



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**EL PICOLINATO DE CROMO, UN SUPLEMENTO
ALIMENTICIO QUE INCREMENTA LA MUERTE CELULAR
PROGRAMADA EN LOS ESPERMATOZOIDES DE RATÓN**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

PRESENTAN

CLAUDIA TOVAR MONTELLANO

IRVING DONALDO PORTILLA SANCHEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO



Ciudad de México

Octubre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**EL PICOLINATO DE CROMO, UN SUPLEMENTO
ALIMENTICIO QUE INCREMENTA LA MUERTE CELULAR
PROGRAMADA EN LOS ESPERMATOZOIDES DE RATÓN**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTAN

CLAUDIA TOVAR MONTELLANO

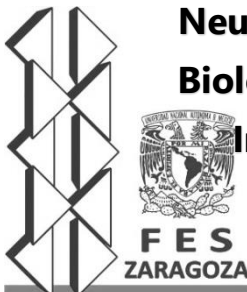
IRVING DONALDO PORTILLA SANCHEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

Realizado en el Laboratorio de

**Neuroinmunoendocrinología, Unidad de Investigación en
Biología de la Reproducción, Unidad Multidisciplinaria de
Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), FES-
Zaragoza, UNAM**



FES Ciudad de México

Octubre, 2019



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **TOVAR MONTELLANO CLAUDIA**, con número de cuenta **414027752**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **01 de octubre de 2019** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** Dra. LETICIA MORALES LEDESMA
- VOCAL** Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO
- SECRETARIO** Dr. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO
- SUPLENTE** Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ
- SUPLENTE** M. en C. CARLOS CAMILO SILVA MÉNDEZ

Morales Ledesma Leticia
[Firma]
Juan José Rodríguez Mercado
[Firma]
[Firma]

El título de la tesis que presenta es: **El picolinato de cromo, un suplemento alimenticio que incrementa la muerte celular programada en los espermatozoides de ratón.**

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 22 de agosto de 2019

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

[Firma]
VO. BO.
Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ
JEFE DE CARRERA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que el alumno **PORTILLA SANCHEZ IRVING DONALDO**, con número de cuenta **310126496**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **01 de octubre de 2019** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** Dra. LETICIA MORALES LEDESMA
- VOCAL** Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO
- SECRETARIO** Dr. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO
- SUPLENTE** Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ
- SUPLENTE** M. en C. CARLOS CAMILO SILVA MÉNDEZ

Morales Ledesma Leticia
[Signature]
Juan José Rodríguez Mercado
[Signature]
[Signature]

El título de la tesis que presenta es: **El picolinato de cromo, un suplemento alimenticio que incrementa la muerte celular programada en los espermatozoides de ratón.**

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 22 de agosto de 2019

DR. VICENTE JESUS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCION

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

[Signature]
Vº. Bº.
Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ
JEFE DE CARRERA



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Patricia Rosas Saucedo, por el tiempo y dedicación a lo largo de este camino, por el apoyo día a día, por el conocimiento compartido y por la confianza otorgada.

A los miembros del jurado:

Mtro. Carlos Camilo Silva Méndez

Dr. Hugo López Muñoz

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Por el enriquecimiento alcanzado gracias a sus aportaciones y comentarios.

Al Dr. Juan José Rodríguez por las facilidades otorgadas para el uso de material y técnicas.

Al Mtro. Carlos Camilo Silva Méndez por su apoyo y tiempo otorgado.

A la Dra. Adriana, al Dr. Román y a la Dra. Ely por el cuidado y mantenimiento de los animales utilizados en esta investigación, por su tiempo y especial atención.

A Alejandra por el apoyo y asesoramiento.

A todas y cada una de las personas por las que la meta fue alcanzada, Gracias!



DEDICATORIAS CLAUDIA

A Dios

“TODO LO PUEDO EN CRISTO QUE ME FORTALECE “ FILIPENSES 4:13

Esto es para ti y por ti, que siempre estuviste conmigo a lo largo de todo este proceso. Quien me ayudo y me sostuvo para no darme por vencida. Te agradezco el que siempre me recordaras que todo lo lograría porque no me diste espíritu de cobardía.

Gracias Dios por permitirme haber cumplido unos de mis propósitos, sin ti no hubiera sido posible.

A mis padres, que siempre estuvieron dándome su apoyo incondicional, gracias por todo el esfuerzo que hicieron durante toda mi carrera para que nunca me faltara nada. Gracias por cada palabra de aliento que me daban cuando sentía que ya no podía más, por el amor la comprensión y la confianza que me brindaron, los amo.

A mis hermanos Alejandro y Ariadna, gracias por su apoyo cuando necesitaba de ustedes, gracias por ser mi compañía y por cada palabra de ánimo que me dieron.

A mi amigo Irving Donaldo, quien estuvo a mi lado desde inicio de carrera, gracias por los buenos ratos juntos por las risas e incluso por las peleas que siempre teníamos por cualquier cosa, pero mas te agradezco el que siempre me ayudaste a creer en mí, en que podría lograr lo que yo me propusiera, te agradezco todo tu apoyo, Te quiero amigo.



DEDICATORIAS IRVING

Se la dedico al forjador de mi camino, a Dios, que me acompaño y siempre me levanto de mi continuo tropiezo. Le agradezco eternamente el haberme dado la oportunidad de concluir este proyecto y haberme dado todo para no fallar. Gracias.

A mi madre, Amparo Sánchez, cuya lucha continua dio frutos y sin ella, este día nunca hubiese llegado, le agradezco el esfuerzo doble para que nunca me faltara nada durante este tiempo; eres y serás mi mayor motivación y mi mejor ejemplo para seguir, te agradezco toda tu confianza, esperanza, amor y cada una de tus acciones que me ayudaron a lograrlo, Te amo.

A mi compañera y amiga, Claudia Tovar, gracias por tus consejos, que sin ellos no lo hubiese intentado una vez más y haberlo logrado, a tu sincera compañía que alimentaba mi fuerza para seguir, gracias por todo, por cada uno de los momentos compartidos y por hacerme mejor persona y enseñarme a que la felicidad es fácil de encontrar. Sin tu compañía esto no hubiese sido posible, sin duda tu amistad fue lo mejor que me dejo la carrera. Te quiero mucho y querré por siempre.

Este logro no es únicamente mío, es de todas y cada una de las personas que ayudaron a que fuera posible, padre, hermanos, amigos y al maestro Alfonso que me alentaron a seguir.

En memoria del profesor Luis Samuel Campos Lince.

Ubi concordia, ibi victoria

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	3
1. Aparato reproductor masculino	3
• Testículos	3
• Epidídimos y conductos deferentes.....	5
• Glándulas ampulares	5
• Vesículas seminales	5
• Próstata.....	6
• Glándulas prepuciales.....	6
• Pene.....	6
• Glándulas bulbouretrales.....	6
• Uretra.....	6
2. Espermatogénesis	7
• Células de Sertoli	10
• Espermatozoide.....	11
3. Esteroidogénesis y células de Leydig	14
4. Regulación de las funciones del testículo	15
• Eje hipotálamo-hipófisis-testículo	15
5. Apoptosis.....	17
• Vía extrínseca	17
• Vía intrínseca.....	17
• Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio	20
• Especies reactivas de oxígeno	21
• Apoptosis en espermatozoides	22
6. Factores que afectan la calidad espermática	23
7. Picolinato de cromo.....	24
8. Efectos del picolinato de cromo en diferentes modelos experimentales.....	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS.....	30
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48



RESUMEN

El picolinato de cromo (PicCr) es un producto de venta libre en el mercado como suplemento alimenticio que se promociona como agente reductor de peso y constructor muscular. Dichos efectos son objeto de discusión, ya que diversos estudios han revelado que los efectos benéficos del PicCr son mínimos o nulos, no obstante, ha aumentado su consumo principalmente por adultos jóvenes en edad reproductiva.

En adultos jóvenes sanos la ingesta diaria de PicCr en la dosis recomendada disminuye la movilidad, vitalidad y morfología espermáticas, lo que compromete la capacidad fertilizante. En ratones adultos el tratamiento con PicCr disminuye los parámetros seminales dependiendo de la concentración del suplemento y del tiempo de ingesta. Esta disminución en los parámetros seminales podría estar vinculada con la capacidad del PicCr para inducir apoptosis, como se ha mostrado en el cultivo de linfocitos de humano.

Por lo anterior en el presente estudio se decidió analizar, en el ratón, los efectos que conlleva la ingesta diaria y prolongada de PicCr, en la dosis recomendada para consumo humano y diez veces más, sobre la viabilidad y la apoptosis en los espermatozoides. Aunado a esta evaluación, se analizó el peso corporal y de los órganos reproductores, así como la morfología espermática adaptando técnicas de tinción utilizadas en espermatozoides de humano.

Se utilizaron ratones adultos de la cepa CD-1 que se dividieron en cuatro grupos experimentales: 1) Testigo, animales sin tratamiento; 2) Vehículo, animales a los que se les administró únicamente aceite de maíz (vehículo del PicCr); 3) 0.12 μg de PicCr; 4) 1.2 μg de PicCr. Los animales se trataron por 140 días (cuatro ciclos espermáticos), se registró el peso corporal al final de cada ciclo y se sacrificaron 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. Se evaluó la viabilidad con la técnica de tinción con eosina, la morfología adaptando la técnica de tinción rápida (Esperma-Form) para la morfología de los espermatozoides de humano y el índice apoptótico por la técnica de naranja de acridina/bromuro de etidio.

Los resultados mostraron que la ingesta diaria de PicCr por cuatro ciclos espermáticos, no modificó el peso corporal, independientemente de la dosis del suplemento. El consumo prolongado de PicCr incrementó el peso de los epidídimos y las vesículas seminales dependiendo de la dosis. En cuanto a la morfología espermática se observó que en



los grupos tratados con PicCr se incrementó la proporción de espermatozoides con cabeza en forma de abanico, alfiler y amorfa, así como flagelos enroscados. El tratamiento con PicCr disminuyó la viabilidad espermática e incrementó el índice apoptótico.

En conclusión, el consumo de PicCr por tiempo prolongado incrementa las alteraciones morfológicas del espermatozoide, decrece la viabilidad espermática y aumenta la apoptosis, efectos que ponen en riesgo la fertilidad.



MARCO TEÓRICO

La reproducción es el proceso biológico por el cual se perpetúan las especies. Es la capacidad de todo ser vivo para producir otro individuo semejante. En los mamíferos la función reproductora inicia cuando los individuos de ambos sexos llegan a la madurez sexual. Con ello adquieren la capacidad para transmitir de generación en generación las características propias de la especie (McDonald, 1991; Hafez y Hafez, 2002).

1. Aparato reproductor masculino

En los mamíferos, el aparato reproductor masculino consta de testículos, epidídimos, sistema de conductos, glándulas sexuales accesorias, pene y uretra (Murphy, 2001). El aparato reproductor del ratón además incluye las glándulas prepuciales (Treuting y Dintzis, 2012) (**Figura 1**).

- **Testículos**

Los testículos son las gónadas masculinas cuya función es la producción de gametos (espermatogénesis) y la secreción de hormonas esteroides (esteroidogénesis) y proteicas (Treuting y Dintzis, 2012; Bearden y Fuquay, 1982). El testículo está organizado en dos compartimentos, el intersticial formado por células del estroma y el tubular que está constituido por los túbulos seminíferos (Treuting y Dintzis, 2012; Knoblaugh y True, 2012) (**Figura 1**).

Compartimento intersticial

En el intersticio se encuentran las células del sistema inmunológico (macrófagos, células dendríticas, linfocitos B), vasos sanguíneos y células de Leydig. Estas últimas son las encargadas de sintetizar testosterona (Treuting y Dintzis, 2012; Bearden y Fuquay, 1982) (**Figura 1**).

Compartimento tubular

Los túbulos seminíferos están revestidos por las células de Sertoli que son células somáticas cuya función es la de nutrición de las células germinales en las diferentes etapas de

maduración (Holstein y col., 1996). En el ratón, los túbulos seminíferos miden aproximadamente 200 μm de diámetro y se estima que existen de 15 a 20 túbulos en cada testículo, con una longitud total de 2 metros (Guzmán y col., 2005) (Figura 1).

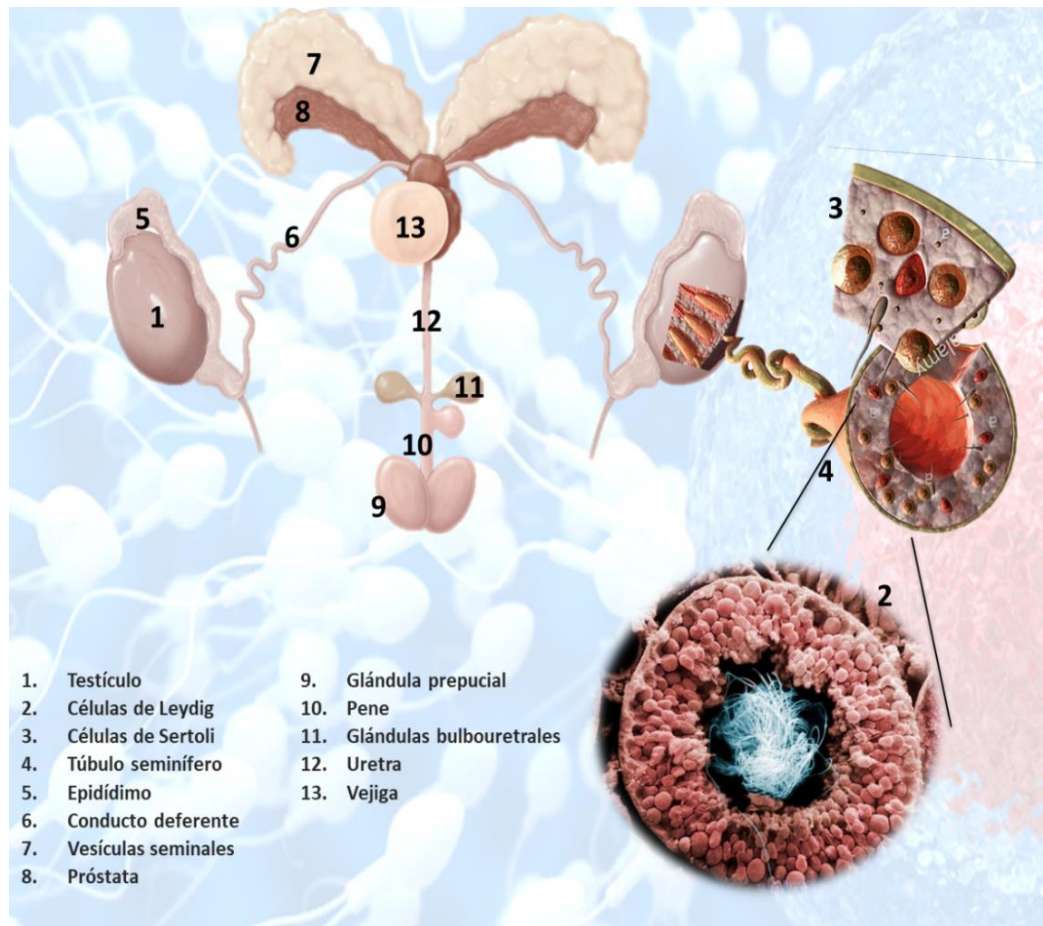


Figura 1. Ilustración que muestra el aparato reproductor de ratón macho (Tomado de Treuting y Dintzis, 2012).



Red testicular y conductos eferentes

Ambos extremos de cada túbulo seminífero terminan en túbulos rectos que desembocan en la red testicular o *rete testis*, que a su vez desemboca en conductos más grandes, los conductos eferentes se conectan con el epidídimo (Treuting y Dintzis, 2012; Bearden y Fuquay, 1982) (**Figura 1**).

- **Epidídimos y conductos deferentes**

La principal función del epidídimo es la maduración y almacenamiento de espermatozoides. En el humano y en el ratón los epidídimos se encuentran pareados y su estructura es similar: cabeza, cuerpo y cola. En esta última se almacenan los espermatozoides maduros. La cabeza del epidídimo está conectada a los conductos eferentes y la cola al conducto deferente. Tanto en el humano como en el ratón los conductos deferentes están revestidos con un epitelio cilíndrico ciliado rodeado por capas internas y externas de músculo liso que tiene como función la expulsión de los espermatozoides durante la eyaculación. El conducto deferente se conecta a un conducto corto que drena a la vesícula seminal (Treuting y Dintzis, 2012; Knoblauch y True, 2012) (**Figura 1**).

