independientemente del tratamiento (Figura 11).

La concentración de testosterona en el suero de los animales tratados con Vh mostró una tendencia al aumento respecto al grupo testigo, aunque no llegó a valores estadísticamente significativos, mientras que con la ingesta de PicCr, la concentración de testosterona fue significativamente menor al grupo Vh, independientemente de la dosis del suplemento (Figura 12).

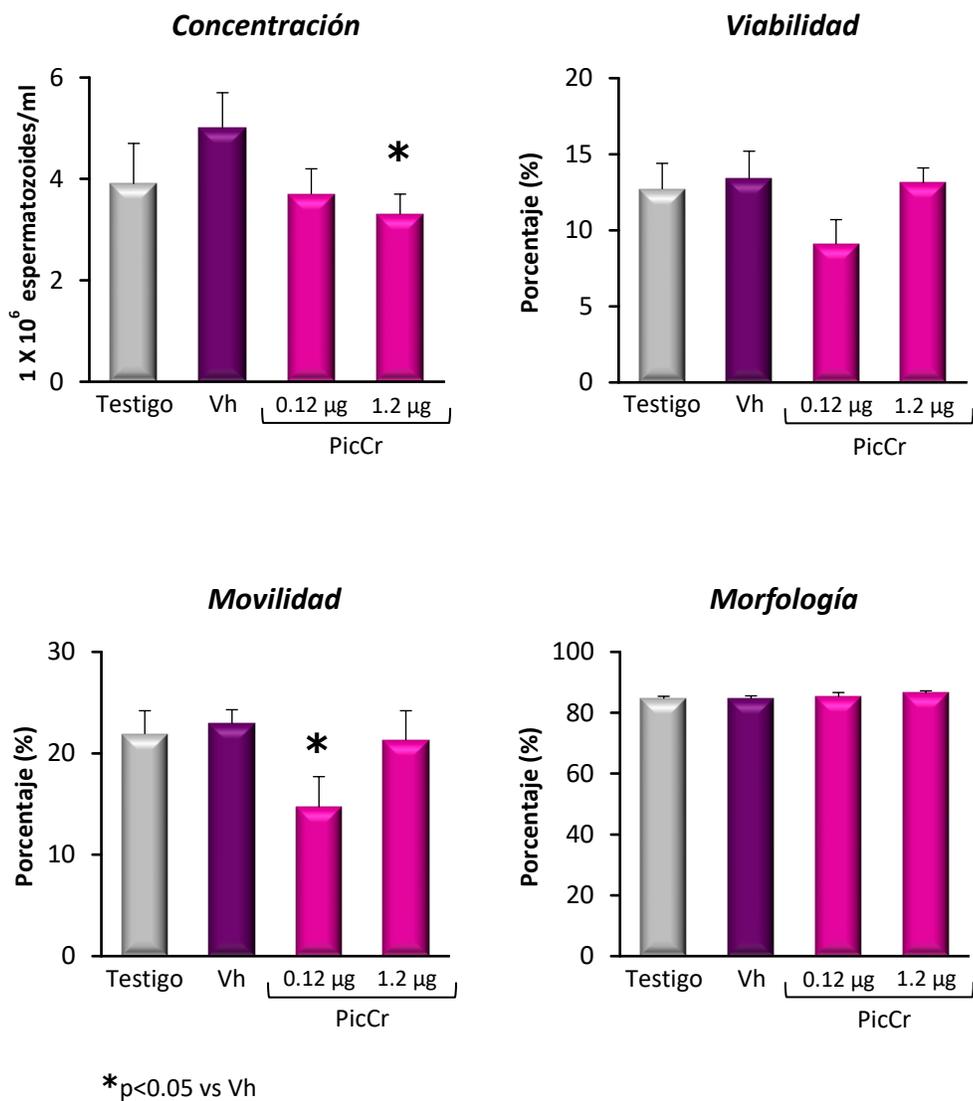


Figura 11. Media ± e.e.m. de la concentración, viabilidad, movilidad y morfología espermáticas de ratones adultos sin tratamiento (testigo) o sometidos a la ingesta de vehículo (Vh) o PicCr (0.12 y 1.2 µg) por 35 días.

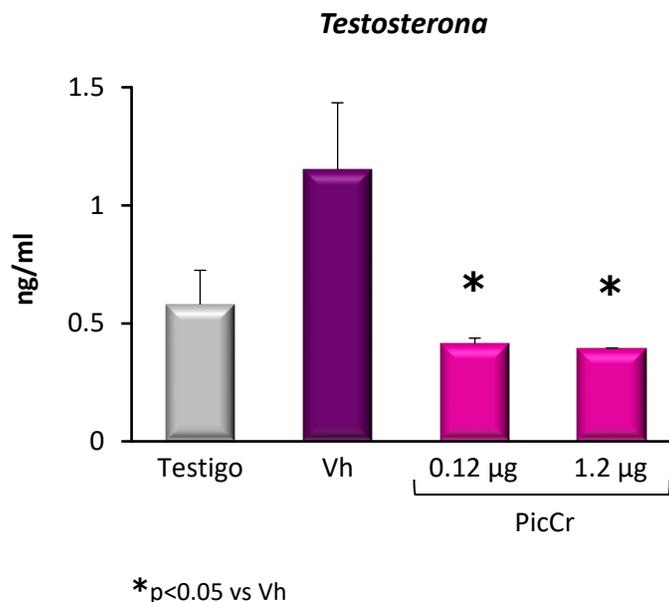
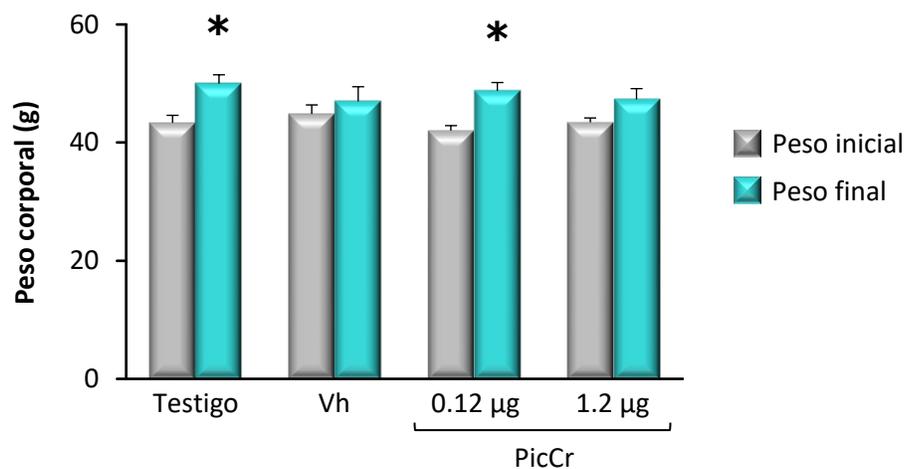


Figura 12. Media \pm e.e.m. de la concentración de testosterona en el suero de ratones macho adultos sin tratamiento (testigo) o sometidos a la ingesta de vehículo (Vh) o PicCr (0.12 y 1.2 μ g) por 35 días.

Efectos de la ingesta diaria y prolongada de PicCr por 105 días sobre el peso corporal, de testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata; los parámetros seminales y la concentración de testosterona en suero.

El peso corporal final después de 105 días de tratamiento con Vh o 1.2 μ g de PicCr, fue similar al peso inicial. En el grupo sometido a la ingesta de 0.12 μ g de PicCr, así como en los animales sin tratamiento, el peso corporal final fue mayor respecto al peso inicial (Figura 13).



* $p < 0.05$ vs Peso inicial

Figura 13. Media \pm e.e.m. del peso corporal inicial y final de ratones macho adultos sin tratamiento (testigo) o sometidos a la ingesta de vehículo (Vh) o PicCr (0.12 y 1.2 μg) por 105 días.

En todos los grupos experimentales no se observaron diferencias significativas en el peso de los testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata (Figura 14).

Los parámetros seminales de los animales testigo y los tratados con Vh, no mostraron diferencias significativas. La concentración, viabilidad y movilidad espermáticas de los machos sometidos al tratamiento diario de 0.12 μg de PicCr por 105 días fueron significativamente menores respecto al resto de los grupos experimentales. La ingesta de 1.2 μg de PicCr resultó en una menor frecuencia de espermatozoides móviles comparada con el grupo testigo (Figura 15).