- **Glándulas ampulares**

Las glándulas ampulares son pareadas. Sus secreciones ayudan a la formación del semen dándole más fluidez a su paso por los conductos deferentes (Treuting y Dintzis, 2012).

- **Vesículas seminales**

En el ratón y en el ser humano las vesículas seminales son glándulas grandes bilaterales y sus conductos se abren en el colículo seminal (Treuting y Dintzis, 2012). Su secreción es rica en proteínas, lípidos y monosacáridos (hexosas) de gran importancia para la conservación y movilidad de los espermatozoides (Urroz, 2000). La sección final del conducto deferente que se ubica entre la vesícula seminal y la próstata forma el conducto eyaculador (Treuting y Dintzis, 2012; Bearden y Fuquay, 1982) (**Figura 1**).



- **Próstata**

En el ratón la próstata se divide en cuatro lóbulos: anterior, dorsal, ventral y lateral. La secreción de la glándula prostática es alcalina y contribuye a neutralizar la acidez propia del conducto genital femenino, lo que le da una mayor viabilidad a los espermatozoides que llegan a esta zona (Urroz, 2000; Knoblaugh y True, 2012) (**Figura 1**).

- **Glándulas prepuciales**

Las glándulas prepuciales son pareadas, grandes, aplanadas y de un color amarillo. Se localizan en el tejido subcutáneo caudal cerca a la base del pene. Su principal función es la producción de feromonas (Treuting y Dintzis, 2012; Bearden y Fuquay, 1982) (**Figura 1**).

- **Pene**

En todos los mamíferos, el semen es depositado en el aparato reproductor femenino por un órgano denominado pene. En el ratón el pene está compuesto por la posición distal de la uretra, tejido eréctil vascular (cavernoso bulboso y esponjo bulboso) y orificio del pene. El glande está cubierto por una vaina suelta y el prepucio está revestido por epitelio escamoso estratificado que contiene folículos pilosos (Treuting y Dintzis, 2012; Bearden y Fuquay, 1982).

- **Glándulas bulbouretrales**

En los ratones las glándulas bulbouretrales son las análogas a las glándulas de Cowper en humanos. Se encuentran cerca del pene, distalmente a lo largo de la uretra (Treuting y Dintzis, 2012; Bearden y Fuquay, 1982). Su secreción es rica en mucina y se vierte en la uretra en el momento de la eyaculación (Urroz, 1991) (**Figura 1**).

- **Uretra**

En humano y en el ratón la uretra se extiende desde el trigono de la vejiga urinaria hasta el orificio uretral externo (Treuting y Dintzis, 2012; Bearden y Fuquay, 1982). En el ratón la uretra se encuentra próxima a las vesículas seminales, la próstata y vía el conducto eyaculador se conectan a la uretra prostática. La uretra se extiende a través del pene, donde llega a la punta del glande (Treuting y Dintzis, 2012; Knoblaugh y Truem, 2012; Bearden y Fuquay, 1982) (**Figura 1**).



Las glándulas sexuales accesorias son las responsables de elaborar las secreciones requeridas para la nutrición y transporte de los espermatozoides, también amortiguan la acidez del conducto genital femenino que es desfavorable para la viabilidad de los espermatozoides. Estas glándulas pueden acumular su contenido para liberarlo en el momento de la eyaculación, mediante contracciones de sus fibras musculares lisas situadas en el tejido de sostén del parénquima glandular (Urroz, 2000). Los espermatozoides suspendidos en las secreciones de las vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales forman el semen, que en el ratón forman el tapón copulatorio, que se aloja en la vagina de la hembra, lo que evita la salida del semen y favorecen la fertilización (Treuting y Dintzis, 2012; Bearden y Fuquay, 1982).

2. Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso por el cual se forman los espermatozoides. Comienza cuando las células precursoras o espermatogonias entran en división mitótica seguida de la división meiótica y ambas tienen lugar dentro de los túbulos seminíferos (Chenoweth, 1997; Barrios, 2002; Olivera y col., 2006).

Con fines descriptivos, la espermatogénesis se divide en tres fases distintas (**Figura 2**):

- Fase de espermatocitogénesis. Las espermatogonias primitivas (células diploides) o espermatogonias tipo A están localizadas junto a la membrana basal del epitelio tubular. Unas se conservan como células troncales y otras se dividen por mitosis y originan células diferenciadas llamadas espermatogonias tipo B. Después de varias divisiones adicionales estas células se convierten en espermatocitos primarios de gran tamaño (Málaga y col., 2005; Ross y Pawlina, 2015; Olivera y col., 2006).
- Fase espermatocítica. Los espermatocitos primarios entran a la meiosis I que tiene como función la reducción de la cantidad de cromosomas, dando como resultado dos células haploides llamadas espermatocitos secundarios, los cuales forman dos espermátidas al término de la división (Ross y Pawlina, 2015; Olivera y col., 2006).
- Fase de espermiogénesis. Cuando las espermátidas se diferencian en espermatozoides maduros. Este proceso consiste en cuatro fases: 1. Golgi (condensación nuclear, formación del axonema) 2. Casquete (formación de la vesícula acrosómica sobre el núcleo) 3. Acrosoma (orientación de la cabeza hacia la lámina basal, desplazamiento de mitocondrias a la región del cuello) y 4. Maduración (reducción del citoplasma que se encuentra



alrededor del flagelo, liberación del espermatozoide maduro a la luz del túbulo seminífero) (Ross y Pawlina, 2015; Olivera y col., 2006) (**Figura 3**).

Durante la espermiogénesis las histonas, proteínas clásicas de empaquetamiento del ADN, son reemplazadas por proteínas de transición y luego por proteínas más básicas ricas en residuos de arginina y cisteína denominadas protaminas. Durante la maduración epididimaria del gameto masculino las protaminas participan en la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares proporcionando mayor estabilidad, protección y compactación de la cromatina, constituyendo una estructura química, mecánicamente resistente y transcripcionalmente inactiva (OMS, 2010; Cambiasso y col., 2018) (**Figura 4**).

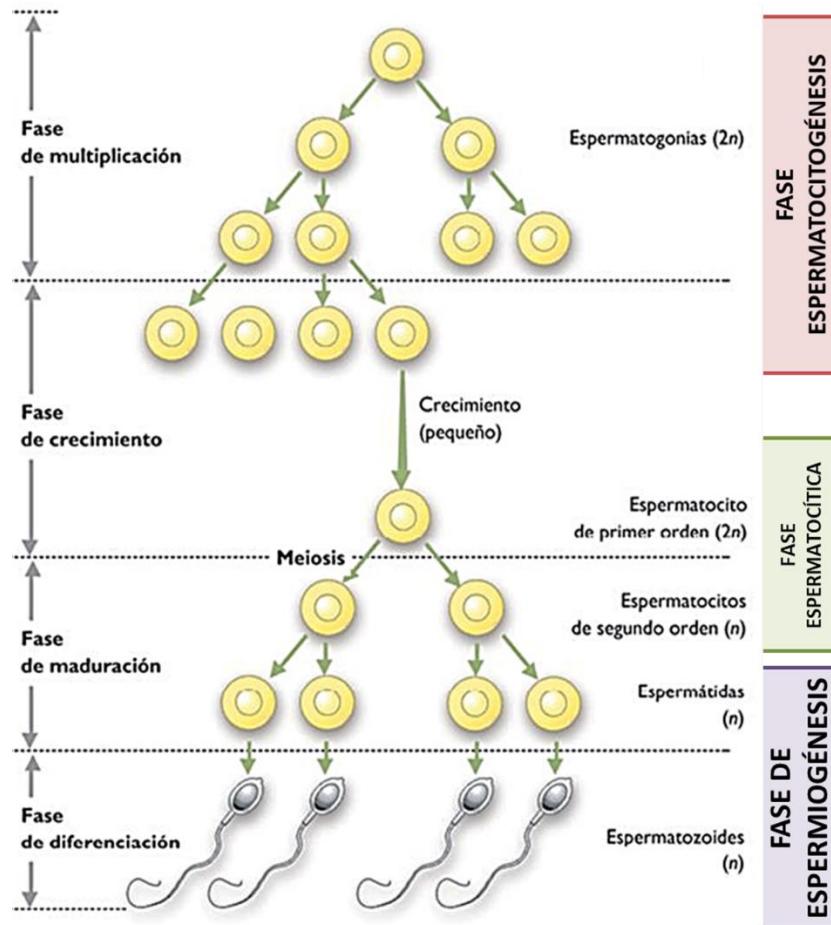


Figura 2. Ilustración que muestra las diferentes fases de la espermatogénesis (Tomado de Ross y Pawlina, 2015).

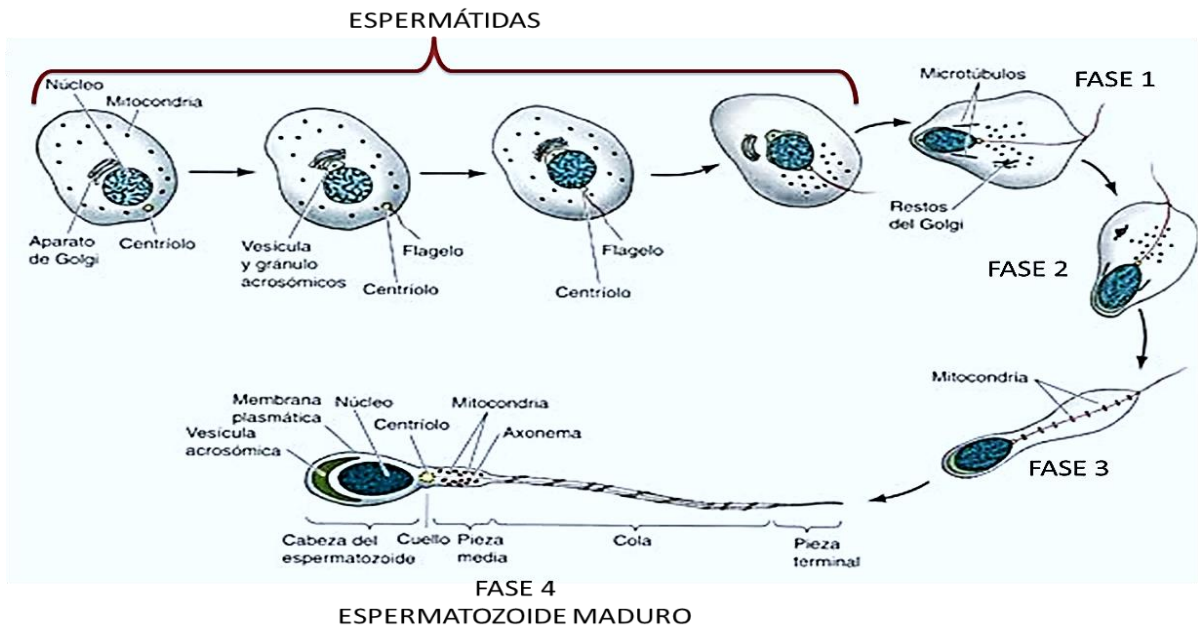


Figura 3. Esquema de las etapas de la espermiogénesis y del espermatozoide maduro (Tomado de Ross y Pawlina, 2015).

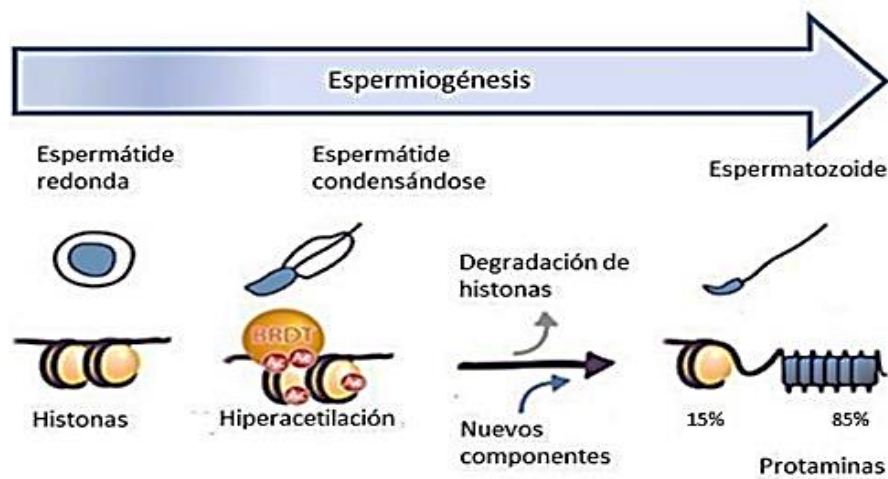


Figura 4. Esquema del empaquetamiento del ADN en la etapa de la espermiogénesis (Tomado de Ross y Pawlina, 2015).



Hacia el final de la fase de maduración de la espermatogénesis, las espermátidas alargadas se liberan desde las células de Sertoli en la luz del túbulo seminífero. Este proceso complejo, llamado espermiación, comprende la eliminación progresiva de complejos de unión célula de Sertoli-espermátidas y el desprendimiento de las espermátidas de las células de Sertoli (Ross y Pawlina, 2015).

- **Células de Sertoli**

Las células de Sertoli son constituyentes del epitelio del túbulo seminífero que rodean a las espermatogonias. Durante la meiosis funcionan como sostén de todos los tipos celulares de la línea germinal. Estas células tienen un tipo de unión poco habitual, ya que es hermética por la fusión de membranas celulares continuas, cuya estructura compleja funciona como una barrera para la difusión celular de iones y moléculas (Ross y Pawlina, 2015).

Es muy característica la unión de tipo hendidura que existe entre las células de Sertoli, a su vez estas también se unen a las espermatogonias iniciales por desmosomas y en la interfaz de la célula de Sertoli y la lámina basal se presenta una unión de tipo hemidesmosoma. Dichas uniones dan origen a dos compartimientos epiteliales: el compartimiento basal, en el que se encuentran las espermatogonias y los espermátocitos primarios y el compartimiento adluminal, en el que se localizan los espermátocitos secundarios y las espermátidas (Ross y Pawlina, 2015).

El proceso completo de espermatogénesis dura aproximadamente 75 días en el humano (Málaga y col., 2005). La espermatogénesis en el ratón inicia en el periodo fetal, momento en el que los túbulos seminíferos tienen células maduras de Sertoli y espermatogonias. La meiosis inicia 14 días después del nacimiento, después de 23 días ya hay una población considerable de las primeras espermátidas y para el día 28 se observa la espermatogénesis completa, pero con una concentración de espermátocitos inadecuada para poder fertilizar (Sobarzo y Bustos, 2000). En el ratón, el proceso de producción de espermátocitos maduros consta de 12 etapas, cada una de estas se sitúa en pequeños segmentos en el epitelio seminífero. Para que se complete la espermatogénesis de manera total se registra un total de 35 días (Sans, 2004) (**Figura 5**).

En su gran mayoría los ratones que son usados como modelo experimental son púberes (entre 6 y 8 semanas) con actividad espermática establecida y cuya fertilidad mantienen toda su vida (Benavides y Guénet, 2003).