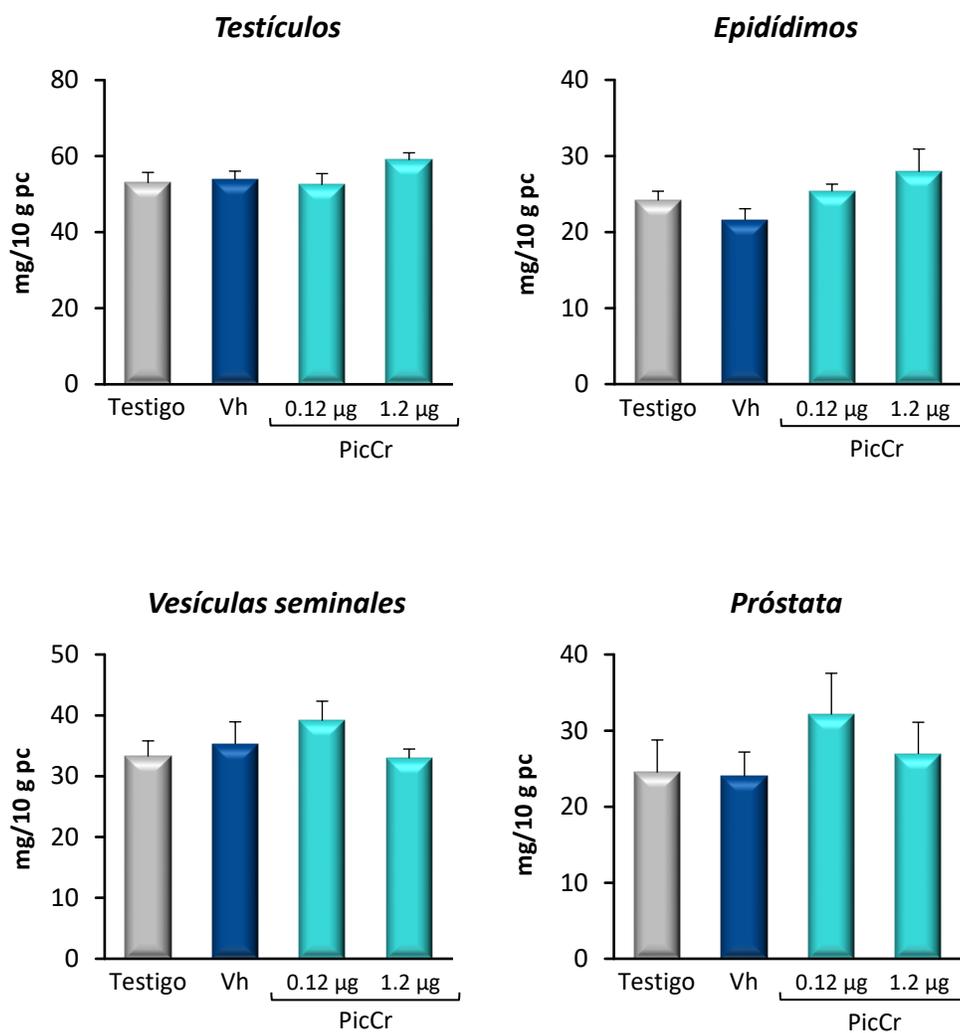


Figura 14. Media \pm e.e.m. del peso de los testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata de ratones adultos sin tratamiento (testigo) o sometidos a la ingesta de vehículo (Vh) o PicCr (0.12 y 1.2 μ g) por 105 días.

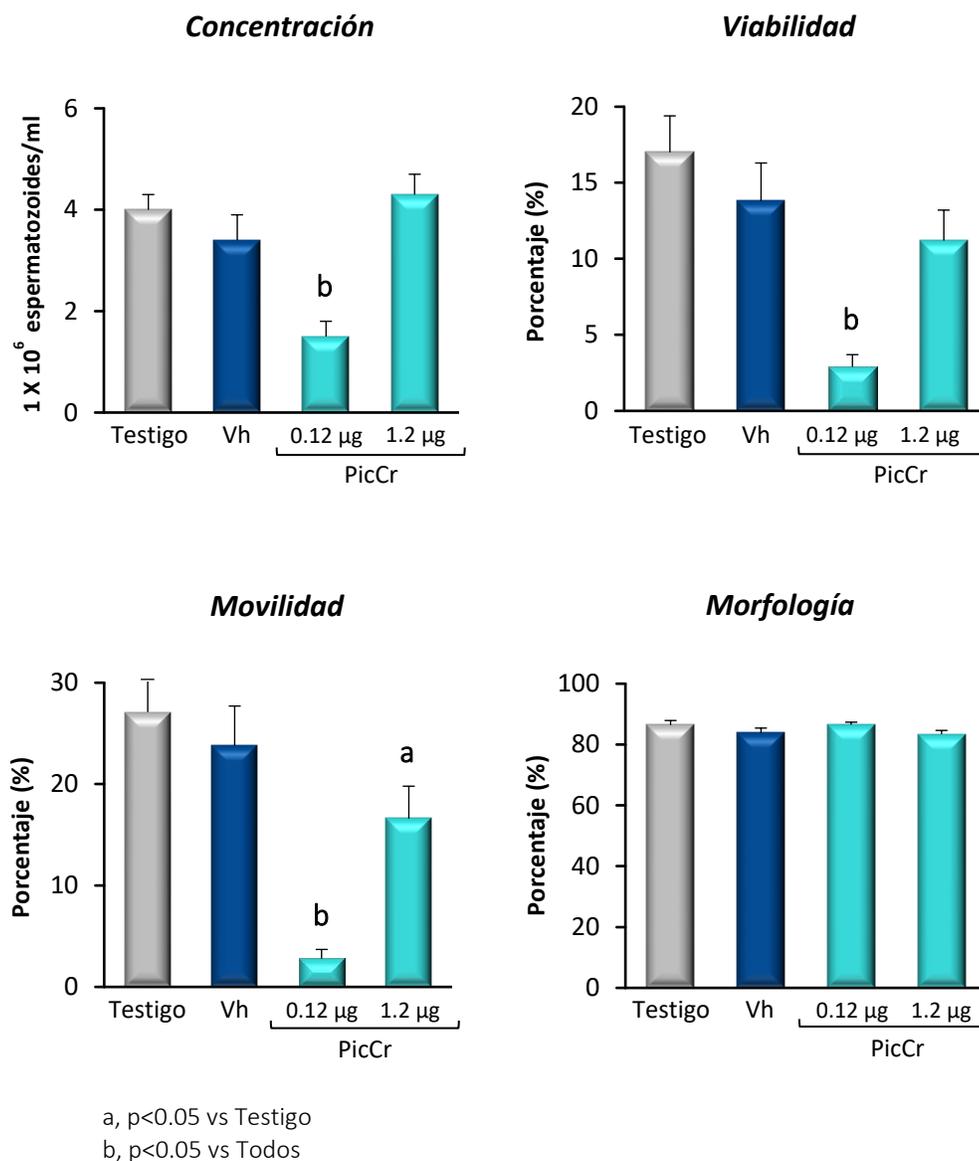
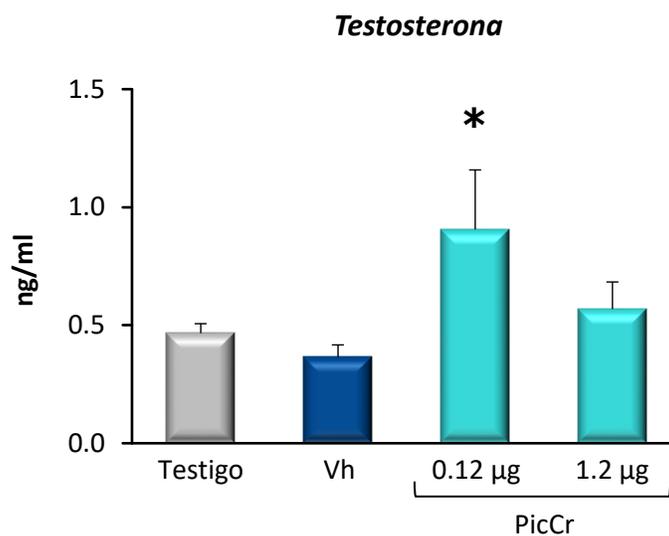


Figura 15. Media \pm e.e.m. de la concentración, viabilidad, movilidad y morfología espermáticas de ratones adultos sin tratamiento (testigo) o sometidos a la ingesta de vehículo (Vh) o PicCr (0.12 y 1.2 μ g) por 105 días.

La concentración de testosterona en el grupo tratado con 0.12 μ g de PicCr fue mayor respecto al grupo Vh (Figura 16).