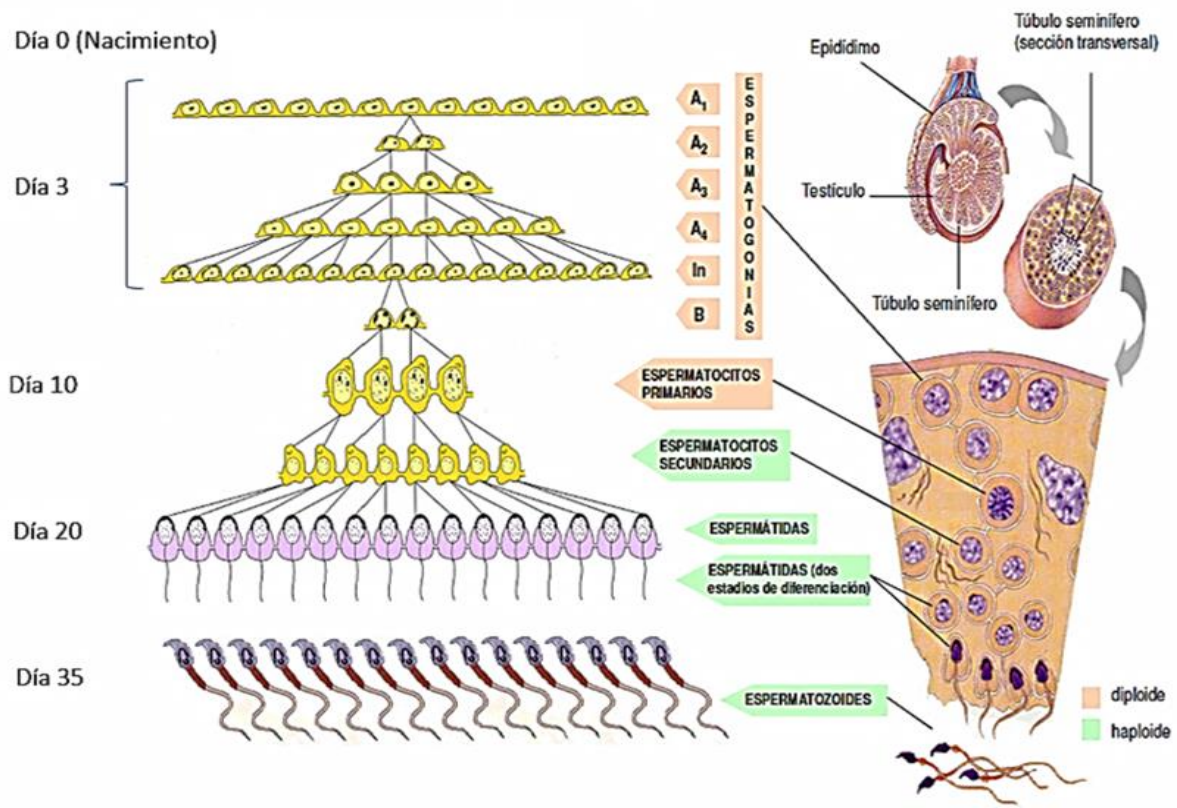


Figura 5. Representación esquemática de la espermatogénesis en el ratón (Modificada de Sans, 2004).

- **Espermatozoide**

El espermatozoide tiene como función única la fertilización del ovocito (McDonald, 1991). En el humano, como en otros mamíferos, el espermatozoide presenta tres componentes principales; cabeza, cuello y cola (Hafez, 1996) (**Figura 6**).

En la cabeza del espermatozoide se ubica el núcleo, posee un casquete acrosómico que contiene enzimas hidrolíticas como hialuronidasa, neuranimidasa, fosfatasa ácida y una proteasa semejante a la tripsina llamada acrosina, necesarias para la penetración de la zona pelúcida del óvulo (Olivera y col., 2006; Ross y Pawlina, 2015) (**Figura 6**).

El cuello contiene los centriolos y el origen de las fibras gruesas. La cola del espermatozoide está dividida en pieza media, pieza principal y pieza terminal. La pieza media contiene las mitocondrias dispuestas en forma helicoidal alrededor de las fibras gruesas y del complejo axonémico. Estas mitocondrias darán la energía necesaria para el movimiento de la



cola, siendo así las encargadas de la movilidad del espermatozoide (Ross y Pawlina, 2015). La pieza principal contiene la vaina fibrosa por fuera de las fibras gruesas y del complejo axonémico. La pieza terminal, corresponde al extremo del flagelo del espermatozoide maduro, solo tiene el complejo axonémico (Ross y Pawlina, 2015) (**Figura 6**).

Los espermatozoides recién liberados tienen la característica de ser inmóviles por lo cual son transportados desde los túbulos seminíferos en un líquido secretado por las células de Sertoli (Ross y Pawlina, 2015). Este líquido junto con los espermatozoides circula a lo largo de los túbulos seminíferos, ayudados por las contracciones de las células peritubulares de la lámina propia. Los espermatozoides entran a la red testicular de ahí se desplazan hacia los conductos eferentes y después hacia los conductos del epidídimo, es aquí donde los espermatozoides adquieren la movilidad y sufren cambios morfológicos que denotan la madurez como compensación adicional del ADN, reducción adicional citoplasmática y cambios en la membrana plasmática a nivel de lípidos y proteínas (Olivera y col., 2006; Ross y Pawlina, 2015).

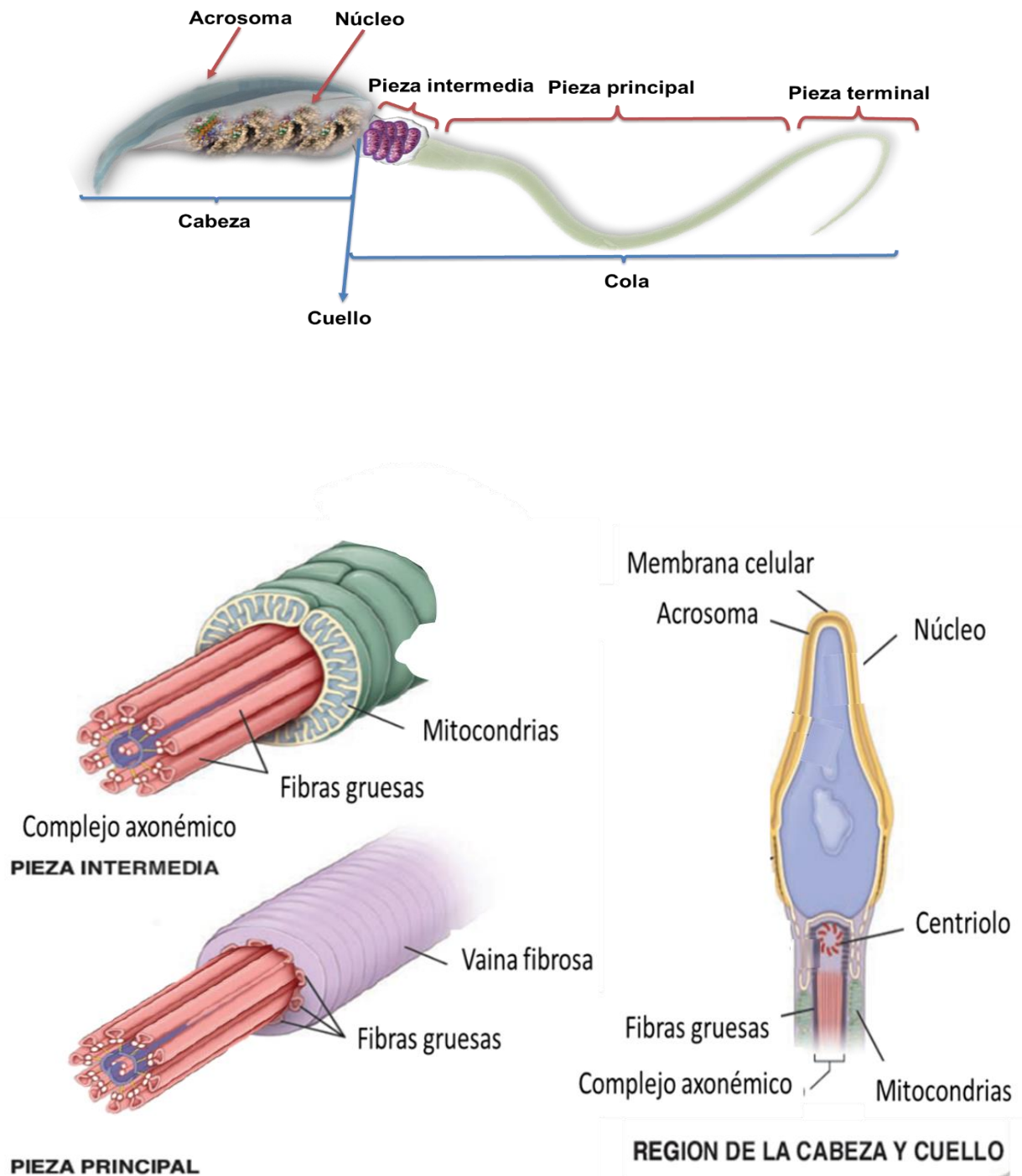


Figura 6. Ilustración de un espermatozoide (Modificado de Ross y Pawlina, 2015).



Morfología espermática

La morfología espermática es una de las principales características implicadas en la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Es considerada como un índice predictor de la fertilidad. La relación que existe entre la infertilidad y la proporción de formas anormales en el eyaculado es un tema de estudio de muchos investigadores, ya que, en este parámetro, la variabilidad en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales se relaciona con la fertilidad (Yu, 2014). De ahí la importancia de analizar este parámetro con técnicas que permiten una clara distinción de las regiones del espermatozoide.

La morfología del espermatozoide en la valoración de la calidad espermática muestra la existencia de una clara asociación entre la estructura y la función del espermatozoide. Se ha observado que los espermatozoides morfológicamente normales son capaces de un movimiento más rápido y recto. En cambio, la mayoría de las formas anormales son inmóviles o exhiben una movilidad lenta. Existen distintas explicaciones para este efecto, como una hidrodinámica deficiente debido a alteraciones en la morfología de la cabeza (Gimeno, 2014).

3. Esteroidogénesis y células de Leydig

En el testículo, las células de Leydig se localizan entre los tubos seminíferos (compartimento intersticial), constituyen el 20% del total de la gónada y su función es la síntesis de andrógenos (Gómez y col., 2012; Ross y Pawlina, 2015). La testosterona es el andrógeno esencial en la diferenciación sexual, el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, las glándulas sexuales accesorias, la espermatogénesis y la conducta sexual (Gómez y col., 2012).

En la síntesis de testosterona, las células de Leydig utilizan el colesterol que se obtiene de la ingesta dietética y que circula en la sangre unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL), el que se sintetiza *de novo* dentro del testículo a partir de acetil coenzima A, o bien el que se libera de las reservas intracelulares de los ésteres de colesterol almacenados en el interior de la célula en forma de gotas lipídicas (Tresguerres, 2010; Gómez y col., 2012).

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 (PKA), la cual origina 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 de la membrana externa a la interna, donde se convierte en pregnenolona por la enzima que escinde la cadena lateral del colesterol (P450_{scc}). La pregnenolona por medio de la 3 β -hdroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) forma la progesterona, ésta por efecto de la 17 α -hidroxilasa origina la 17 α -hidroxiprogesterona, que por medio de la misma enzima se transforma en androstenediona. Finalmente, esta última forma testosterona, por la enzima 17 β -hdroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) (Tresguerres, 2010).

4. Regulación de las funciones del testículo

- **Eje hipotálamo-hipófisis-testículo**

En el hipotálamo se sintetiza la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), la cual se libera de forma pulsátil al sistema porta-hipotalámico-hipofisario y se une a su receptor en los gonadotropos de la adenohipófisis. En respuesta a la GnRH se sintetiza y libera la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante de los folículos (FSH). En el testículo la LH regula la síntesis de testosterona por las células de Leydig y la FSH regula en las células de Sertoli el número de espermatogonias que entrarán en el proceso de división (Griswold, 1995; Molina, 2009) (**Figura 7**).

Los esteroides y péptidos gonadales ejercen un control de retroalimentación en la síntesis y liberación de las gonadotropinas. La testosterona regula a nivel hipotalámico la secreción de GnRH y en la hipófisis la secreción de FSH por un sistema de retroalimentación negativa. Por otra parte, las células de Sertoli sintetizan inhibina en respuesta a la estimulación de FSH y su principal función es la de inhibir la secreción de esta gonadotropina en la adenohipófisis por un mecanismo de retroalimentación negativa. En esta regulación también participa la activina que es un péptido sintetizado en la hipófisis y que antagoniza la acción de la inhibina, ya que estimula la liberación de FSH (Molina, 2009) (**Figura 7**).

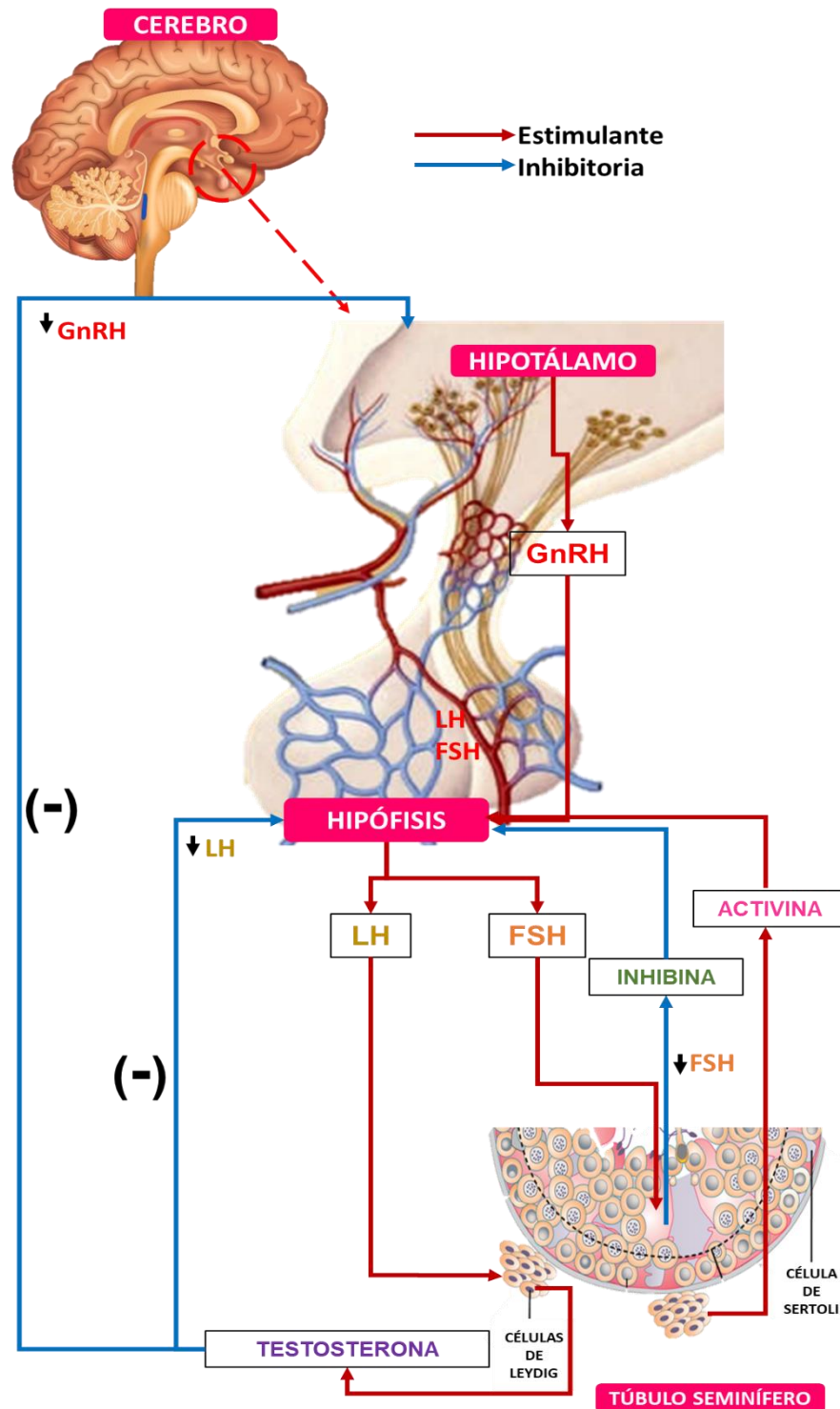


Figura 7. Esquema que muestra la regulación neuroendocrina de las funciones del eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH) (Modificado de Ross y Pawlina, 2015).



5. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso altamente regulado que se caracteriza por denotados cambios morfológicos y bioquímicos. Entre los cambios morfológicos está la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear, la reducción del volumen celular donde el citoplasma se contrae provocando una disminución en el tamaño celular y finalmente la formación de vesículas de diferentes tamaños rodeadas de membrana plasmática íntegra que contienen cromatina y orgánulos llamadas cuerpos apoptóticos. A nivel molecular ocurren cambios en la mitocondria como la reducción del potencial transmembranal, el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones para la síntesis de ATP y el incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), lo que propicia la degradación de proteínas y la fragmentación del ADN (Galluzzi y col., 2012; Atale y col., 2014; Burgueño y col., 2017).

La apoptosis es inducida por varias señales (fisiológicas o estimulaciones ambientales exógenas) y su ejecución tiene lugar por dos vías principales, la extrínseca mediada por un receptor de muerte y la vía intrínseca mediada por la mitocondria. Sin embargo, las moléculas de una vía pueden influir en la otra (Jeongwu y col., 1997; Angosto, 2003; Galluzzi y col., 2012; Atale y col., 2014; Burgueño y col., 2017).

- **Vía extrínseca**

Esta vía apoptótica involucra la unión de ligandos a los receptores transmembranales de la superficie celular. Estos receptores pertenecen a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF o receptores de muerte, tienen dominios de muerte intracelulares, los cuales fungen como sitios de unión a otras proteínas, que estimulan vías de transducción de señales apoptóticas. Entre estos receptores tenemos al FAS, cuando el ligando se une a este receptor provoca la unión de la proteína asociada con el dominio de muerte del efector que para esta vía es la caspasa 8, continuado con la activación de la cascada de caspasas dando como resultado la escisión de proteínas intracelulares y reguladores lo que finalmente culmina en la apoptosis (Atale y col., 2014; López y col., 2016) (**Figura 8**).

- **Vía intrínseca**

Esta vía de señalización involucra diversos estímulos que no están mediados por receptores. Se rige por señales intracelulares que actúan directamente dentro de la célula, específicamente por la pérdida de permeabilidad y del potencial de la membrana

mitocondrial, lo que causa la liberación al citoplasma de dos grupos principales de proteínas pro-apoptóticas (citocromo C) que normalmente se encuentran en el espacio intermembrana. Cuando el citocromo C es liberado al citoplasma se une al factor apoptótico 1 (APAF1) el cual funge como andamio para la formación del apoptosoma. La unión citocromo C-APAF1, permite la oligomerización de siete unidades de citocromo C-APAF1, que construyen el apoptosoma activo en donde se ensambla la caspasa 9. Posteriormente activan a las caspasas efectoras, lo que finalmente resulta en la muerte celular (Atale y col., 2014; López y col., 2016) (Figura 8).

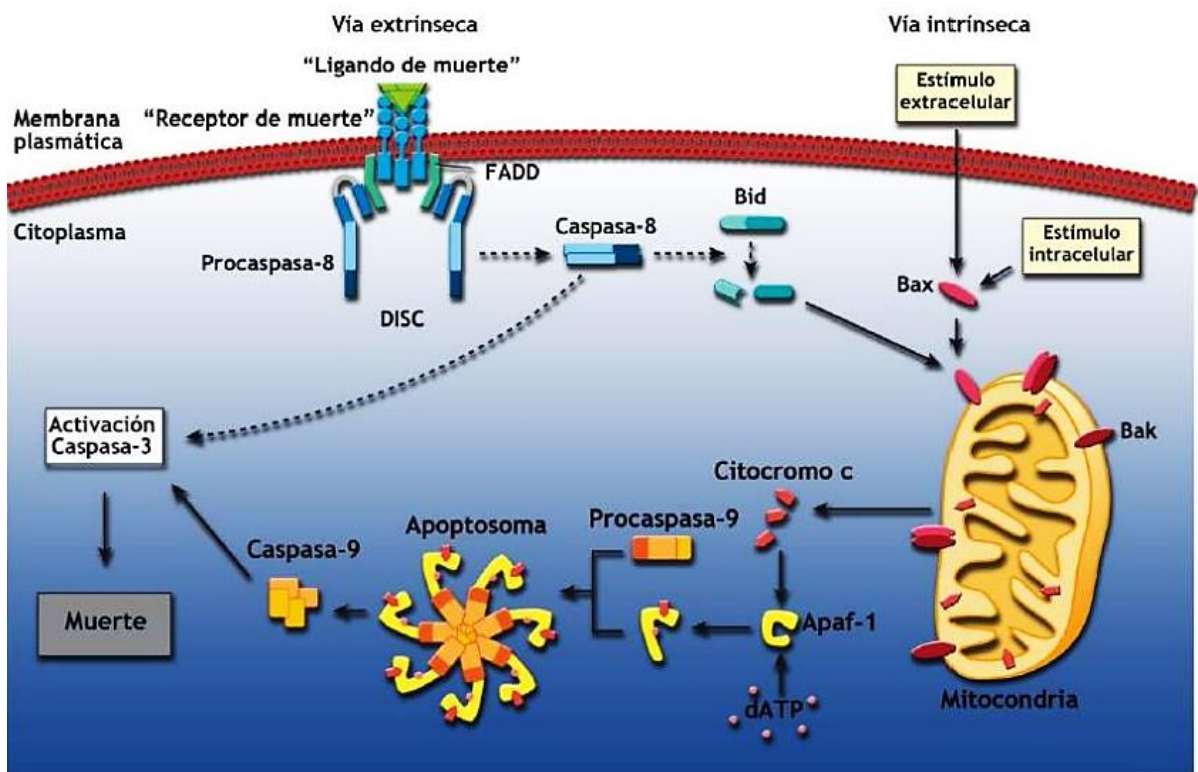


Figura 8. Esquema que muestra la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis (Modificado de Meresman, 2011).

Los diferentes tipos de muerte celular a menudo se definen por criterios morfológicos, sin una referencia de mecanismos bioquímicos precisos. El Comité de Nomenclatura sobre la Muerte Celular (NCCD, por sus siglas en inglés) propone criterios unificados para la definición de muerte celular y de sus diferencias morfológicas (Kroemer y col., 2009), las cuales se resumen en la siguiente tabla:



Tabla 1. Distintas modalidades de muerte celular

Modo de muerte celular	Rasgos morfológicos	Notas
Apoptosis	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Redondeo de la célula. ✓ Retracción de los pseudópodos. ✓ Reducción del volumen celular y nuclear (picnosis). ✓ Fragmentación nuclear (cariorexix). ✓ Modificación menor de orgánulos citoplásmicos. ✓ Ampollas en la membrana plasmática. ✓ Envolvimiento por fagocitos residentes, <i>in vivo</i>. 	<p>'Apoptosis' es el término original introducido por Kerr y colaboradores (1972) para definir un tipo de muerte celular con características morfológicas específicas.</p>
Autofagia	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Falta de condensación de la cromatina. ✓ Vacuolización masiva del citoplasma. ✓ Acumulación de vacuolas autofágicas (de doble membrana). ✓ Poca o nula captación de células fagocíticas, <i>in vivo</i>. 	<p>La palabra autofagia significa "comerse a sí mismo". Se trata de un proceso esencial para la renovación celular, y por lo tanto beneficioso para el organismo.</p>
Cornificación	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Eliminación de orgánulos citosólicos. ✓ Modificaciones de la membrana plasmática. ✓ Acumulación de lípidos en gránulos. ✓ Extrusión de lípidos en el espacio extracelular. ✓ Descamación (pérdida de corneocitos) por activación de la proteasa. 	<p>La formación de "envoltura cornificada" o "queratinización" para crear una función de barrera. Aunque la apoptosis puede ser inducida por una lesión en la capa epidérmica basal como ocurre con la radiación UV, la cornificación es exclusiva de las capas superiores (capa granular y estrato córneo).</p>



Necrosis	<ul style="list-style-type: none">✓ Hinchazón citoplásmica (oncosis).✓ Ruptura de la membrana plasmática.✓ Hinchazón de los orgánulos citoplasmáticos.✓ Condensación de cromatina moderada.	Se identifica de manera negativa, la muerte celular que carece de las características de la apoptosis o autofagia. Tenga en cuenta que la necrosis puede ocurrir de forma regulada, lo que implica una secuencia precisa de señales.
-----------------	--	---

Tomado de Kroemer y col., 2009; Galluzi y col., 2012

- **Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio**

Debido a que la apoptosis es un proceso dinámico, la aparición de los eventos relacionados y su detección van a depender de múltiples factores. Dentro de los procesos comúnmente utilizados para detectar la apoptosis está la degradación de ADN, cambios en la simetría de la membrana celular y activación de proteínas específicas. Condiciones de estrés y daño al ADN provocado por tóxicos o radiación, pueden inducir a la célula a comenzar un proceso apoptótico (Pérez y Lie, 2012).

Existen pruebas para evaluar la viabilidad celular y el índice apoptótico que se basan en el análisis de la integridad de la membrana y la captación diferencial de los colorantes fluorescentes. El naranja de acridina y el bromuro de etidio permiten determinar que células de la población han sufrido apoptosis y si la célula se encuentra en los estados apoptóticos temprano o tardío, según la integridad de la membrana (McGahon y col., 1995).

El naranja de acridina se intercala en el ADN, dándole un aspecto verde. Así, una célula viable tendrá un núcleo verde brillante y un citoplasma rojo. El bromuro de etidio solo es absorbido por las células no viables. Este colorante también se intercala en el ADN, lo que lo hace parecer naranja. Así, una célula muerta tendrá un núcleo de color naranja brillante y su citoplasma, si tiene algún contenido restante, aparecerá de color rojo oscuro (McGahon y col., 1995).

Tanto los núcleos normales como los apoptóticos en las células vivas tendrán una fluorescencia verde brillante. En contraste, los núcleos normales o apoptóticos en las células muertas emitirán fluorescencia de color naranja brillante. Las células vivas con membranas intactas tendrán un color verde uniforme en sus núcleos. Las células apoptóticas tempranas



cuyas membranas aún están intactas, pero han comenzado a fragmentar su ADN seguirán teniendo núcleos verdes ya que el bromuro de etidio no puede ingresar a la célula, pero la condensación de la cromatina se hará visible como parches de color verde brillante en los núcleos. A medida que la célula avanza en el proceso apoptótico, el bromuro de etidio puede ingresar a la célula y teñirla de color naranja. Las células apoptóticas tardías tendrán áreas anaranjadas brillantes de cromatina condensada en el núcleo que las distinguirán de las células necróticas, que tienen un color naranja uniforme (McGahon y col., 1995).

Basik' y colaboradores (2006) realizaron un estudio donde se compararon varios métodos para detectar la apoptosis en leucocitos humanos, con microscopía de fluorescencia (naranja de acridina/bromuro de etidio vs Anexina V). La apoptosis se indujo utilizando varias dosis de cicloheximida (CHX) o mediante radiación con UVB a 312 nm. Ambos métodos de fluorescencia proporcionaron resultados confiables y reproducibles, diferenciando claramente entre las subpoblaciones de células apoptóticas y la relación entre ellas. Con base en sus resultados, los autores recomiendan el examen microscópico de las células teñidas con naranja de acridina/bromuro de etidio como un método confiable para evaluar apoptosis.

- **Especies reactivas de oxígeno**

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos, tanto inorgánicos como orgánicos. Se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y desempeñan un papel importante en la señalización celular. Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía liberan ERO. Bajo condiciones fisiológicas y de forma controlada, la producción de ERO es imprescindible para la correcta funcionalidad de los espermatozoides. Las ERO controlan la maduración, capacitación e hiperactivación del espermatozoide, además de intervenir en la reacción acrosómica y la fusión del espermatozoide con el óvulo, por lo que la producción de ERO es necesaria para la adquisición de la capacidad fecundante del espermatozoide (Leclerc y col., 1997; Aitken y col., 1995, 2000; Lewis y John, 2005; Lamirande y col., 1997).

El incremento en la producción de ERO ocasiona el llamado estrés oxidante, sin embargo, las células poseen mecanismos de defensa denominados genéricamente como antioxidantes, que son sustancias que retardan o inhiben la oxidación de sustratos susceptibles al ataque de las ERO (Pérez y col., 2000). Si el equilibrio entre antioxidantes y ERO se rompe y estas últimas se elevan, pueden generar estrés oxidante que trae como consecuencia daños celulares irreparables. Al respecto, existen estudios que confirman la



asociación entre el estrés oxidante y la infertilidad masculina (Lamirande y col., 1997; Garrido y col., 2004; Chabory y col., 2010; Kothari y col., 2010; Aktan y col., 2013).

La producción celular de ERO fue observada por primera vez en espermatozoides de mamíferos a finales de los años cuarenta. Varios investigadores coinciden en afirmar que los gametos masculinos constituyen la principal fuente de radicales libres en el semen. Las concentraciones de ERO producidas por los espermatozoides dañados o defectuosos son superiores a las generadas por aquellos morfológicamente normales. Debido al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, los espermatozoides humanos son especialmente sensibles al daño por ERO. La lipoperoxidación (LPO) de la membrana de los espermatozoides se correlaciona con la disminución de la movilidad espermática y con los defectos morfológicos (Alba y col., 2000).

Jana y colaboradores (2009) investigaron los efectos de la adición de PicCr al cultivo de linfocitos de humano y a partir de los datos de citotoxicidad, el patrón de fragmentación del ADN, la tinción con anexina V, la positividad de TUNEL y las características ultraestructurales, como la condensación de la cromatina y la formación de cuerpos apoptóticos, muestran que el PicCr induce apoptosis dependiente de la concentración debido al aumento en la producción de ERO, lo que se refleja en el colapso del potencial de membrana mitocondrial, aumento del contenido de citocromo C citosólico y su activación.

- **Apoptosis en espermatozoides**

Existen dos características distintivas de la apoptosis espermática una de estas es que durante la vía intrínseca se propicia un aumento repentino en la generación de ERO. La producción de estos radicales inicia una cascada de LPO que resulta en la generación de aldehídos lipídicos citotóxicos resultado de los ataques a los ácidos grasos poliinsaturados por parte de los radicales libres. Los peróxidos generados se unen a proteínas involucradas en el transporte de electrones, lo cual desregula su acción permitiendo la fuga de electrones que son consumidos por el aceptor de electrones universal, el oxígeno, y genera el anión superóxido, que rápidamente se convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual desencadena aún más LPO. De esta manera, el estrés oxidante iniciado por la mitocondria se activa por la vía apoptótica intrínseca. El agotamiento de ATP y la unión de proteínas en el axonema da como resultando la pérdida de la movilidad del espermatozoide y las ERO mitocondriales secundariamente inducen la fragmentación del ADN (Aitken, 2000; Quintero y col., 2015).



El proceso de la apoptosis es importante en el contexto de las células germinales ya que durante el proceso de división pueden generarse errores, que crean la necesidad de inducir la muerte celular para eliminar a las células con defectos genéticos. La buena organización de la población de las células germinales es vital para el proceso de espermatogénesis y la fertilidad masculina (Aitken y col., 1995; Aitken, 2000; Aitken y Robertson, 2012).

6. Factores que afectan la calidad espermática

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la infertilidad como una enfermedad del sistema reproductivo que se caracteriza por la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales no protegidas (Olmedo y col., 2003; OMS, 2010). La infertilidad es una condición que afecta del 6 al 10% de las parejas en edad reproductiva (Olmedo y col., 2003; Vite y col., 2005; Martínez y col., 2012).

Comparado con otras especies, el ser humano es altamente ineficiente en términos de reproducción. La tasa de fertilidad por ciclo menstrual es de alrededor del 20% y la de embarazos en las parejas con fertilidad probada es aproximadamente del 90% después de doce meses y del 94% luego de dos años (Olmedo y col., 2003).

El 40% de los casos de infertilidad se atribuyen al varón (alteraciones testiculares, obstrucción de conductos, patologías en la próstata, alteraciones en la eyaculación o erección, alteraciones en el semen, entre otras); otro 40% se debe a causas en la mujer (problemas ováricos, endometriosis, obstrucciones o lesiones de las trompas de Falopio, anomalías uterinas y/o cervicales, entre otras); el 20% restante corresponde a causas mixtas o combinadas, en las que ambos cónyuges son responsables (Vidal, 2001).

La infertilidad también puede ser de origen idiopático en el que podrían estar involucrados otros factores que ponen en riesgo la salud reproductiva, que, en el caso del varón, generalmente se refleja en la calidad del semen. Entre estos factores se encuentran la exposición a radiaciones, estrés, fármacos, drogas, tabaco, alcohol, así como aspectos nutricionales por ejemplo hábitos alimenticios, deficiencias de macro y micronutrientes, entre otras (Rosas, 2007; Quintero y col., 2015).



7. Picolinato de cromo

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, como el picolinato de cromo (PicCr).

El PicCr [$\text{Cr}(\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2)_3$], es un compuesto con peso molecular de 418.3 g/mol que consta de tres complejos de ácido picolínico (AcPic) y un centro de cromo trivalente $\text{Cr}(\text{III})$ (Vincent, 2000) (**Figura 9**).

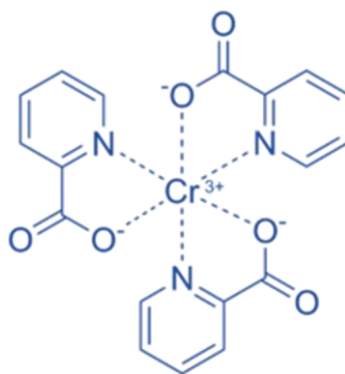


Figura 9. Estructura química del picolinato de cromo [$\text{Cr}(\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2)_3$] (Tomado de Kim y col., 2003).