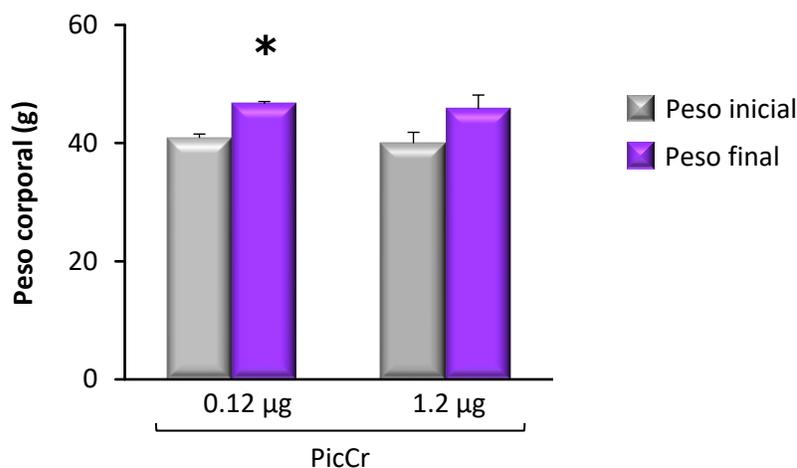


* $p < 0.05$ vs Vh

Figura 16. Media \pm e.e.m. de la concentración de testosterona en el suero de ratones macho adultos sin tratamiento (testigo) o sometidos a la ingesta de vehículo (Vh) o PicCr (0.12 y 1.2 μ g) por 105 días.

Análisis del peso corporal y de los testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata; de los parámetros seminales y de la concentración de testosterona en suero después de 35 días de suspender la ingesta prolongada de PicCr.

El peso corporal de los animales después de 35 días de haber suspendido el tratamiento con 0.12 μ g de PicCr fue mayor en relación al peso al iniciar el tratamiento (Figura 17).



* $p < 0.05$ vs Peso inicial

Figura 17. Media \pm e.e.m. del peso corporal inicial y final de ratones macho adultos sometidos a la ingesta de PicCr (0.12 y 1.2 μg) por 105 días y sacrificados 35 días después de suspendido el tratamiento.

El peso de los testículos, epidídimos y próstata de los animales con ingesta de PicCr, no mostró diferencias significativas con el registrado 35 días después de suspendida la ingesta del suplemento, independientemente de la concentración. Sin embargo, el peso de las vesículas seminales fue significativamente menor al obtenido al término del tratamiento por 105 días (Figura 18).

En cuanto a los parámetros seminales, después de 35 días de haber suspendido el tratamiento con 0.12 μg de PicCr, la concentración, viabilidad y movilidad espermáticas fueron significativamente mayores respecto a las obtenidas al término del tratamiento. Sin embargo, el número de espermatozoides 35 días pos-tratamiento fue menor comparado con el grupo sometido a la ingesta de 1.2 μg de PicCr. La proporción de espermatozoides con morfología normal fue similar al término del tratamiento y 35 días después (Figura 19).

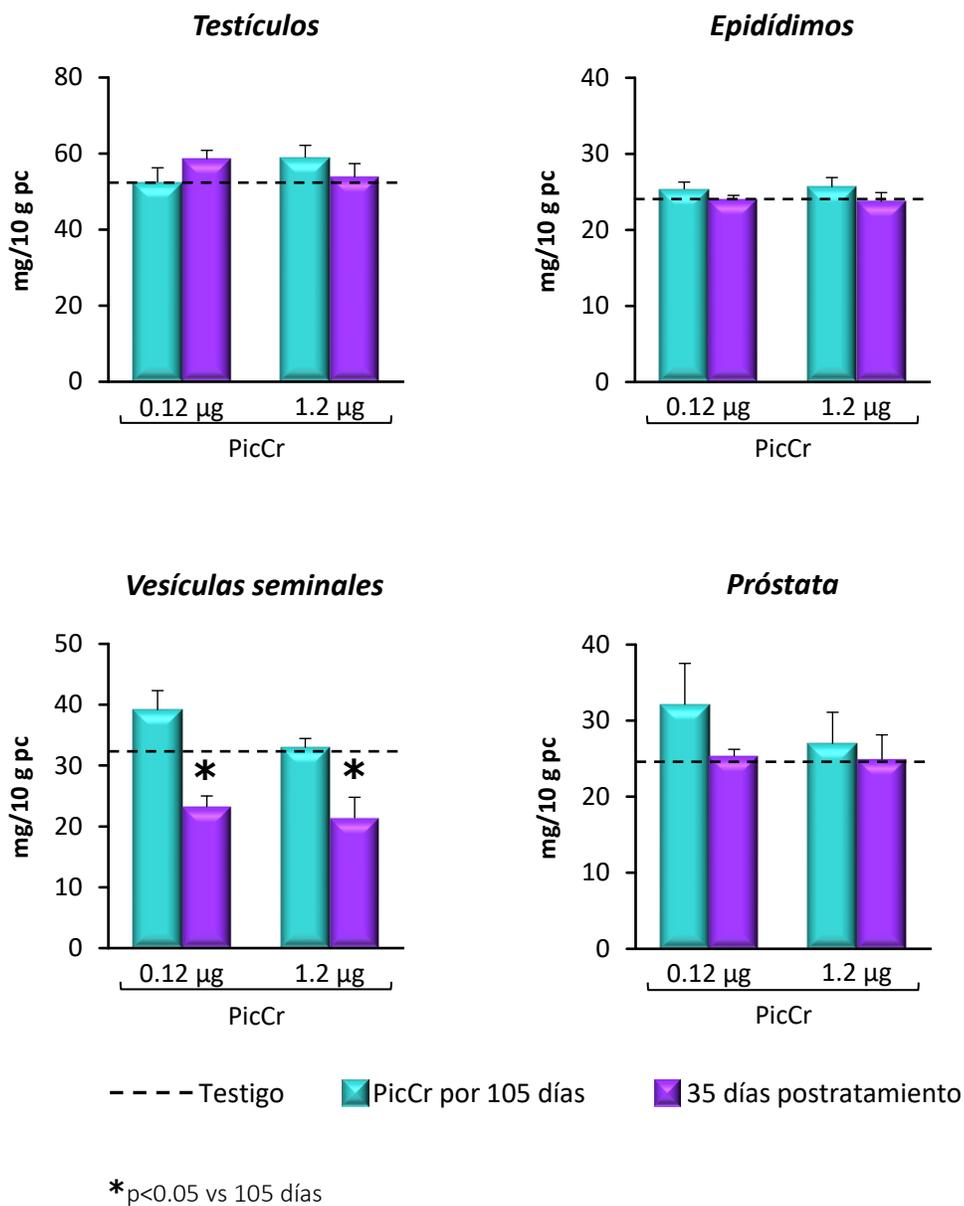


Figura 18. Media \pm e.e.m. del peso de los testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata de ratones adultos sometidos a la ingesta de PicCr (0.12 o 1.2 μ g) por 105 días y sacrificados al término del tratamiento o 35 días después de haberlo suspendido.