El cromo es un elemento natural, que se encuentra en gases volcánicos, rocas, plantas, suelos, animales y en los humos. Las valencias del cromo son +2, +3, +4, +5 y +6. En el ambiente se encuentra en varias formas, las más estables y de importancia biológica son el $\text{Cr}(\text{III})$ y $\text{Cr}(\text{VI})$ (Albert, 1997).

El $\text{Cr}(\text{III})$ es uno de los elementos traza más comunes en la tierra. Es un nutriente esencial que se encuentra en una gran variedad de alimentos (**Tabla 1**). Se considera que participa en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos (Grijalva y Cabrera, 2001; Cefalu y Hu, 2004).

En 2001 la Junta de Alimentos y Nutrición de los Estados Unidos de la Academia Nacional de Ciencias (Food and Nutrition Board, 2002) estableció que la ingesta diaria adecuada de $\text{Cr}(\text{III})$ es de 25 μg para mujeres adultas y 35 μg para hombres adultos (Vincent, 2000), siendo la dosis recomendada en forma de PicCr de 200 $\mu\text{g}/\text{día}$ (Lamson y Plaza, 2002; Gómez y Magaña, 2003; Havel, 2004).



Tabla 2. Cantidad aproximada de Cr(III) (μg) en algunos alimentos.

Alimento	Porción	Cromo por porción (μg)
Leche entera	1 taza	0.1
Mantequilla	1 porción	0.1-0.3
Huevos	1	Menos de 0.5
Zanahorias	1 mediana	0.5
Naranja	1	0.5
Pechuga de pollo	85 g	0.5
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
Pavo	85 g	0.9-1.7
Brócoli	½ taza	0.9-11.0
Plátano	1 mediano	1.0
Arroz blanco	1 taza	1.2
Carne de res	85 g	2
Ejotes	1 taza	2.2
Levadura de cerveza	30 g	3.3
Galletas de chocolate	4	3.4
Té y café	1 taza	8.0

(Modificado de Gómez y Magaña, 2003; Havel, 2004).



Vincent (2000) propone una vía metabólica para la acción del cromo (**Figura 10**):

Cuando la concentración de glucosa en la sangre aumenta (1) induce la secreción de insulina por las células beta del páncreas (2), la insulina se une a su receptor, lo que provoca la movilización de vesículas portadoras del receptor a transferrina (3), esta proteína se encuentra en el torrente sanguíneo y es capaz de transportar iones de Cr(III) (4), una vez acoplada la transferrina con su receptor, internaliza al Cr(III) por endocitosis, el cual es liberado en el citoplasma y capturado por la apocromodulina (5), la unión de cuatro iones de Cr(III) a la apocromodulina, forman la cromodulina (forma activa de la apocromodulina) (6), que se une a la parte interna de los receptores de insulina activos, dando como resultado la estimulación de la actividad tirosina cinasa del receptor (7), lo que promueve la translocación de los transportadores de glucosa (GLUT) hacia la membrana plasmática, incrementando así su número (8) y permite que la glucosa se una al GLUT en la cara interna de la membrana, provoca un cambio en la conformación del transportador y así la glucosa y su sitio de unión quedan localizados en la cara interna de la membrana (9) y se internaliza al citoplasma, de esta forma se aumenta la velocidad del transporte de glucosa hacia el interior celular. Por esto se menciona que la cromodulina participa como un amplificador de la señal de la insulina (Vincent, 2000; Cefalu y Hu, 2004; Gómez y Magaña, 2003).

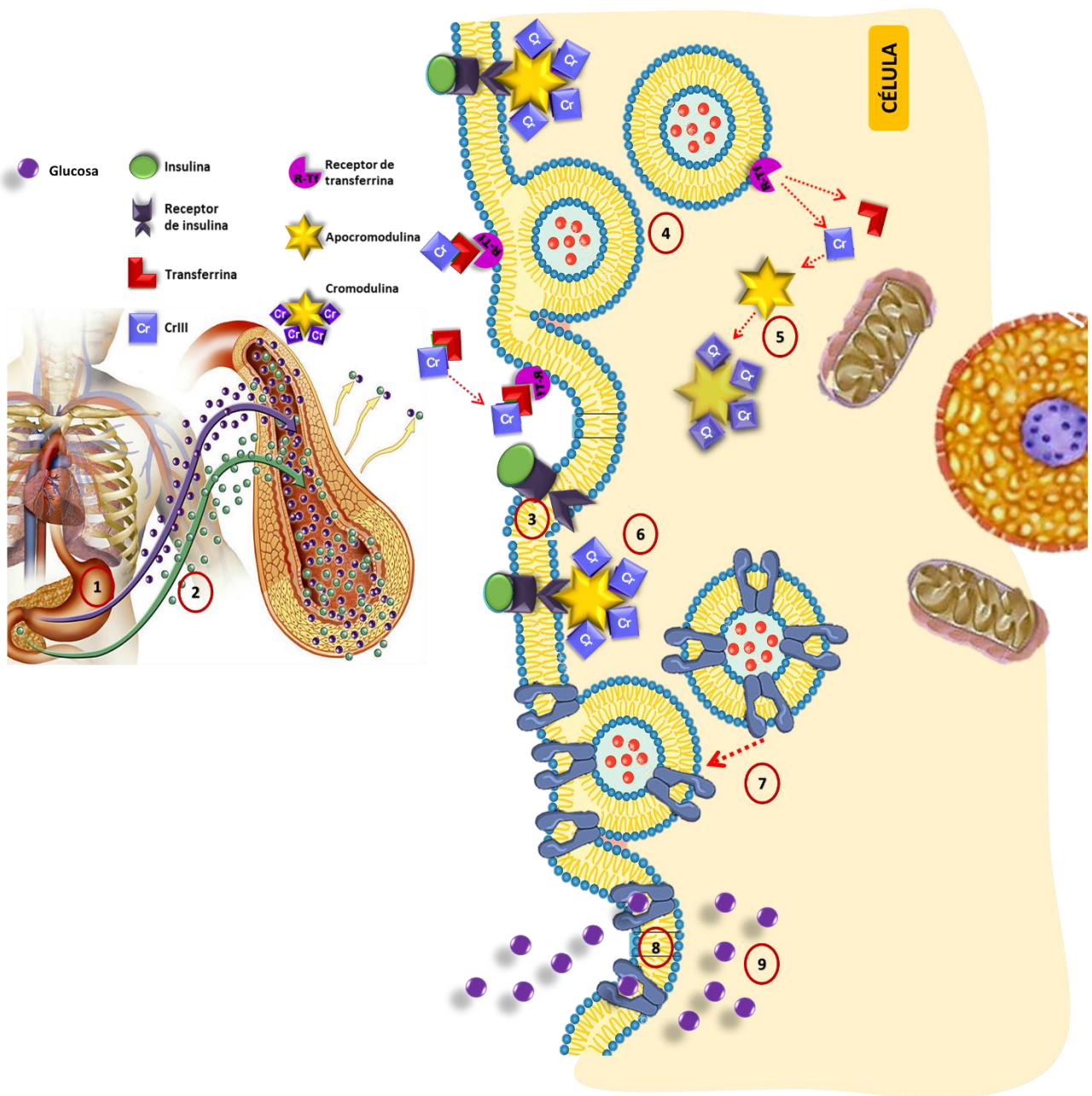


Figura 10. Esquema que muestra el mecanismo propuesto para el ingreso de Cr(III) presente en la sangre al interior de la célula y la formación de cromodulina (Modificado de Vincent, 2000).



En el PicCr, la asociación del Cr(III) con el AcPic incrementa la biodisponibilidad del ión, ya que la absorción de Cr(III) proveniente de la dieta es del 0.5 al 2%, mientras que en forma de PicCr aumenta del 2 al 5% (Elgharabawy y Emara, 2014). El AcPic tiene actividad quelante (sustancia que forma complejos con iones metálicos como cromo, zinc, entre otros), lo que lo convierte en un ácido esencial para el proceso metabólico de ciertos elementos minerales (Evans y Pouchmik, 1993; Tomioka y col., 2007).

Según la COFEPRIS (2016) la función de un suplemento alimenticio es incrementar, complementar o suplir alguno de los componentes que adquirimos a través de la dieta. Algunas personas por diversas causas no obtienen de su alimentación todos los nutrimentos que necesitan y por ello recurren a los suplementos alimenticios. Sin embargo el PicCr es comercialmente exitoso debido a que se promociona como agente reductor de peso y constructor muscular (menos grasa y más músculo) (Hepburn y Vincent, 2002; Ryan y col., 2003; Havel, 2004; Elgharabawy y Emara, 2014). Es un producto de venta libre en el mercado y por internet como suplemento alimenticio en presentaciones que van de 200 a 2000 μg por tableta, bajo la leyenda “Este producto no es un medicamento. El consumo de este producto es responsabilidad de quien lo recomienda y de quien lo usa”. En los Estados Unidos de América, las ventas anuales de PicCr suman más de 500 millones de dólares (Vincent, 2000). En México, según el reporte de Suplementos Dietéticos, el pronóstico de crecimiento anual en esta industria es del 2%, hasta alcanzar ventas minoristas por 9,200 millones de pesos para el 2022 (Sánchez, 2019).

Se sugiere que el efecto del PicCr es actuar como cofactor en el mantenimiento del metabolismo de los lípidos y carbohidratos normales potenciando la acción de la insulina en la membrana celular. Sin embargo, 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; Kim, 2003).

El PicCr se mantiene estable en el jugo gástrico por varias horas, pasa sin obstáculos a través del yeyuno, se distribuye por el torrente sanguíneo y se incorpora a las células de manera original, que es la forma nociva *in vivo*. Hepburn y Vincent, (2003) mostraron que el PicCr tiene una vida media de 30 minutos en el torrente sanguíneo, ingresa intacto a órganos como el hígado, riñón y músculo esquelético en donde se disocia, liberándose el Cr(III) (Hepburn y Vincent, 2002). En esta disociación participan agentes reductores que transforman el Cr(III) en Cr(II), momento en el cual se generan radicales libres (Speetjens y col., 1999; Levina y Lay, 2008).



Se ha descrito que la distribución del Cr(III) obtenido por la ingesta crónica de PicCr se refleja en una variedad de tejidos, que incluye la grasa epididimal y los testículos (Elgharabawy y Emara, 2014).

8. Efectos del picolinato de cromo en diferentes modelos experimentales

La primera evidencia sobre los efectos dañinos del PicCr fue publicada por Stearns y colaboradores (1995), quienes mostraron que causa daño cromosómico en células de ovario de hámster chino. Posteriormente se describe, en el mismo modelo experimental, que el PicCr es un inductor de apoptosis (Manygoats y col., 2002). 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, promueve la apoptosis e incrementa el daño oxidante; además produce genotoxicidad, ya que decrece la síntesis de ADN y aumenta la fragmentación del mismo (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 anomalías esqueléticas (Bailey y col., 2006; Chávez, 2013). En células de la granulosa de mujer, el PicCr es un disruptor endócrino (agente exógeno que interfiere con la síntesis, metabolismo o acción de las hormonas responsables de mantener la homeostasis) con comportamiento hormético (sobrecompensación de una célula u organismo para garantizar el mantenimiento de la homeostasis) sobre la secreción de 17β -estradiol (Kavlock y col., 1996; Calabrese y Baldwin, 2002; Diamanti y col., 2009; 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 varones 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). En el ratón adulto la ingesta diaria y prolongada de PicCr disminuye los parámetros seminales dependiendo de la concentración del suplemento y del tiempo de ingesta (Chavira, 2017).



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los efectos benéficos del PicCr sobre la composición corporal son mínimos o nulos, no obstante, el consumo de este suplemento por adultos jóvenes en edad reproductiva, ha aumentado con el fin de quemar grasa y aumentar la masa muscular. Previamente mostramos que la ingesta diaria de PicCr por adultos jóvenes, disminuye la movilidad, viabilidad y morfología normal de los espermatozoides, lo que compromete la capacidad fertilizante. También en ratones adultos el tratamiento con PicCr disminuye los parámetros seminales dependiendo de la concentración del suplemento y del tiempo de ingesta.

Se ha mostrado en el cultivo de células de ovario de hámster chino, así como en el de linfocitos de humano que el tratamiento con PicCr induce apoptosis, lo que puede ser una de las causas de la disminución en los parámetros seminales previamente observados. Por lo que en el presente estudio se analizaron los efectos que conlleva la ingesta diaria y prolongada de PicCr en la dosis recomendada para consumo humano y diez veces más sobre la viabilidad y la proporción de espermatozoides. Aunado a esta evaluación, se analizó el peso corporal y de los órganos reproductores, así como la morfología espermática.

HIPÓTESIS

Si el PicCr induce apoptosis *in vitro* y disminuye los parámetros seminales, entonces la ingesta diaria y prolongada de PicCr disminuirá la viabilidad espermática, aumentará la apoptosis, e incrementará la proporción de espermatozoides con morfología anormal.

OBJETIVOS

1. Registrar el peso corporal y el peso de los testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata de ratones tratados con diferentes concentraciones de PicCr por cuatro ciclos espermáticos (140 días).
2. Evaluar la morfología espermática de ratones sometidos a la ingesta de PicCr por 140 días, adaptando una técnica de tinción diferencial que permite evaluar la proporción de anomalías morfológicas en cabeza y flagelo.
3. Evaluar la viabilidad y la proporción de espermatozoides en apoptosis temprana y tardía en ratones tratados con diferentes concentraciones de PicCr por 140 días.



MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 24 ratones (*Mus musculus*) macho de la cepa CD1 en etapa adulta (10 semanas de edad), los cuales permanecieron en condiciones convencionales de bioterio de la FES Zaragoza, con fotoperiodo de 14 h de luz (5:00-19:00 h) y 10 h de oscuridad, 40% de humedad, $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura y con alimento y agua *ad libitum*. La experimentación se llevó a cabo en estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Grupos experimentales

Los animales se dividieron en los siguientes grupos experimentales:

- Testigo. Animales sin tratamiento (n=6).
- Vehículo. Animales a los que se les administró únicamente aceite de maíz (vehículo del PicCr) por 140 días (n=6).
- PicCr (0.12 μg). Animales sometidos a la ingesta de PicCr por 140 días en la concentración equivalente a la recomendada para consumo humano (n=6).
- PicCr (1.2 μg). Animales sometidos a la ingesta de PicCr por 140 días en la concentración equivalente a diez veces más la recomendada para consumo humano (n=6).

Administración de PicCr

Se utilizó el PicCr disponible comercialmente para consumo humano (General Nutrition Center [GNC]), en presentación de tabletas de 550 mg con 200 μg de PicCr cada una que es la dosis diaria recomendada para un humano con peso corporal promedio de 65 Kg (Gómez y Magaña, 2003; Havel, 2004). Tomando como base esta concentración de PicCr se calculó la equivalente para el ratón que resultó de 0.12 μg de PicCr/ratón (40 g) /día. Con la finalidad de emular el abuso, se administró 10 veces la dosis recomendada, que equivale a 1.2 μg de PicCr/ratón/día. Las tabletas de PicCr se pulverizaron en un mortero y se pesó la cantidad requerida para suspender cada dosis en un volumen de 50 μL de aceite de maíz.



Se administró Vh o PicCr diariamente a las 8:00 h por vía oral utilizando un repipeteador (eppendorf, Brinkmann Instruments, Ltd. Canadá) con combitubo de 2.5 mL.

Registro del peso corporal

En todos los animales se registró el peso corporal al inicio de los tratamientos, incluyendo a los del grupo testigo, utilizando una balanza digital para animales pequeños (250 ± 0.1 g) (ACCULAB). Se tomó el peso corporal cada 35 días hasta el día del sacrificio.

Peso de órganos

Los animales se sacrificaron por hipoxia al término de los 140 días de tratamiento y los testigos en la edad correspondiente. Primero se obtuvo la muestra seminal y posteriormente se procedió a disecar los testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata. Se eliminaron los residuos de tejido adiposo y se colocaron en un portaobjetos frío. Todos los órganos se pesaron en balanza de precisión.

Obtención de la muestra seminal

A la autopsia se realizó un corte de piel y músculo sobre la línea media del abdomen inferior que se continuó transversalmente a ambos lados. La muestra seminal se obtuvo de los conductos deferentes. Se disecó el extremo distal e inmediatamente después el proximal al testículo. Con la ayuda de pinzas finas se vació el contenido de los conductos en 1 mL de solución Tyrode's (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) mantenida a 37°C en baño de agua.

En cada muestra seminal se analizaron los siguientes parámetros:

Viabilidad

En un portaobjetos se realizó una dilución 1:1 empleando 10 μ L de la muestra espermática y 10 μ L de solución de eosina B (Sigma-Aldrich) al 0.5% en solución salina y se colocó un cubreobjetos. Se contaron bajo el microscopio 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 traslucidos, viables (OMS, 2010).



Morfología

Se utilizó el Kit de Tinción Rápida para la Morfología de Espermatozoides, marca Esperma-Form (Catalogo: ESF-076) recomendado para la tinción de espermatozoides de humano. Se colocó la muestra espermática en un portaobjetos y se realizó un frotis. Se dejó secar a temperatura ambiente y se tiñó siguiendo inicialmente las recomendaciones del fabricante. Se realizaron los ensayos necesarios (volumen de la muestra, tiempo de fijación y tiempo de tinción) hasta obtener la tinción diferencial de las regiones del espermatozoide según lo indica el kit. Se contabilizaron 100 espermatozoides por muestra a un aumento de 400X. Se evaluaron las anomalías morfológicas en cabeza y flagelo tomando como base la clasificación de Sakamoto y Hashimoto (1986).

Evaluación de la apoptosis

Se realizaron los ensayos preliminares necesarios para adaptar la técnica de naranja de acridina/bromuro de etidio en la evaluación de apoptosis en los espermatozoides de ratón, tomando como base la técnica descrita por McGahon y colaboradores (1995) en linfocitos de humano. Se tomaron 2 μL de la muestra espermática y se colocaron en un tubo de 500 μL , se le añadieron 2 μL de solución dual de naranja de acridina (Sigma) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PBS) y bromuro de etidio (Sigma) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PBS), siempre en total oscuridad. La mezcla se colocó en un portaobjetos a 37°C y se realizó inmediatamente la cuantificación de 200 espermatozoides por muestra a 400X bajo el microscopio de Fluorescencia (Nikon Optiphot-2) con un filtro de excitación de luz de 450-490 nm. Los espermatozoides se clasificaron según su fluorescencia en viables (verdes), con apoptosis temprana (amarillos), con apoptosis tardía (naranjas) y necróticos (rojos).

El índice apoptótico (IA) se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{IA} = \frac{\text{Número de células apoptóticas (temprana+tardía)}}{\text{Número total de células contadas}} \times 100$$



Análisis estadístico

El peso corporal y de los órganos se expresaron como media \pm e.e.m. y se analizaron por ANDEVA seguido de la prueba de Tukey. Cuando se compararon parejas de datos se utilizó la prueba de "t" de Student. La proporción de espermatozoides normales y anormales y la proporción de alteraciones en cabeza o flagelo se analizaron por la prueba de Chi cuadrada (Chi^2). Las anomalías de cabeza y de flagelo se analizaron con la prueba exacta de Fisher. Los datos de viabilidad y apoptosis se analizaron por la prueba de Chi cuadrada (Chi^2). Se empleó el paquete estadístico GraphPad Prism 8. Se consideraron como significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor al 0.05.



RESULTADOS

Efecto del PicCr sobre el peso corporal

El peso corporal registrado al término de los 140 días, fue mayor al peso inicial en los grupos testigo y PicCr en ambas concentraciones (**Figura 11**). El peso corporal inicial, así como el peso final entre grupos experimentales, fue similar.

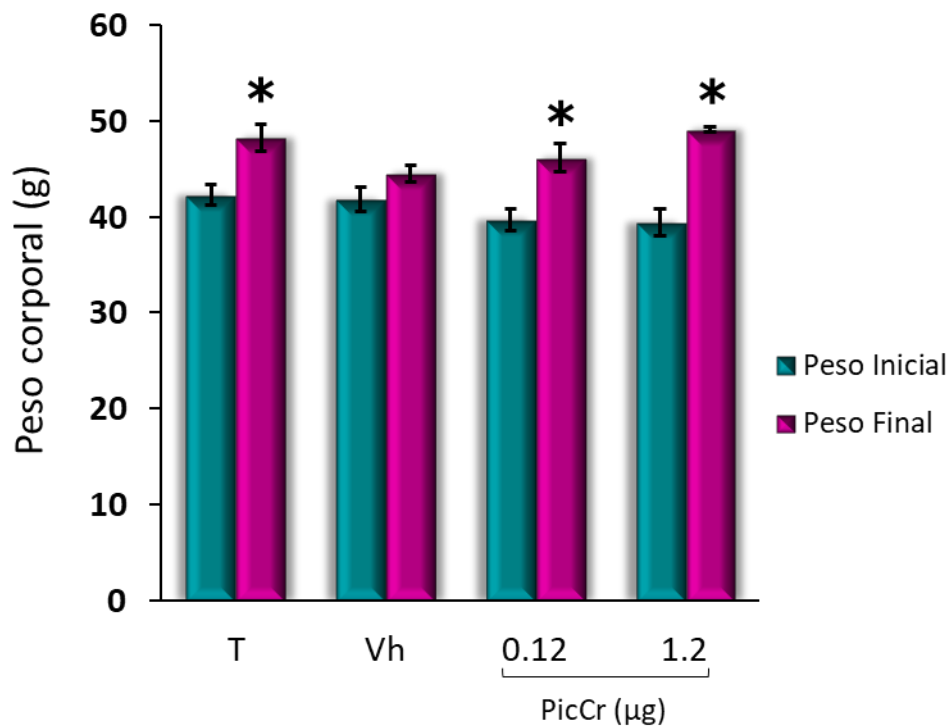


Figura 11. Media \pm e.e.m. del peso corporal inicial y final de ratones sometidos a la ingesta de vehículo o diferentes dosis de PicCr por 140 días y animales sin tratamiento (testigo). * $p < 0.05$ vs peso inicial (Prueba de “t” de Student).



Efecto de la ingesta del PicCr sobre el peso de testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata

El peso de los epidídimos de los grupos tratados con 0.12 y 1.2 μg de PicCr fue mayor respecto al testigo. El peso de las vesículas seminales de los animales tratados con 1.2 μg de PicCr resultó estadísticamente mayor al de los animales tratados con 0.12 μg de PicCr (Figura 12).

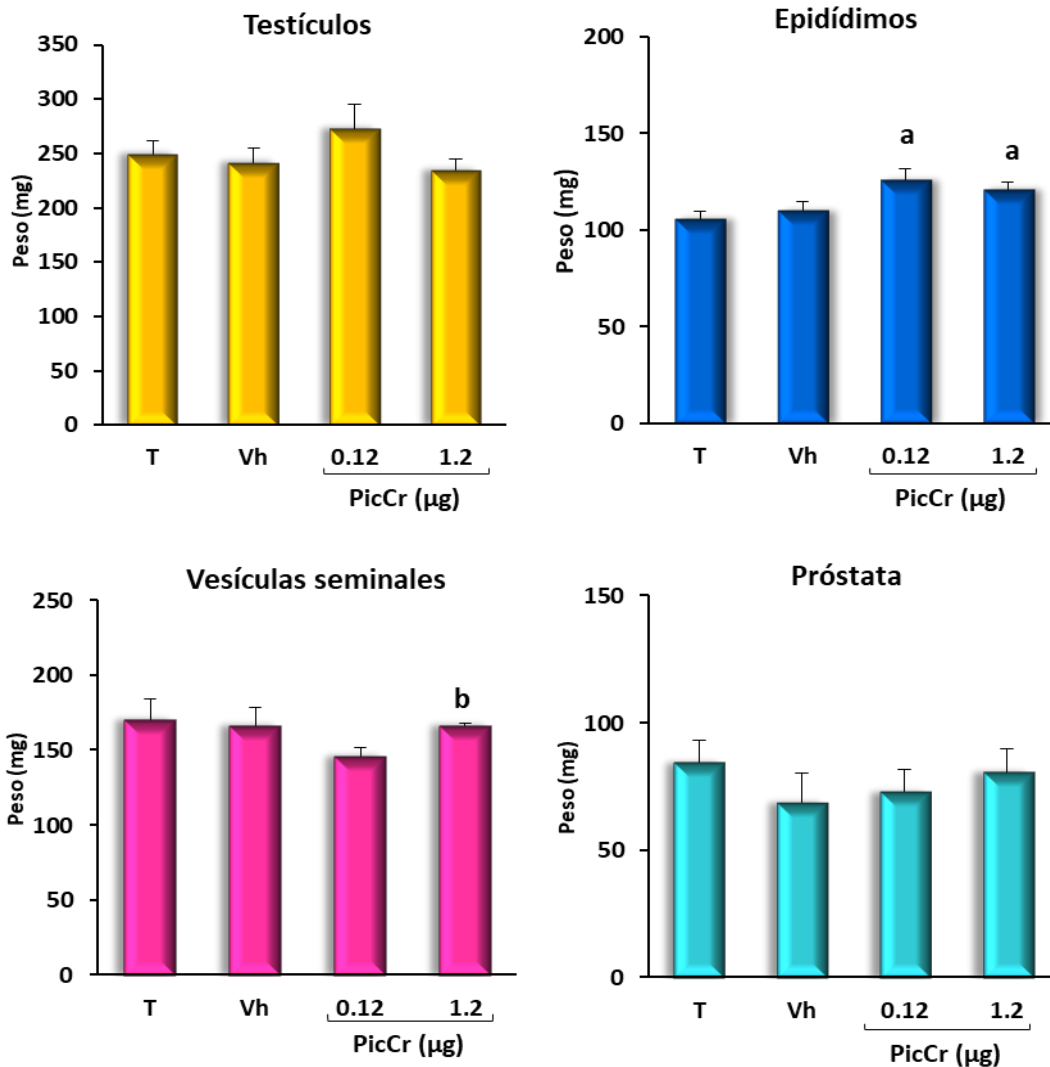


Figura 12. Media \pm e.e.m. del peso de testículos, epidídimos, vesículas seminales y próstata de ratones sometidos a la ingesta de vehículo o diferentes dosis de PicCr por 140 días y ratones sin tratamiento (testigo). **a**, $p < 0.05$ vs Testigo; **b**, $p < 0.05$ vs 0.12 μg de PicCr (ANOVA seguida de Tukey).



Efecto de la ingesta diaria por 140 días del PicCr sobre la morfología espermática

La proporción de espermatozoides con morfología anormal fue mayor en los animales tratados con vehículo y PicCr en ambas concentraciones respecto a la observada en el testigo (Figura 13).

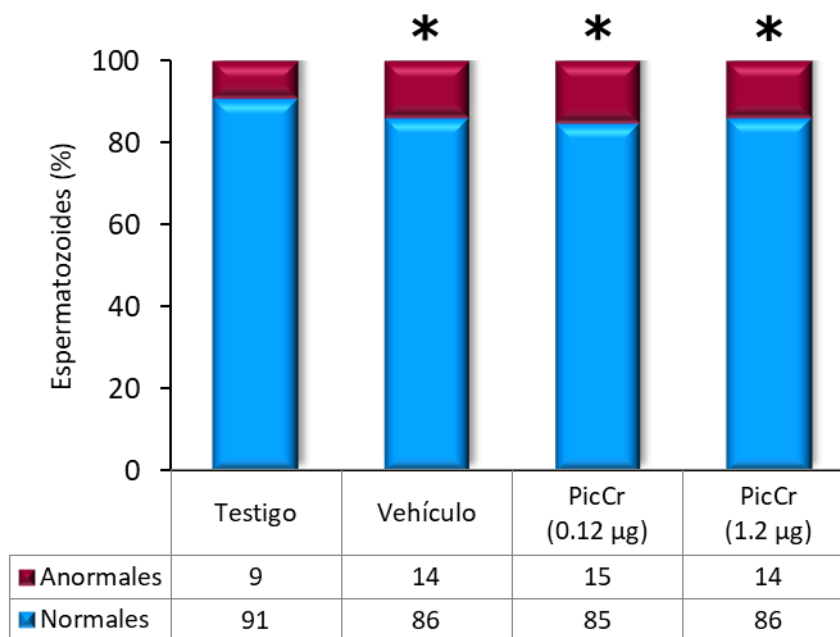


Figura 13. Proporción de espermatozoides normales y anormales de ratones sometidos a la ingesta de vehículo o diferentes dosis de PicCr por 140 días y animales sin tratamiento (testigo). * $p < 0.05$ vs Testigo (Prueba de χ^2).



Entre los grupos, la proporción de espermatozoides con anomalías morfológicas de cabeza fue mayor en los animales tratados con ambas concentraciones de PicCr respecto al testigo. La proporción de espermatozoides con anomalías morfológicas de flagelo no mostraron diferencias significativas (**Figura 14**).

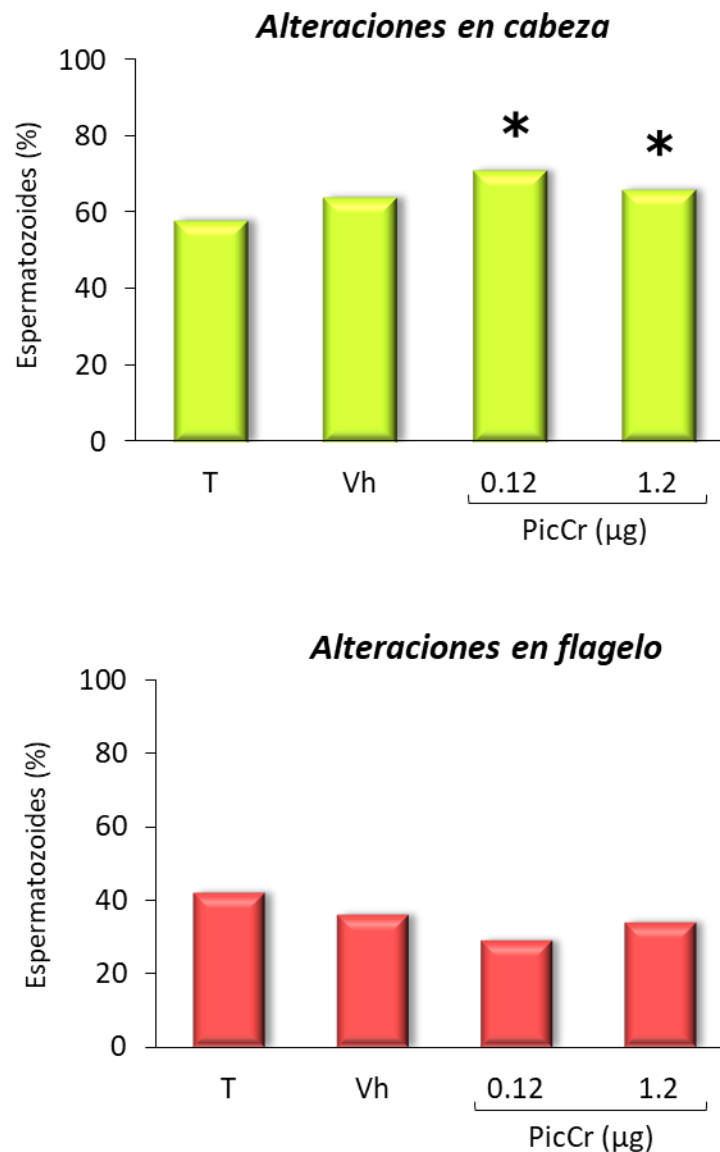


Figura 14. Proporción de espermatozoides con anomalías de cabeza o flagelo de ratones sometidos a la ingesta de vehículo (Vh) o diferentes dosis de PicCr por 140 días y ratones sin tratamiento (T). * $p < 0.05$ vs Testigo (Prueba de χ^2).

Efecto de la ingesta diaria por 140 días del PicCr sobre la distribución del tipo de anomalías morfológicas en la cabeza de los espermatozoides

La proporción de espermatozoides con cabeza sin gancho, sin flagelo y tipo banana fue menor en los espermatozoides de los animales tratados con PicCr respecto a los grupos testigo o vehículo, lo que se refleja en aumento en la proporción de espermatozoides con cabeza amorfa, abanico y alfiler (Figura 15).