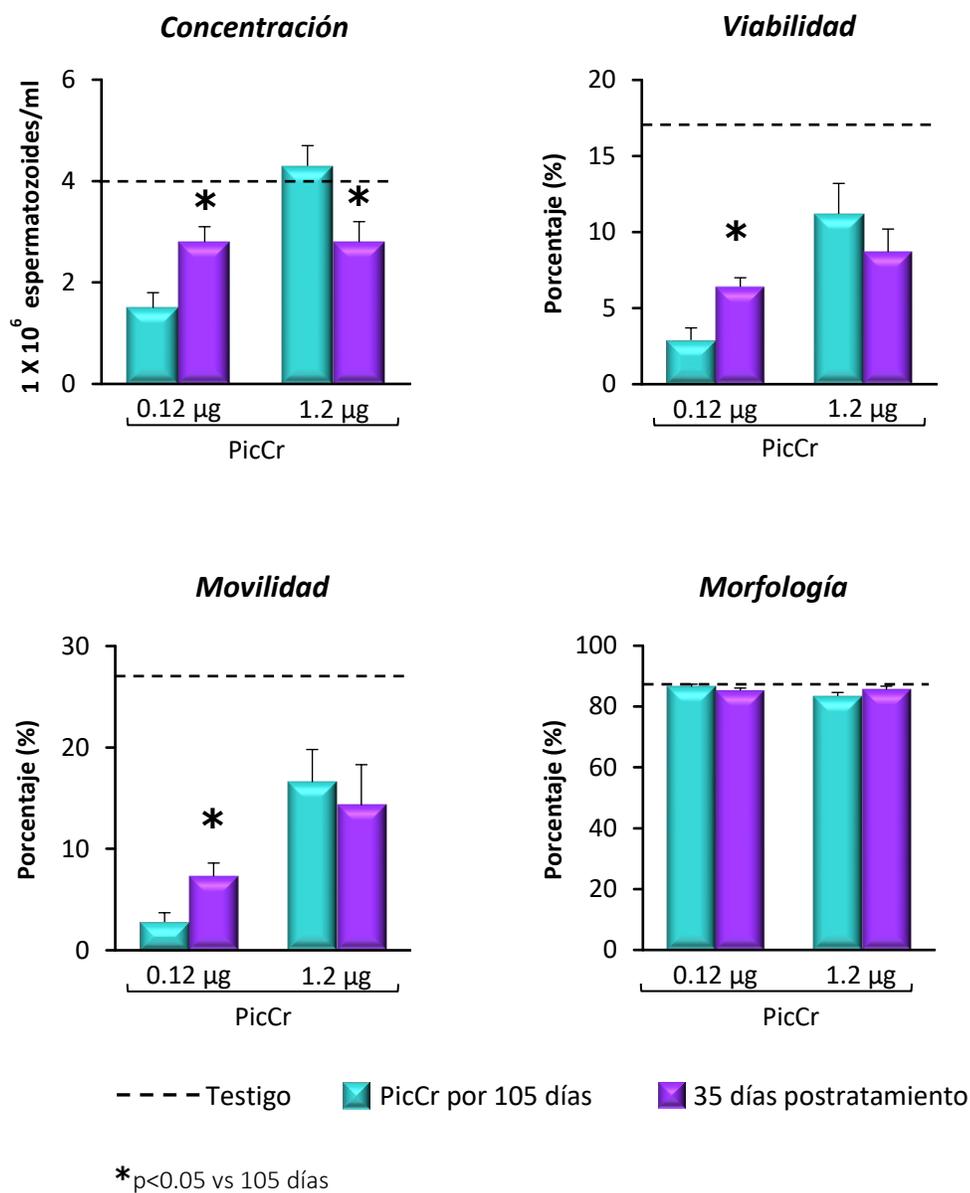


Figura 19. Media \pm e.e.m. de la concentración, viabilidad, movilidad y morfología espermáticas de ratones adultos sometidos a la ingesta de PicCr (0.12 y 1.2 µg) por 105 días y sacrificados al término del tratamiento o 35 días después de haberlo suspendido.

La concentración de testosterona en suero no presentó diferencias significativas 35 días después de haber suspendido el consumo de este suplemento (Figura 20).

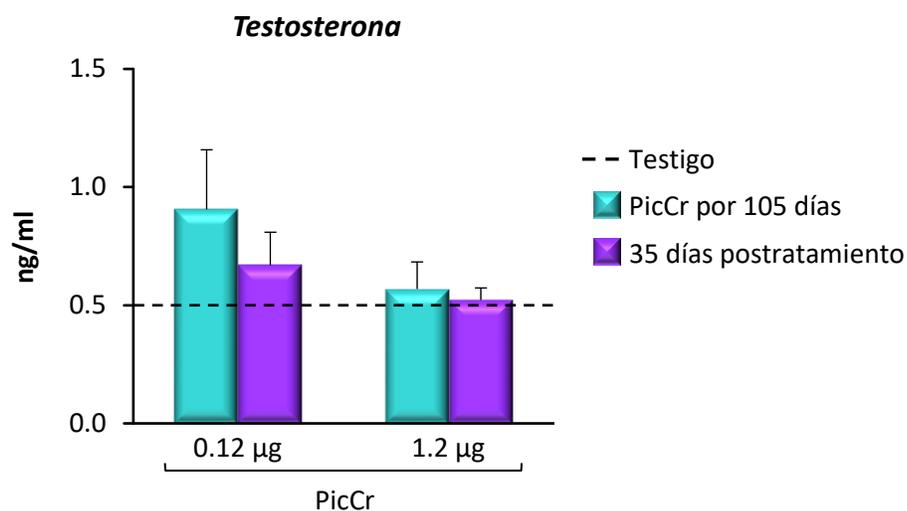


Figura 20. Media \pm e.e.m. de la concentración de testosterona en el suero de ratones macho adultos sometidos a la ingesta de PicCr (0.12 y 1.2 μ g) por 105 días y sacrificados al término del tratamiento o 35 días después de haberlo suspendido.

DISCUSIÓN

Los resultados muestran que la ingesta diaria de PicCr en la dosis similar a la recomendada para consumo humano y por un ciclo espermático, reduce la movilidad espermática. Si la ingesta del suplemento se prolonga a tres ciclos el daño es mayor, ya que disminuyen la mayoría de los parámetros seminales. El tratamiento con PicCr en la concentración diez veces más alta que la recomendada, también modifica los parámetros seminales, pero sus efectos dependen del tiempo de ingesta. La esteroidogénesis resulta afectada por el tratamiento con PicCr. Al suspender la ingesta del suplemento no se observa la recuperación de los parámetros a valores normales.

Los efectos del consumo de PicCr sobre la composición corporal es un tema controversial (González y col., 2006). Evans y Bowman (1992) le atribuyen efectos benéficos derivados de su acción sobre la insulina, lo que se traduce en aumento de la masa magra y disminución de la grasa y del peso corporal (Coleman, 1997), mientras que Caffaratti y Briñon (2005) indican que el PicCr no incrementa la masa muscular a un grado mayor al que se logra con una dieta saludable y ejercicio físico. Cuapio y col. (2009) mostraron en varones adultos jóvenes que la ingesta de 200 µg de PicCr por 21 días no modificó el peso corporal. Lo mismo se observó en varones y mujeres que consumieron 1000 µg de PicCr/día por tres o seis meses (Yazaki y col., 2010). El peso corporal de ratas macho sometidas a la ingesta de 5, 25, 50 o 100 mg de PicCr/Kg de alimento por 20 semanas, no presentó diferencias (Anderson y col., 1997). También en la rata macho, la administración diaria de PicCr por vía intravenosa por 60 días en dosis 25 veces más alta que la recomendada para consumo humano, no modificó el peso corporal (Hepburn y col., 2003a). Bernao y colaboradores (2004) observaron que el peso corporal de ratas macho tratadas con 100 o 200 µg CrIII/día en forma de PicCr por 12 días mostró una tendencia al aumento, mientras que con la dosis de 500 µg/día CrIII como PicCr esta tendencia no se observó. Estas evidencias apoyan la interpretación acerca de los nulos

efectos del PicCr sobre el peso corporal, sean dosis altas o tiempos prolongados, como ocurrió en la mayoría de nuestros grupos con PicCr.

Sin embargo, el peso corporal de los ratones macho que fueron sometidos a la ingesta prolongada de PicCr en la dosis equivalente a la recomendada para consumo humano fue mayor al terminar el tiempo de tratamiento. En estudios previos mostramos que en la hembra del ratón la ingesta de 0.12 μg de PicCr por 40, 60 u 80 días, no modificó el peso corporal (Chávez, 2013; Espinosa, 2016; Marín 2017). Estas diferencias sexuales podrían estar vinculadas con la leptina de la que se ha descrito presenta dimorfismo sexual, debido a que la testosterona disminuye la expresión de su receptor (Ishikawa y col., 2007; Priego y col., 2009). Dicha hormona es sintetizada principalmente por los adipocitos y actúa en el hipotálamo disminuyendo el apetito y aumentando el gasto energético (reduce en el tejido adiposo la lipogénesis o producción de grasas y aumenta la lipólisis o uso de grasa acumulada para producir energía) (Friedman y Halaas, 1998; Münzberg y col. 2005; Cardinali, 2007). Lo anterior nos permite sugerir que el aumento en la concentración de testosterona en el suero de los animales tratados por tres ciclos espermáticos con 0.12 μg de PicCr, podría estar modificando la receptividad a la leptina (Yi y col., 2017), disminuyendo así la señal de saciedad, lo que se refleja en el aumento del peso corporal.