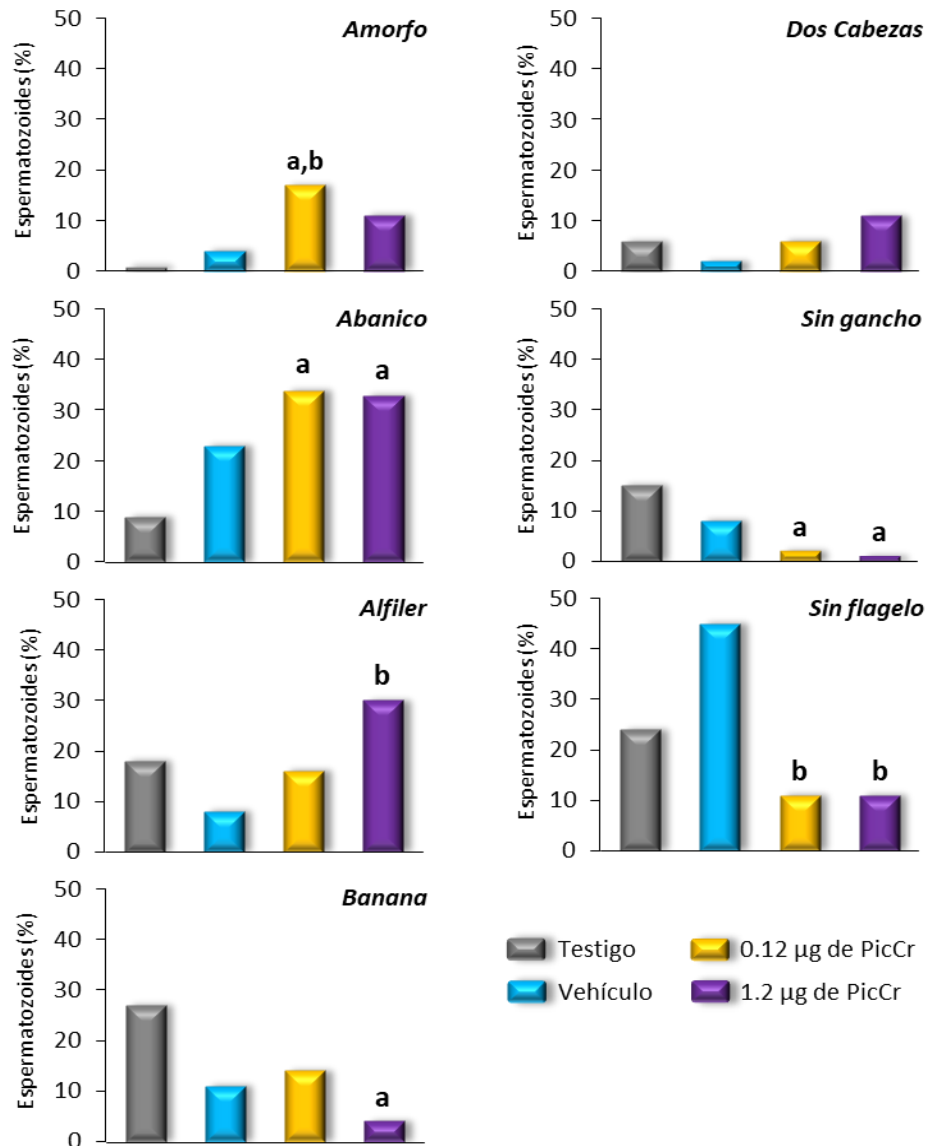


Figura 15. Proporción de diferentes tipos de anomalías en la cabeza de espermatozoides de ratones sometidos a la ingesta de vehículo o diferentes dosis de PicCr por 140 días y ratones sin tratamiento (testigo). **a**, $p < 0.05$ vs Testigo; **b**, $p < 0.05$ vs Vehículo (Prueba exacta de Fisher).



Efecto de la ingesta diaria por 140 días del PicCr sobre la distribución del tipo de anomalías morfológicas en el flagelo de los espermatozoides

La proporción de espermatozoides con dos flagelos o flagelo doblado disminuyó en los grupos tratados con PicCr, pero aumentó la proporción de espermatozoides con flagelo enroscado en el grupo tratado con 1.2 μg de PicCr (**Figura 16**).

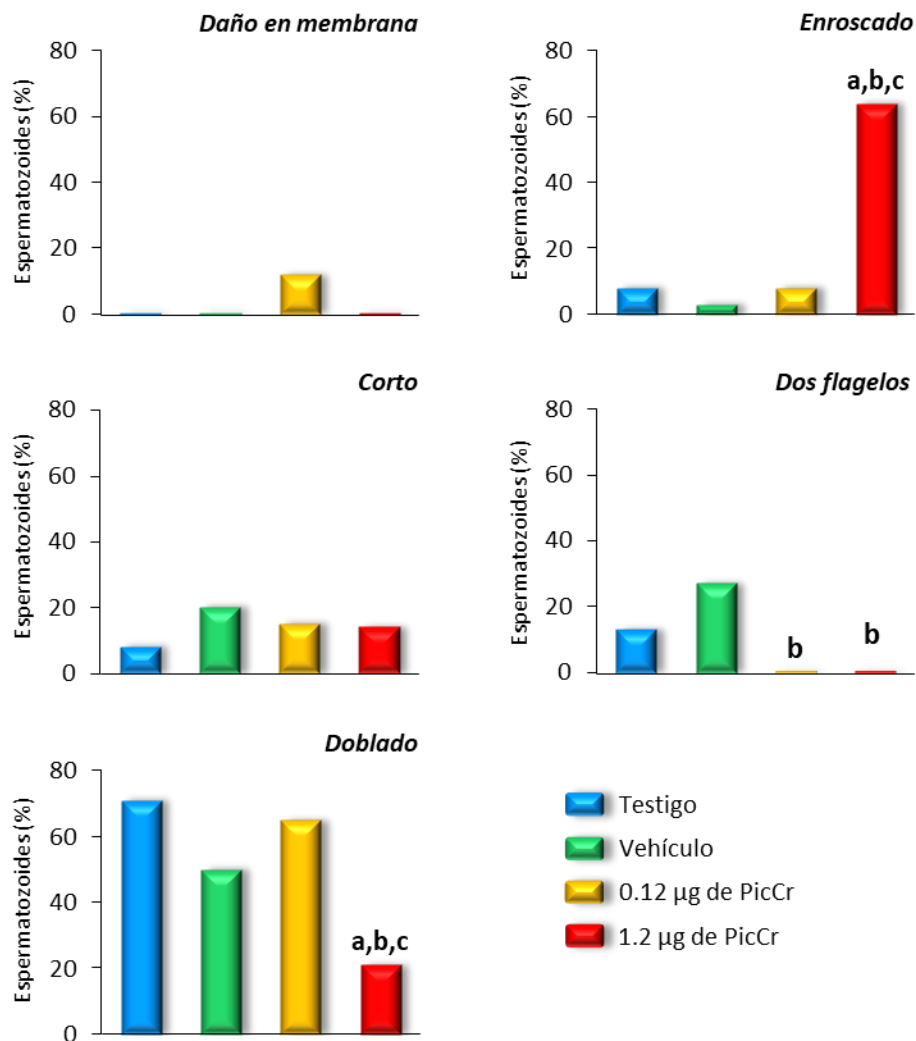


Figura 16. Proporción de diferentes tipos de anomalías en el flagelo de espermatozoides de ratones sometidos a la ingesta de vehículo o diferentes dosis de PicCr por 140 días y animales sin tratamiento (testigo). **a**, $p < 0.05$ vs Testigo; **b**, $p < 0.05$ vs Vehículo; **c**, $p < 0.05$ vs 0.12 μg de PicCr (Prueba exacta de Fisher).



Efecto del PicCr sobre la viabilidad espermática

La proporción de espermatozoides viables en los animales tratados con 0.12 μg de PicCr fue menor a la observada en el testigo, mientras que la proporción de espermatozoides viables en el grupo tratado con 1.2 μg de PicCr fue menor respecto al resto de los grupos (**Figura 17**).

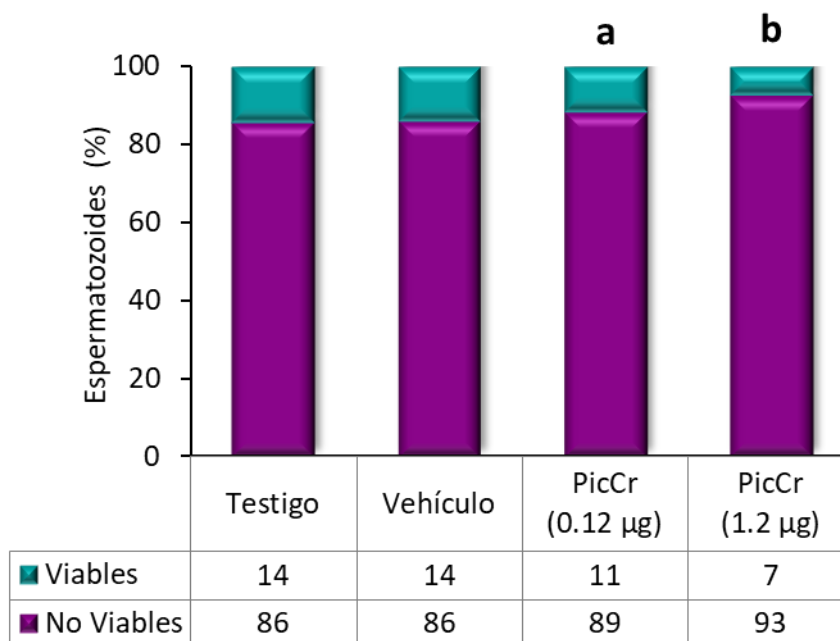


Figura 17. Proporción de espermatozoides viables y no viables de ratones sometidos a la ingesta de vehículo o diferentes dosis de PicCr por 140 días y ratones sin tratamiento (testigo). **a**, $p < 0.05$ vs Testigo; **b**, $p < 0.05$ vs Todos (Prueba de χ^2).

Efecto de la ingesta de PicCr sobre la apoptosis espermática

La proporción de espermatozoides viables de los animales tratados con vehículo o PicCr en ambas concentraciones, resultó ser menor respecto a la del grupo testigo. La proporción de espermatozoides en apoptosis temprana del grupo vehículo fue mayor respecto a la de los animales testigo. En los grupos tratados con PicCr, la proporción de espermatozoides con



apoptosis temprana fue mayor a la observada en los grupos testigo y vehículo. La apoptosis tardía sólo se presentó en espermatozoides de los animales tratados con PicCr (**Figura 18**).

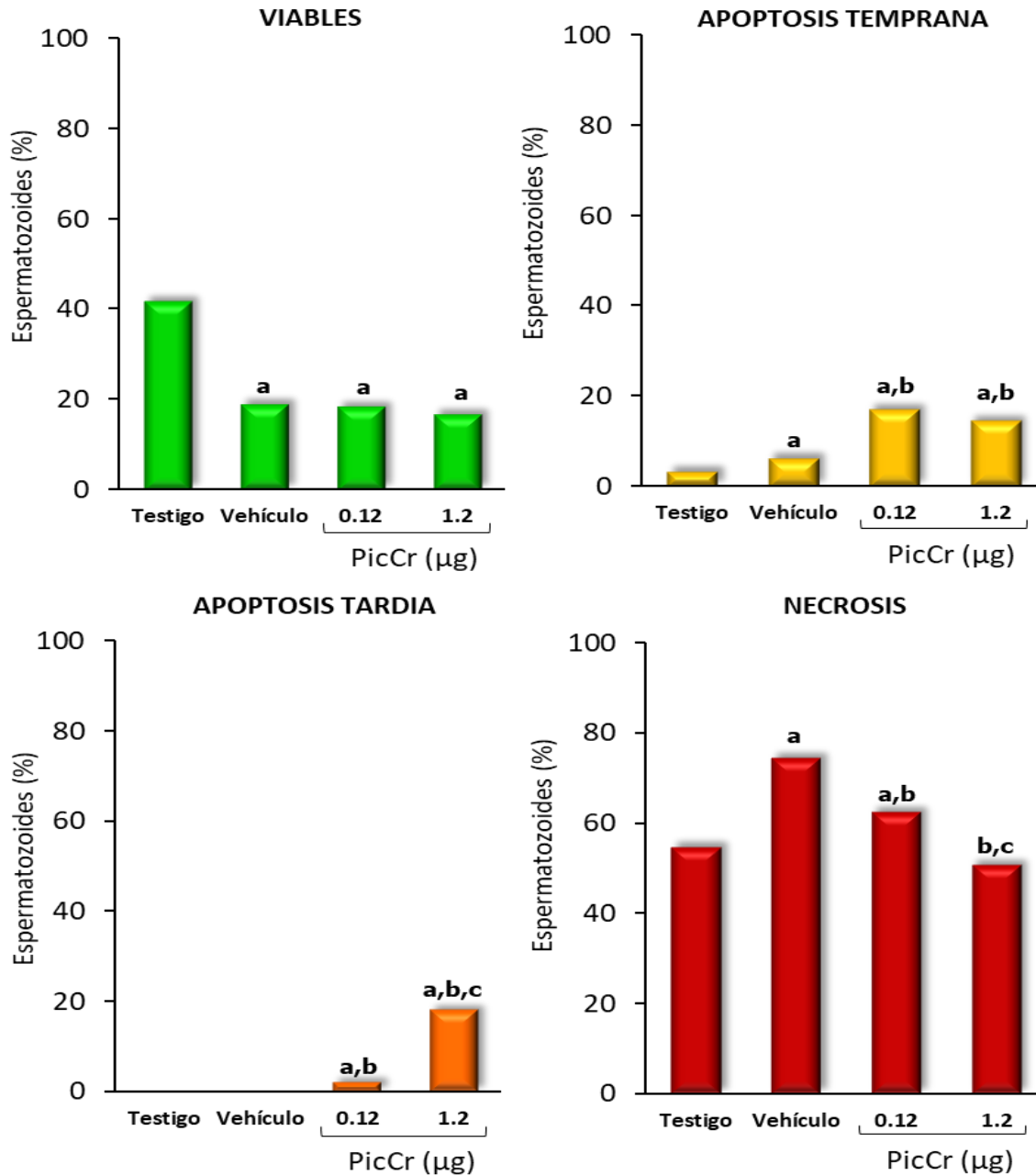


Figura 18. Proporción de espermatozoides viables, apoptóticos y necróticos de ratones sometidos a la ingesta de vehículo o diferentes dosis de PicCr por 140 días y ratones sin tratamiento (testigo). **a**, $p < 0.05$ vs testigo; **b**, $p < 0.05$ vs vehículo; **c**, $p < 0.05$ vs 0.12 µg de PicCr (Prueba χ^2).



El índice apoptótico incrementó tanto en el grupo con vehículo como en los tratados con PicCr, comparado con el grupo testigo, siendo aún mayor en las muestras espermáticas de los animales tratados con el suplemento (**Figura 19**).

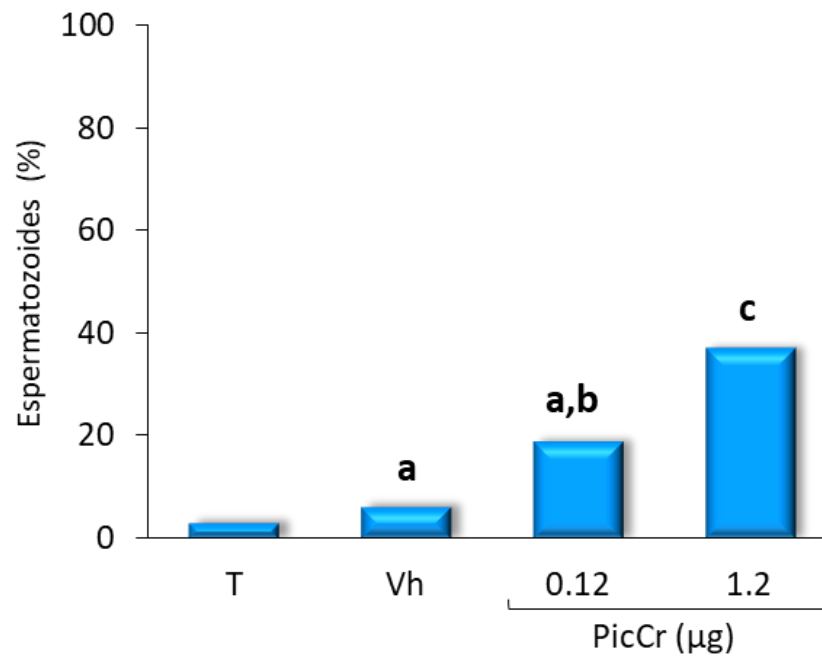


Figura 19. Índice apoptótico en los espermatozoides de ratones sometidos a la ingesta de vehículo o diferentes dosis de PicCr por 140 días y ratones sin tratamiento (testigo). **a**, $p < 0.05$ vs testigo; **b**, $p < 0.05$ vs vehículo; **c**, $p < 0.05$ vs todos (Prueba de χ^2).