Rabia y colaboradores (2008) mostraron en la rata que el peso testicular es uno de los marcadores más significativos de alteraciones en la secreción de andrógenos, ya que la disminución en la concentración de testosterona condujo a menor masa testicular. Simanainen y colaboradores (2008) mostraron en el ratón que los órganos sensibles a andrógenos como los epidídimos, vesículas seminales y próstata disminuyeron de peso como resultado de la reducción androgénica. Una relación similar se observó en este estudio, ya que la ingesta de 1.2 μg de PicCr por 35 días resultó en menor concentración de testosterona

y menor peso de los testículos y epidídimos, eventos que además se acompañaron de disminución en la concentración espermática.

Se ha descrito a los compuestos de CrIII como inductores de alteraciones de la esteroidogénesis (Elbetieha y Al-Hamood, 1997; Ortega, 2011), el peso de las vesículas seminales parece ser un indicador de estas alteraciones hormonales. En ratones adultos el tratamiento por 12 semanas con CrCl₃ resultó en disminución del peso de las vesículas seminales (Elbetieha y Al-Hamood, 1997). Resultados semejantes se observaron en ratones adultos expuestos a CrCl₃ durante la gestación y la lactancia (Al-Hamood y col., 1998). Es probable que la disminución en el peso relativo de estas glándulas en los animales tratados con ambas dosis de PicCr y evaluados 35 días después sea el resultado de tales efectos, sin embargo aún se desconoce la vía por la cual esto ocurre.

La espermatobioscopía permite analizar la calidad de una muestra de semen y su potencial fertilizante (Vásquez y Vásquez, 2003). Los parámetros que se evaluaron fueron el número de espermatozoides, la viabilidad espermática, el porcentaje de espermatozoides móviles y la proporción de espermatozoides con morfología normal, ya que la alteración de uno o más de estos parámetros aumenta la probabilidad de infertilidad (OMS, 2010; Acosta y col., 2016).

Se ha identificado al PicCr como un compuesto hidrófobo, lipófilo y de carga neutra, lo que le permite atravesar las barreras hidrofóbicas como la membrana plasmática (Speetjens y col., 1999; Kareus y col., 2001). Hepburn y Vincent, (2003) mostraron que en el torrente sanguíneo el PicCr tiene una vida media de 30 minutos, ingresa intacto a órganos como el hígado, riñón y músculo esquelético en donde se disocia, liberándose el CrIII. En esta disociación participan agentes reductores que transforman el CrIII en CrII, momento en el cual se generan radicales libres (Speetjens y col., 1999; Levina y Lay, 2005). Las moléculas que son agentes oxidantes y son convertidas a radicales libres se denominan especies reactivas

de oxígeno (ERO) (Avello y Suwalsky, 2006). Un aumento del contenido intracelular de ERO que sobrepasa las defensas antioxidantes (sustancia que neutraliza la acción oxidante de los radicales libres), resulta en estrés oxidante, mismo que induce daño a diversas moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Kirchhoff, 1998; Gutteridge y Halliwell, 1999; Avello y Suwalsky, 2006).

Estudios realizados en humanos han mostrado que las variaciones en las ERO influyen en la fertilidad (Gallardo, 2007). En cultivo de linfocitos de humano, se ha mostrado que el PicCr incrementa las ERO, lo que se traduce en aumento de la apoptosis (Jana y col., 2009). La disminución en el número de espermatozoides observada en los animales tratados con PicCr, podría ser explicada por aumento en las ERO, que pudieron tener como células blanco a las espermatogonias e inducir apoptosis, lo que se manifestaría en menor concentración de espermatozoides. Sin embargo, como la ingesta del suplemento fue diaria, no podemos descartar que otros tipos celulares de la línea germinal también fueran dañados.

Las ERO no son intrínsecamente deletéreas, en las mitocondrias de los espermatozoides se producen por la reducción del O₂ durante la fosforilación. Sin embargo el incremento de estos radicales induce peroxidación lipídica, ocasionando permeabilización de las membranas plasmática y acrosómica y formación de poros, lo que conduce a la pérdida de la viabilidad, movilidad y capacidad fecundante del espermatozoide (Álvarez, 2001). En cultivo de linfocitos de humano y en cultivo de fibroblastos de pollo, la sobreproducción de ERO inducida por el PicCr resultó en la alteración del potencial de la membrana mitocondrial, liberación de Citocromo-C y activación de la caspasa 3, lo que culminó en apoptosis (Jana y col., 2009; Bai y col., 2014). Por lo que es factible proponer que el PicCr disminuye la viabilidad espermática por esta vía.

Hepburn y colaboradores (2003b) mostraron el potencial genotóxico del PicCr utilizando

Drosophila melanogaster como sistema biológico de prueba. En este estudio el PicCr adicionado al medio de cultivo provocó disminución en el número de pupas, retardo en el desarrollo de éstas y menor número de pupas que eclosionan de una manera dosis dependiente; el análisis de la tasa de mutaciones letales ligadas al cromosoma X indicó que el PicCr las aumenta en gran medida, así como la proporción de hembras estériles. En ratas macho, el tratamiento con PicCr por vía intravenosa por 60 días incrementó la producción de 8-OHdG, marcador del daño oxidante al ADN (Hepburn y col., 2003a) que se genera por la incorporación errónea del radical hidroxilo (OH) en vez de la guanina durante la replicación del ADN. Al momento de la reparación del ADN, se escinde el OH y se detecta en la orina (Shibutani y col., 1991; Cheng y col., 1992). Por otra parte se ha descrito que los mecanismos de reparación del ADN del espermatozoide son deficientes en la última etapa de la espermatogénesis (Marchetti y Wyrobek, 2005), por lo que los gametos que presentan daño en esta molécula durante su desarrollo, reducen su movilidad (Edwards, 2003). Es probable que la disminución de la proporción de espermatozoides móviles en los animales tratados con 0.12 µg de PicCr, ya sea por uno o tres ciclos espermáticos, esté vinculada con el daño al ADN durante la espermatogénesis vía la generación de ERO.

Las ERO también inactivan enzimas glucolíticas (Castillo y col., 2001; Álvarez, 2001), lo que provoca el bloqueo en la biosíntesis de ATP necesario para la contracción de los microtúbulos flagelares (Córdova y col., 2009). Considerando que la movilidad está relacionada con el paquete mitocondrial ubicado en la pieza media del espermatozoide (Kao y col., 1998), es probable que el PicCr esté disminuyendo este parámetro al reducir el aporte energético de la célula.

Cuando la relación dosis-respuesta de un compuesto dado, no sigue un patrón lineal y adopta formas de U, U invertida, J y sigmoidea, se dice que tiene un comportamiento hormético. En términos biológicos, la hormesis representa la sobrecompensación de una

célula u organismo para garantizar el mantenimiento de la homeostasis (Calabrese y Baldwin, 2002; Calabrese, 2004; Mattson, 2008). Este comportamiento ya ha sido descrito para el PicCr en el cultivo de células de la granulosa de mujer, donde la secreción de 17β -estradiol en respuesta a la adición de dosis crecientes de PicCr (0.3-300 ng/ml), presentó un comportamiento sigmoideo (Ortega, 2011). La respuesta ovulatoria de ratones tratados con PicCr en dosis de 1, 3, 5, 10 y 15 veces la equivalente a la recomendada para consumo humano mostró un comportamiento en forma de U (Chávez, 2013). Espinosa (2016) observó el mismo comportamiento del PicCr, en la respuesta ovulatoria en función del tiempo de ingesta (40, 60 y 80 días). Los resultados de los parámetros seminales evaluados en este estudio refuerzan el comportamiento hormético del PicCr, ya que no presentaron un patrón lineal, ni en respuesta a la dosis ni al tiempo de ingesta del PicCr, es decir con la ingesta prolongada de la dosis baja del suplemento se observó una considerable reducción en la mayoría de los parámetros seminales, lo que no ocurrió con la dosis alta.

Los resultados obtenidos en las espermatobioscopías muestran que con 0.12 μ g de PicCr por 35 días, la mayoría de los parámetros tienden a disminuir, no así con la dosis alta. Sin embargo en el análisis histológico de estos testículos se observó un menor número de espermatogonias, espermatoцитos (I y II) y espermátides en los animales tratados con la dosis alta de PicCr (Nieto, 2016). Con lo anterior, podemos sugerir que dosis altas de PicCr afectan las células de la línea germinal, mientras que la dosis equivalente a la recomendada para consumo humano provoca daño directo al espermatozoide, probablemente durante la espermiogénesis. El hecho que la concentración espermática aún se encuentre disminuida después de 35 días de haber suspendido el tratamiento prolongado con 1.2 μ g del suplemento, apoya esta interpretación.

Los espermatozoides con morfología normal son menos comunes en los humanos (<4%),

pero en muchos mamíferos este fenómeno es inverso (Knobill y Neill, 2006; OMS, 2010; Aragón y Altamirano, 2001). Durante la espermatogénesis los espermatozoides adquieren las bases estructurales que les permiten el movimiento y la capacidad de fertilización, dichas funciones son adquiridas mientras transitan por el epidídimo (Robaire y Hermo, 1988). En varones adultos jóvenes, la ingesta diaria de 200 µg de PicCr por 21 días disminuyó la frecuencia de espermatozoides con morfología normal (3.6 a 1.6%) (Cuapio y col., 2009). Dado que en el ratón la frecuencia de este parámetro es mayor al 90% (Aragón y Altamirano, 2001), las variaciones registradas no llegaron a valores significativos.

En jóvenes adultos, el consumo diario de 200 µg de PicCr por 21 días, resultó en disminución de la movilidad, vitalidad y morfología espermáticas; sin embargo, once días después de suspender la ingesta del suplemento (aproximadamente una séptima parte del ciclo espermático) se observó en todos estos parámetros, una tendencia a la recuperación que no alcanzó los valores normales en ese tiempo (Cuapio y col., 2009). Con la finalidad de evaluar una posible recuperación del daño ocasionado por la ingesta de PicCr en los parámetros seminales, se determinó un ciclo espermático como tiempo postratamiento. Los resultados muestran una clara recuperación de la concentración, viabilidad y movilidad espermáticas, considerando la disminución inducida por la ingesta de 0.12 µg de PicCr por 105 días. No obstante, al igual que en los varones, los parámetros seminales no llegaron a los valores normales.

Los disruptores endócrinos (DE) son agentes exógenos que interfieren con la síntesis, metabolismo o acción de las hormonas responsables de mantener la homeostasis (Kavlock y col., 1996; MPCA, 2008). Diversos metales se han definido como potenciales DE relacionados con la reducción de la fertilidad (MPCA, 2008; Iavicoli y col., 2009). Los estudios realizados por Ortega (2011) con células de la granulosa de mujer describen al PicCr como un DE con comportamiento hormético. Nuestros resultados ratifican estas características, ya que la

concentración de testosterona en respuesta al tratamiento con PicCr, no siguen un patrón lineal y aumentan o disminuyen independientemente de la dosis del suplemento y del tiempo de ingesta.

El mantenimiento de la función testicular depende de la secreción pulsátil de GnRH, LH y FSH y de la acción de ambas gonadotropinas sobre el testículo para promover la espermatogénesis y la esteroidogénesis (Tresguerres, 2010). Dichas funciones son reguladas por un sistema de retroalimentación negativa ejercido por la testosterona (Casabiell, 2006; Becerro, 2008), por lo que es posible que en los animales sometidos a la ingesta prolongada de 0.12 μg de PicCr, el aumento a más del doble en la concentración de este esteroide esté ejerciendo una inhibición sobre el eje hipotálamo-hipofisario que se reflejaría en la disminución de la mayoría de los parámetros seminales.

Con base en nuestros resultados y los de otros autores, en la figura 21 se muestra el modelo teórico del daño producido por la ingesta de PicCr que explicaría los efectos de este compuesto sobre los parámetros seminales.

1. El PicCr es un compuesto que ingresa íntegro a la célula debido a sus características lipofílicas (Speetjens y col., 1999; Kareus y col., 2001; Hepburn y Vincent, 2003).
2. Al interior de la célula el PicCr se disocia y libera el CrIII, lo que genera radicales libres como las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Hepburn y Vincent, 2003).
3. El CrIII es reducido a CrII por agentes biológicos como el ascorbato, lo que también forma ERO (Speetjens y col., 1999; Levina y Lay, 2005).
4. Las ERO dañan el ADN nuclear (Hepburn y col., 2003). **A)** Incorporación errónea del radical hidroxilo (OH^\cdot) en vez de la guanina durante la replicación del ADN; **B)** Rupturas de la cadena del ADN por escisión del enlace fosfodiéster o de la región desoxirribosa.

5. Las ERO alteran el potencial de membrana mitocondrial. **A)** Desencadenan la vía apoptótica (Jana y col., 2009; Bai y col., 2014); **B)** Inactivan enzimas glucolíticas bloqueando la síntesis de ATP (Castillo y col., 2001; Álvarez, 2001; Córdova y col., 2009).

El incremento en la producción de ERO por la ingesta de PicCr podría alterar la actividad funcional de las células de la línea germinal, ya sea por daño al ADN, apoptosis o disminución del aporte energético necesario para la contracción de los microtúbulos flagelares, lo que se reflejaría en menor concentración, viabilidad y movilidad espermáticas (Figura. 21).

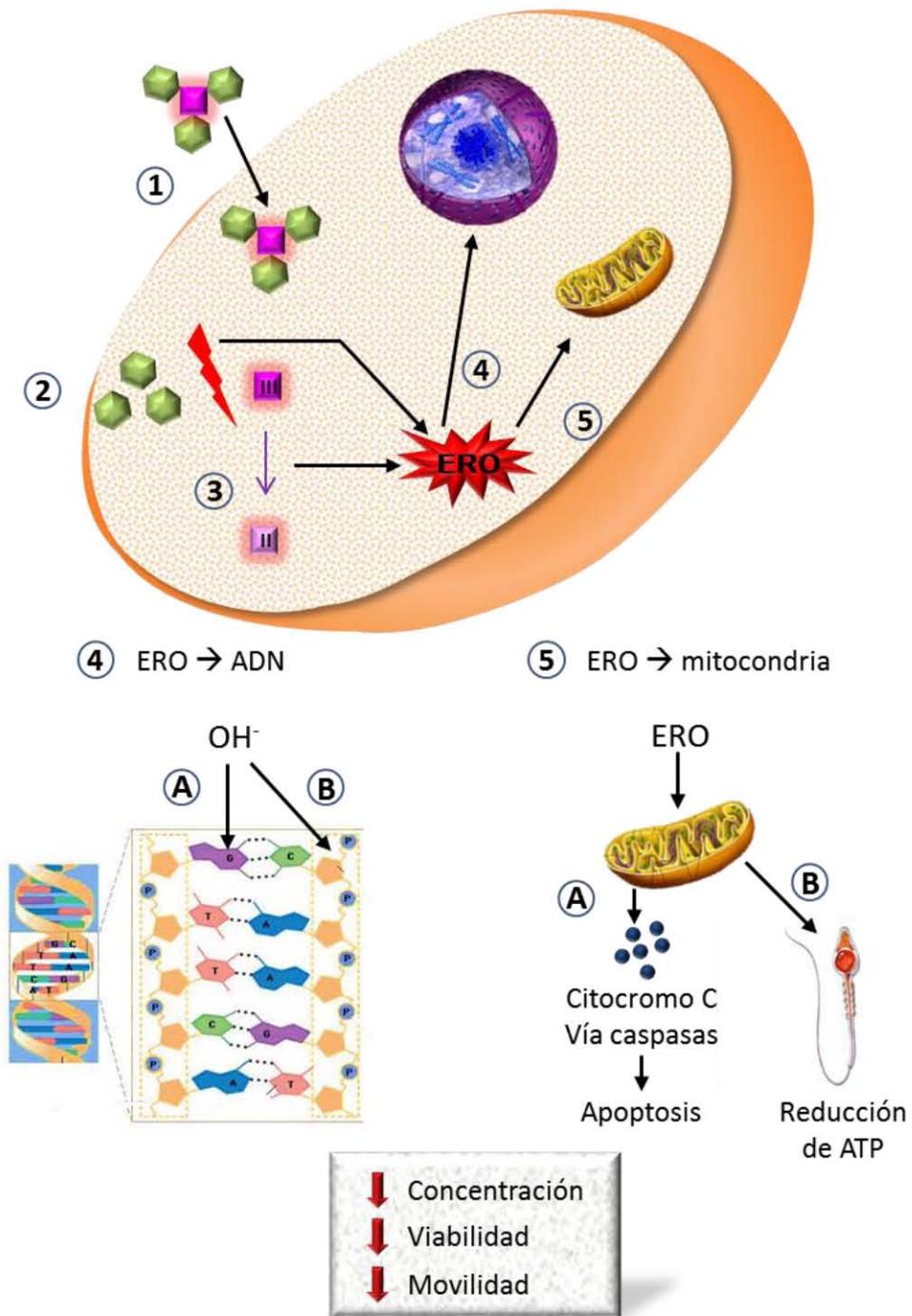


Figura 21. Esquema propuesto del daño producido por el PicCr sobre los parámetros seminales.

CONCLUSIONES

- ❖ En el ratón macho adulto, la ingesta de PicCr por 105 días en la dosis equivalente a la recomendada para consumo humano aumenta el peso corporal.

- ❖ La ingesta de PicCr por tres ciclos espermáticos en la dosis similar a la recomendada para consumo humano, disminuye la concentración, viabilidad y movilidad espermáticas.

- ❖ La ingesta de PicCr afecta la esteroidogénesis, independientemente de la dosis y del tiempo de tratamiento, mostrando un comportamiento hormético.

- ❖ La suspensión de la ingesta de PicCr por un ciclo espermático no recupera la concentración, viabilidad y movilidad espermáticas a valores normales.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta L, Cuapio P, Rivas C, Salazar C y Téllez S. (2016). Evaluación de los parámetros seminales en varones atendidos en centros de fertilidad de Perú y México. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana*. **33**: 25-30.
- Al-Hamood M, Elbetieha A y Bataineh H. (1998). Sexual maturation and fertility of male and female mice exposed prenatally and postnatally to trivalent and hexavalent chromium compounds. *Reproduction, Fertility and Development*. **10**: 179–183.
- Álvarez J. (2001). Estrés oxidativo, fisiología espermática y reproducción asistida. *Revista Iberoamericana de fertilidad*. XXVI Congreso Nacional SEF. Barcelona. **18**: 42-52.
- Anderson A, Bryden A 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 A, Polansky M, Bryden A, Patterson Y, Veillon C y Glinsmann H. (1983). Effects of chromium supplementation on urinary Cr excretion of human subjects and correlation of Cr excretion with selected clinical parameters. *Journal of Nutrition*. **113**: 276-281.
- Aragón A y Altamirano M. (2001). Sperm and testicular modifications induced by subchronic treatments with vanadium (IV) in CD-1 mice. *Reproductive Toxicology*. **15**: 145-151.
- ATSDR. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (2000). Reseña Toxicológica del Cromo. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. Servicio de Salud Pública.
- Avello M y Suwalsky M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*. **11**:161-172.
- Bai Y, Zhao X, Qi C, Wang L, Cheng Z, Liu M, Liu J, Yang D, Wang S y Chai T. (2014). Effects of chromium picolinate on the viability of chick embryo fibroblast. *Human and Experimental Toxicology*. **33**:403–413.
- 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 Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*. **77**: 244-249.
- Bearden H y Fuquay J. (1982). Reproducción Animal Aplicada. Manual Moderno. México. pp. 21-38.
 - Becerro M. (2008). Las hormonas esteroideas sexuales, el envejecimiento y el ejercicio. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*. **1**: 22-36.
 - Bernao A, Meseguer I, Aguilar MV, Martínez M, González Muñoz M. (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 O, Murphy M y Slesinki. (2003). Determining safety of chromium tripicolinate for addition to foods as a nutrient supplement. *Food and Chemical Toxicology*. **42**: 1029-1042.
 - Bunker W, Lawson S, Delves T y Clayton E. (1984). The uptake and excretion of chromium by the elderly. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **39**: 797-802.
 - Bustos-Obregón E y Díaz O. (1999). Ultrastructure of mouse teratozoospermia induced by Parathion. *Asian Journal of Andrology*. **1**: 1-2.
 - Caffaratti M y Briñon M. (2005). Suplementos dietarios: Picolinato de cromo (Revisión) Centro de Información de Medicamentos (CIME).
 - Calabrese E. (2004). Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine. *EMBO Journal*. **5**: S37-S40.
 - Calabrese J y Baldwin A. (2002). Defining hormesis. *Human and Experimental Toxicology*. **21**: 91-97
 - Campbell W, Joseph O, Davey L, Cry–Campbell D, Anderson A y Evans J. (1999). Effects of resistance training and chromium picolinate on body composition and skeletal muscle in older men. *Journal of Applied Physiology*. **86**: 29–39.
 - Cardinali D. (2007). Neurociencia aplicada: sus fundamentos. 1ª Ed. Buenos Aires. Médica Panamericana. pp. 357-360.

-
- Casabiell X. (2006). Endocrinología. Arce y col. Eds. Universidad de Santiago de Compostela. pp. 89-94.
 - Castillo C, Benedito L, López-Alonso M, Miranda M y Hernández J. (2001). Importancia del estrés oxidativo en el ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. *Archivos De Medicina Veterinaria*. **33**: 204–218
 - 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 de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.
 - Cheng K, Cahill D, Kasai H, Nishimura S, Loeb L. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *The Journal of Biological Chemistry*. **267**: 166-172.
 - Coleman E. (1997). The chromium picolinate weight loss scam. *Sports Medicine Digest*. **19**: 6-7.
 - Córdova A, Ruiz C, Córdova C, Córdova M, Guerra J, Rodríguez B y Arancibia K. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. **3**: 01-38
 - 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. Barcelona, España. **30**: 118.
 - Darszon A, Nishigaki T, Wood C, Treviño C, Felix R y Beltran C. (2005). Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology. *International Review of Cytology*. **243**: 79-82.
 - Davis C y Vincent J. (1997). Chromium oligopeptide activates insulin receptor kinase activity. *Biochemistry*. **36**: 4382-4385.
 - Edwards R. (2003). New outlooks on IVF spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*. **5**: 89-91.
 - Elbetieha A y Al-Hamood M. (1997). Long-term exposure of male and female mice to trivalent and hexavalent chromium compounds: effect on fertility. *Toxicology*. **116**: 39-47.

-
- Espinosa I. (2016). Efectos de la ingesta crónica de picolinato de cromo en la respuesta ovulatoria espontánea de ratones hembra adultos. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.
 - Evans G y Johnson P. (1980). Characterization and quantitation of a zinc-binding ligand in human milk. *Pediatric Research*. **14**: 876-880.
 - Evans M y Bowman D. (1992). Chromium picolinate increase membrane fluidity and rate of insulin internalization. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **46**: 243-250.
 - Fernández-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.
 - 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*. EUA.
 - Friedman J y Halaas J. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. **395**: 763-770.
 - Fuentes P, Mendoza Y, Rosales F y Cisneros T. (2008). Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú. pp. 7-8, 11-12.
 - Gal I, López G, Velasco M, Prieto A y Montalvo J. (2007). Bases de la fisiología. Editorial Tebar. España. pp. 468-484.
 - Gallardo J. (2007). Evaluación del sistema antioxidante en el semen normal. *Revista de Investigación Clínica*. **59**: 42-47.
 - Gomes M, Rogero M y Tirapegui J. (2005). Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. **11**: 262-266.
 - Gómez A y Magaña P. (2003). Papel del cromo y del cinc en el metabolismo de la insulina. *Revista Médica IMSS*. **42**: 347-352.
 - González J, Meseguer I, Martínez C, Aguilar V y Bernao A. (2006). Repercusiones del picolinato de cromo en el metabolismo proteico en función de la edad. *Nutrición*

Hospitalaria. **21**: 709-714.

- 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.
- Gutteridge J y Halliwell B. (1999). Reactive oxygen species in biological systems. An Interdisciplinary Approach. Gilbert D y Colton C. Eds. pp. 189-218, New York, USA.
- Hall J. (2012). Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica. 12ª Edición. Elsevier. España. pp. 983-984.
- Harlan Laboratories Inc. (2011). Modelos de investigación y servicios, lista de precios. Indianapolis. pp. 16.
- Havel J. (2004). A scientific review: The role of chromium in insulin resistance. *Nutrition*. **21**: 2-14.
- 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**: 93-100.
- Hepburn D, Burney J, Woski S y Vincent J. (2003a). The nutritional supplement chromium picolinate generates oxidative DNA damage and peroxidized lipids in vivo. *Polyhedron*. **22**: 455-463.
- Hepburn D, Xiao J, Bindom S, Vincent J y O'Donnell J. (2003b). Nutritional supplement chromium picolinate causes sterility and lethal mutations in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**: 3766-3771.
- Iavicoli 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.
- Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, Takenaka A y Fujisawa M. (2007). Expression of leptin and leptin re-ceptor in the testis of fertile and infertile patients. *Andrología*. **39**: 22–27.
- Jana M, Rajaram A y Rajaram R. (2009). Chromium picolinate induced apoptosis of lymphocytes and the signaling mechanisms thereof. *Toxicology and applied pharmacology*. **237**: 331-344.

-
- Jara A y González G. (2011). Endocrinología. Editorial Médica Panamericana. México. pp. 235-241.
 - Jungwirth A, Giwercman A y Tournaye H. (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *European Urology*. **62**: 324-332.
 - Kao S, Chao H y Wei Y. (1998). Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*. **4**: 657-666.
 - 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**: 163-174.
 - Kavlock R, Daston G, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray L, Kaatari S, Lucier G, Luster M, Mac M, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan D, Sinks T y Tilson H. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A Report of the U.S. EPA-sponsored Workshop. *Environmental Health Perspectives*. **104**: 715-740.
 - Kirchhoff C. (1998). Molecular characterization of epididymal proteins. *Reviews of Reproduction*. **3**: 86-95.
 - Knoblaugh S y True L. (2012). Male reproductive system. En: Comparative Anatomy and Histology A Mouse and Human Atlas. Piper M, Treuting S, Dintzis Denny y Frevert C. Eds. Elsevier Inc. pp. 285-308.
 - Król E, Krejpcio Z, Michalak S, Wójciak R y Bogdański P. (2012). Effects of combined dietary chromium (III) propionate complex and thiamine supplementation on insulin sensitivity, blood biochemical indices, and mineral levels in high-fructose-fed rats. *Biological Trace Element Research*. **150**: 350-359.
 - La Maestra S, De Flora S y Micale R. (2015). Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. **218**: 117-122.
 - Lamson D y Plaza S. (2002). The safety and efficacy of high-dose chromium. *Alternative*

Medicine Review. **7**: 218-235.

- Langwinsky D y Patino H. (2001). A Nutrição de ruminantes e os complexos orgânicos de minerais. Tortuga. pp. 52.
- Levina A y Lay P. (2005). Mechanistic studies of relevance to the biological activities. *Coordination Chemistry Reviews*. **249**: 281-298.
- Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson J, Loscalzo J. (2012). HARRISON Principios de medicina interna. 18a edición. McGraw-Hill Companies, Inc.
- Maeda K, Ohkura S, Tsukamura H. (2000). Spermatogenesis and testicular functions. En: Laboratory rat. Handbook of experimental animals. Academic Press. EUA. pp. 145-176.
- Marchetti F y Wyrobek A. (2005). Mechanisms and Consequences of paternally-transmitted chromosomal abnormalities. *Birth Defects Research (Part C)*. **75**: 112–129.
- Marín J. (2017). Participación del cromo y ácido picolínico en la respuesta ovulatoria del ratón hembra adulto sometido a la ingesta prolongada de picolinato de cromo. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.
- Mattson MP. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*. **7**: 1-7.
- McLaren A y Southee D. (1997). Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Developmental Biology*. **1**:107-113.
- MPCA. Minnesota Pollution Control Agency. (2008). Endocrine Disrupting Compounds. A Report to the Minnesota Legislature.
- Münzberg H, Björnholm M, Bates S y Myers M. (2005). Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **62**: 642–652.
- NAS. National Academy of Sciences (1989). Recommended Dietary Allowances. 10ª Ed. National Academy Press. Washington, DC. pp. 241-243.
- Nieto J, Chavira S, Hernández T, Ayala M, Rosas P. (2016). Efectos de la ingesta diaria de picolinato de cromo en la espermatogénesis del ratón. LIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, LuC-066.

- Olivera M, Ruiz T, Tarazona A y Giraldo C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. **19**: 426-436.
- 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.
- OMS. (2010). Manual de laboratorio de la OMS para el examen y tratamiento del semen humano. 5ª Edición. Cooper Eds. Suiza.
- 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 E. (2007). Atención integral de la infertilidad. Endocrinología, cirugía y reproducción asistida. 2a ed. México. McGraw-Hill Interamericana. pp. 3-5.
- Poirot C y Cherruau B. (2005). Infertilidad masculina. Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. **39**: 225-241.
- Priego T, Sánchez J, Palou A y Picó C. (2009). Effect of high-fat diet feeding on leptin receptor expression in white adipose tissue in rats: depot- and sex-related differential response. *Genes & Nutrition*. **4**: 151-156.
- Rabia L, Lodhi G y Aslam M. (2008). Effects of amlodipine on serum testosterone, testicular weight and gonado-somatic index in adult rats. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad*. **20**: 8-10.
- Robaire B y Hermo L. (1988). Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: Knobil E, Neill J, eds. The physiology of reproduction. New York: Raven Press; 999–1079.
- Rodríguez H, Espinoza-Navarro O, Sarabia L, Tamayo C, Sepúlveda M, Inostroza J, Araya J y Moriguchi K. (2008). Histological and Functional Organization in Human Testicle: Expression of Receptors c-kit and Androgens. *International Journal of Morphology*. **26**: 603-608.

- Rosas P. (1990). Estudio de las características reproductoras de ratones desnudos hipotímicos y la vinculación del timo con la regulación neuroendócrina de la reproducción. Tesis Doctoral. UNAM.
- Rosas R. (2007). Infertilidad masculina. Causas, diagnóstico y tratamiento. Ámbito farmacéutico. *Divulgación sanitaria*. **26**: 70-75.
- Sakamoto J y Hashimoto K. (1986) Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice - effects on fertility and sperm morphology. *Archives of Toxicology*. **59**: 201-205.
- Sans M. (2004). Estudio biológico de *Mus domesticus ruttii*, 1772 en una zona de polimorfismo robertsoniano. Facultat de Medicina. Departamento de Biología Animal. Barcelona. pp. 110.
- Shibutani S, Takeshita M, Grollman A. (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*. **349**: 431-434.
- Sigman M, Lipshultz I y Howards S. (2009). Office evaluation of the subfertile male. In: Infertility in the male. Lipshultz IL, Howards SS, Niederberger CS, Sigman 4th ed. Cambridge University Press, pp. 153.
- Simanainen U, McNamara K, Davey R, Zajac J, Handelsman D. (2008). Severe Subfertility in Mice with Androgen Receptor Inactivation in Sex Accessory Organs But Not in Testis. *Endocrinology*. **149**: 3330–3338.
- 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 P, Patierno S y Wetterhahn K. (1995). Chromium (III) picolinate produces chromosome damage in Chinese hamster ovary cells. *The Official Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*. **9**: 1643-1648.
- Tapia R. (2012). Una visión actual de la infertilidad masculina. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*. **4**: 103-109.
- Tomioka H, Shimizu T y Tatano Y. (2007). Effects of picolinic acid on the antimicrobial

- functions of host macrophages against *Mycobacterium avium* complex. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **29**: 460–464.
- Toorians A, Kelleher S, Gooren L, Jimenez M y Handelsman D. (2003). Estimating the contribution of the prostate to blood dihydrotestosterone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **88**: 5207-5211.
 - Tresguerres J. (2010). Fisiología del testículo. En: Fisiología Humana. 4ª. Edición. pp. 1059-1072.
 - Trumbo P y Ellwood K. (2006). Chromium Picolinate Intake and Risk of Type 2 Diabetes: An Evidence-Based Review by the United States Food and Drug Administration. *Nutrition Reviews*. **64**: 357-363.
 - Udoff L y Adashi E. (1999). Infertility. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 2. Academic Press. Knobil E y Neill J. Eds. San Diego, EUA. pp. 824-832.
 - Uribe J. (2014). Hipogonadismo: nueva propuesta de clasificación basada en el mecanismo inductor. *Urología Colombiana*. **23**: 114-120.
 - Urroz C. (2000). Elementos de anatomía y fisiología animal. EUNED. Costa Rica. pp. 191, 195.
 - Van Voorhis BJ. (1999). Follicular Steroidogenesis. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 2. Academic Press. Knobil E y Neill J. Eds. San Diego, EUA. pp. 389-395.
 - Vincent J. (2000). The Biochemistry of chromium. *The Journal of Nutrition*. **130**: 715-718.
 - Wolpert L, Lawrence M y Robertson S. (2009). Principios del desarrollo. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana. España. pp. 9-10.
 - Wyrobek A y Bruce W. (1975). Chemical induction of sperm abnormalities in mice. USA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **72**: 4425-4429.
 - 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 J. (2004). Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. *Proceedings of the Nutrition Society*. **63**: 41–47.

- Yazaki Y, Faridi Z, Ma Y, Ali A, Northrup V, Yanchou V, Liberti L y Katz D. (2010). A Pilot Study of Chromium Picolinate for Weight Loss. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. **16**: 291–299.
- Yi X, Gao H, Chen D, Tang D, Huang W, Li T, Ma T y Chang B. (2017). Effects of obesity and exercise on testicular leptin signal transduction and testosterone biosynthesis in male mice. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. **312**: R501–R510.
- 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).