DISCUSIÓN

Los resultados muestran que en el ratón la ingesta de PicCr por cuatro ciclos espermáticos, no modifica el peso corporal. La proporción de espermatozoides anormales respecto a los normales es mayor tanto en los animales tratados con vehículo como en los tratados con PicCr, siendo en estos últimos donde se observan modificaciones en la proporción de espermatozoides con anomalías en cabeza y flagelo. La ingesta de PicCr disminuye la viabilidad espermática e incrementa el índice apoptótico.

El PicCr se volvió popular por promocionar la pérdida de peso y el desarrollo muscular. Sin embargo, la información al respecto es controversial, ya que existen estudios que muestran que el PicCr no tiene ningún efecto sobre la composición corporal y otros que aportan evidencias sobre la disminución del peso corporal.

En el metaanálisis realizado por Pittler y colaboradores en el 2003, con el objeto de evaluar la eficacia del PicCr para reducir el peso corporal, se analizaron diez estudios que sumaron una muestra de 489 individuos y se concluyó que el PicCr tiene un efecto positivo y relativamente pequeño en la disminución del peso corporal.

Fried en el 2014 describe en el humano los efectos del PicCr en la composición corporal sometidos a la ingesta por 72 días de una bebida nutricional compuesta de proteínas, carbohidratos y 200 ó 400 μg de PicCr o placebo. Con base en el índice de mejora de la composición corporal, el autor concluye que la suplementación con un mínimo de 200 $\mu\text{g}/\text{día}$ de PicCr puede llevar a una mejora significativa en la composición corporal.

Amato y colaboradores en el 2000 realizaron un estudio con 19 sujetos (9 hombres y 10 mujeres), cuyas edades oscilaban entre 63 y 77 años que fueron tratados con 1,000 $\mu\text{g}/\text{día}$ de PicCr por ocho semanas, al finalizar el tratamiento llegaron a la conclusión de que el consumo de PicCr no cambia la composición corporal de hombres ni mujeres. Campbell y colaboradores en el 2002 muestran en un estudio realizado con 18 hombres (rango de edad de 56-69 años) que la ingesta de 924 μg PicCr/día por 12 semanas no modifica la composición corporal. Los mismos autores en el 2002 realizaron otro estudio con 17 adultos mayores (62 ± 4 años) para evaluar los efectos del consumo de 924 μg de PicCr por 12 semanas aunado a un entrenamiento con resistencia y observaron que el PicCr no tiene ningún efecto en la disminución de grasa o el peso corporal. Caffaratti y Briñon en el 2005 indican que el PicCr no incrementa la masa muscular ni modifica el peso corporal a un grado mayor al que se logra con una dieta saludable y ejercicio físico. Un estudio realizado en adultos con sobrepeso,



donde se evaluaron los efectos de la ingesta diaria de 1,000 μg de PicCr por 24 semanas, combinado con educación nutricional o no, reveló no tener efectos sobre la pérdida de peso (Yazaki y col., 2010).

También se han realizado estudios en modelos como el ratón macho en los cuales la administración de diferentes concentraciones de PicCr (de 2 a 50 μg) por 13 semanas no modificó el peso corporal (Rhodes y col., 2005). Yoshida y colaboradores en el 2010 alimentaron ratas Wistar con una dieta suplementada con 1, 10 ó 100 μg de PicCr por 28 días y no observaron diferencias significativas en el peso corporal. Previamente mostramos que los ratones macho adultos (10 semanas) sometidos a la ingesta de las mismas concentraciones de PicCr que las utilizadas en este estudio, pero por 105 días presentan una tendencia al aumento del peso corporal similar a la del testigo. Estas evidencias coinciden con nuestros resultados y apoyan la interpretación acerca de los nulos efectos del PicCr sobre la disminución del peso corporal.

El crecimiento de los testículos, epidídimos y vesículas seminales es dependiente de testosterona. Alteraciones en la esteroidogénesis se ven reflejadas en la masa de estos órganos (Simanainen y col., 2004). Chavira (2017) muestra aumento en la concentración de testosterona en ratones macho tratados con 1.2 μg de PicCr por 105 días, sin modificaciones en el peso de estos órganos. No existe ningún otro antecedente bibliográfico que muestre posibles efectos del PicCr en los órganos del sistema reproductor de los machos. Por ello no tenemos ninguna posible explicación al aumento en el peso de los epidídimos respecto al grupo testigo y vehículo y la disminución de las vesículas seminales respecto a 1.2 μg de PicCr.

Varios estudios mencionan que las anormalidades morfológicas en el espermatozoide son reflejo del daño ocasionado en el material genético (Muratori y col., 2000; Shen, 2002; Said y col., 2005). Al respecto se ha descrito que las cabezas en forma de abanico y amorfas indican un grado elevado de fragmentación del ADN (Daris y col., 2010). En nuestro estudio el tratamiento con PicCr incrementó la proporción de estas anormalidades, lo cual podría estar vinculado con su potencial como agente clastogénico y genotóxico, (Stearns, 1995; Speetjens y col., 1999; Mozaffari y col., 2012; Şentürk y col., 2017). El hecho que en los animales sin tratamiento estas anormalidades morfológicas no se presenten o su proporción sea muy baja, apoyan esta interpretación.

En los espermatozoides de ratón, el acrosoma se encuentra en el gancho ubicado en el ápice de la cabeza. Se ha descrito que la LPO asociada a las ERO daña la integridad del



acrosoma (Alba y col., 2000), y que el tratamiento con PicCr promueve la LPO (Hepburn y col., 2003a), lo que podría ser una posible explicación para el incremento en la proporción de espermatozoides con cabeza de alfiler que se observa con la dosis mayor de PicCr.

Li y colaboradores (2019) mencionan que las anomalías morfológicas de flagelo como son cortos, enrollados y doblados están asociadas a mutaciones genéticas que se traducen en espermatozoides impedidos para desplazarse y por ende para fecundar, ya que alteran el control de la propagación de la onda flagelar. El potencial mutagénico del PicCr mostrado por Hepburn y colaboradores (2003b) podría ser la causa del aumento en la proporción de espermatozoides con flagelo enroscado en los ratones tratados con la concentración más alta de PicCr.

No obstante que en los animales tratados con PicCr se observa disminución en la proporción de espermatozoides con cabezas sin gancho, sin flagelo y forma de banana, así como espermatozoides con flagelo enroscado y dos flagelos, esto no se refleja en aumento de espermatozoides con morfología normal. Por lo que el aumento en la proporción de espermatozoides morfológicamente anormales tal y como se observa en los animales tratados con PicCr podría relacionarse con riesgo de infertilidad (Yu, 2014).

La membrana plasmática es muy susceptible a la LPO debido a su alto contenido de fosfolípidos, de ahí que el tratamiento con PicCr podrían estar afectando la membrana plasmática del espermatozoide al promover la LPO (Hepburn y col., 2003^a), lo que se refleja en la disminución de la viabilidad.

En modelos *in vitro* se ha mostrado que el PicCr es capaz de inducir apoptosis (Manygoats y col., 2002; Jana y col., 2009). En linfocitos de humano tratados con PicCr se incrementa la producción intracelular de ERO, lo que disminuye el potencial de membrana mitocondrial, altera la relación Bax/Bcl-2 y aumenta la actividad de citocromo c y caspasa-3, eventos que finalmente conducen a la apoptosis. Por otra parte, en estudios *in vivo* se ha descrito que el tratamiento con PicCr incrementa la LPO (Hepburn y col., 2003a; Imamoglu y col., 2008) que es parte de los eventos que culminan en apoptosis. Tomando en consideración lo anterior, podemos sugerir que el PicCr induce la apoptosis en los espermatozoides de animales que son sometidos a la ingesta prolongada de este suplemento, que la vía puede ser la generación de ERO y el incremento de LPO y que sus efectos parecen ser dependientes de la concentración, ya que el índice apoptótico fue el doble con el tratamiento con 0.12 μg de PicCr y seis veces más cuando se administró la concentración más alta respecto a la observada en el grupo con vehículo.



CONCLUSIONES

- En el ratón macho adulto, la ingesta de PicCr por cuatro ciclos espermáticos, no modifica el peso corporal.
- El consumo prolongado de PicCr incrementa el peso de los epidídimos y las vesículas seminales dependiendo de la dosis.
- El consumo de PicCr afecta la morfología espermática, ya que incrementa la proporción de espermatozoides con anomalías en cabeza y flagelo.
- En el ratón macho la ingesta de PicCr por cuatro ciclos espermáticos disminuye la viabilidad espermática e incrementa el índice apoptótico.



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.
- ✿ Aitken RJ, Jones KT y Robertson SA. (2012). Reactive oxygen species and sperm function-in sickness and in health. *Journal of Andrology*, 33, 1096-1106.
- ✿ Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW y van Duin M. (1995). Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *Journal of Cell Science*, 108, 2017-2025.
- ✿ Aitken RJ. (2000). Possible redox regulation of sperm motility activation. *Journal of Andrology*, 21, 491-496.
- ✿ Aktan G, Doğru-Abbasoğlu S, Küçükgergin C, Kadioğlu A, Ozdemirler-Erata G, Koçak-Toker N. (2013). Mystery of idiopathic male infertility: is oxidative stress an actual risk. *Fertility and Sterility*, 99, 1211-1215.
- ✿ Alba Z, Monzón B, Peláez Y y Quintero P. (2000). Papel del estrés oxidativo en la infertilidad masculina. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 19, 202-205.
- ✿ Albert L. (1997). Cromo. Introducción a La Toxicología Ambiental, 20, 345-359.
- ✿ Amato P, Morales A y Yen S. (2000). Effects of chromium picolinate supplementation on insulin sensitivity, serum lipids, and body composition in healthy, nonobese, older men and women. *J Gerontol and Biol Sci Med Sci*, 55, 260–263.
- ✿ Andersson M, Petersson G, Karlsson O, Abramsson L y Hellman E. (2007). Evaluation of the potential genotoxicity of chromium picolinate in mammalian cells *in vivo* and *in vitro*, 45, 1097-1106.
- ✿ Angosto C. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de La Real Academia de Farmacia*, 69, 43-70.
- ✿ Atale N, Gupta S, Yadav U y Rani V. (2014). Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *Journal of Microscopy*, 255, 7-19.
- ✿ Bagchi D, Bagchi M, Balmoori J, Ye X y Stohs S. (1997) Comparative induction of oxidative stress in cultured J774A.1 macrophage cells by chromium picolinate and chromium nicotinate. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol*, 97, 335-346.
- ✿ 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.
- ✿ Barrios D. (2002). Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de



- espermatozoides de la cola del epidídimo de toros Post Mortem. (U. C. Venezuela, Ed.) IX Congreso venezolano de Producción e Industria Animal. Valera, Venezuela, 56, 468-494.
- ✿ Baskic D, Popovic S, Ristic P y Arsenijevic N. (2006). Analysis of apoptosis induced by cycloheximide in human leukocytes: fluorescence microscopy with annexin V/propidium iodide versus acridine orange/ethidium bromide. *Cell biology international*, 30, 924-932.
 - ✿ Baumber J, Sabeur K, Vo A y Ball B. (2003) Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 60, 1239-1247.
 - ✿ Bearden H y Fuquay J. (1982). *Reproducción Animal Aplicada. Manual Moderno*. México. pp. 21-38.
 - ✿ Benavides F y Guénet J. (2003). *Biología y manejo reproductivo del ratón. Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones*. Laboratory Animals Ltd. SECAL. Madrid. España. 59-83.
 - ✿ Burgueño S, Esquivel G, Serrano S y Campos C. (2017). La muerte celular programada: mecanismos morfológicos y moleculares implicados. *La Muerte Celular Programada: Mecanismos Morfológicos y Moleculares Implicados*, 10, 9, 450-456.
 - ✿ Caffaratti M y Briñon M. (2005). Suplementos dietarios: Picolinato de cromo (Revisión) *Centro de Información de Medicamentos (CIME)*, 5, 80-86.
 - ✿ Calabrese J y Baldwin A. (2002). Defining hormesis. *Human and Experimental Toxicology*, 21, 91-97.
 - ✿ Cambiasso M, Galotto C, Sánchez M, Fontana V, Romanato M y Calvo C. (2018). El espermatozoide: algo más que un paquete de lujo para entregar DNA. *IQUIBICEN, CONICET*, 25-31.
 - ✿ Campbell W, Joseph L, Anderson R, Davey S, Hinton J y Evans WJ. (2002). Effects of resistive training and chromium picolinate on body composition and skeletal muscle size in older women. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 12, 125-35.
 - ✿ Cefalu W y Hu F. (2004). Role of chromium in human health and in diabetes. *Diabetes Care*, 27, 2741–2751.
 - ✿ Chabory E, Damon C, Lenoir A, Henry-Berger J, Vernet P, Cadet R y Drevet J. (2010). Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *Journal of Animal Science*, 88, 1321-1331.
 - ✿ Chandra A, Chatterjee A, Ghosh R, Sarkar M y Chaube S. (2007). Chromium induced testicular impairment in relation to adrenocortical activities in adult albino rats. *Reprod. Toxicol*, 24, 388-396.
 - ✿ 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.
- ✿ Chavira S. (2017). Efectos del picolinato de cromo sobre la calidad espermática del ratón adulto. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.
 - ✿ Chenoweth P. (1997). Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. En: Youngquist: Current therapy in large animal theriogenology. 1ª Edición, pag. 217.
 - ✿ COFEPRIS. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. (2019). Suplementos Alimenticios. <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/suplementos-alimenticios-62063>.
 - suplementos-alimenticios-62063.
 - ✿ Cuapio P, Rosas P, Rocha F, Domínguez R y Pellicer A. (2009). Effects of chromium picolinate on seminal parameters of young adult males. *Andrology, Supp*, 1, 30, 118.
 - ✿ Daris B, Goropevnek A y Hojnik N. (2010). Sperm morphological abnormalities as indicators of DNA fragmentation and fertilization in ICSI. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 281, 363–367.
 - ✿ Diamanti E, Bourguignon J, Giudice L, Hauser R, Prins G, Soto A y Gore A. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement. *Endocrine Reviews*, 30, 293–342.
 - ✿ Elgharabawy R y Emará A. (2014). The protective effect of Panax ginseng against chromium picolinate induced testicular changes. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 8, 346-355.
 - ✿ 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 Pouchmik D. (1993). Composition and biological activity of chromium–pyridine carboxylate complexes. *J. Inorg. Biochem*, 49, 177–187.
 - ✿ 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.
 - ✿ Fried R. (2014). Micronutrientes seleccionados y las bases metabólicas para su apoyo a la salud endotelial y la función eréctil. *Disfunción eréctil como deficiencia cardiovascular*, 293–328.
 - ✿ Galluzzi L, Vitale I, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke E, Blagosklonny M, Kroemer G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19, 107–120.
 - ✿ Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A y Remohi J. (2004). Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J*



- Androl, 6, 59-65.
- ✿ Gimeno M. (2014). Morfología espermática y parámetros seminales básicos en varones normo y oligoastenoteratozoospermicos. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia. Tesis
 - ✿ Gómez A y Magaña P. (2003). Papel del cromo y del cinc en el metabolismo de la insulina. *Revista Médica IMSS*, 42, 347-352.
 - ✿ Gómez E, Larrea F y Martínez F. (2012). Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *Tópicos de Investigación y Posgrado. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 15, 24-36.
 - ✿ Grijalva H y Cabrera R. 2001. Contenido de cromo en alimentos y estimación de su ingestión dietaria en el noroeste de México. *Arch. Latin. Nutr*, 51, 105–110.
 - ✿ Griswold D. (1995). Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biology of Reproduction*, 52, 211-216.
 - ✿ Guzmán L, López R, Llerena G, Pino J y Retuerto F. (2005). Recuperación del epitelio germinal masculino de ratones tratados con dosis única de Busulfán. *Revista Peruana de Biología*, 12, 141–144.
 - ✿ Hafez B y Hafez E. (2002) Reproducción e inseminación artificial en animales. McGraw-Hill. México. 127 - 139.
 - ✿ Hafez E. (1996). Reproducción e inseminación artificial en animales. 5° Ed. McGraw-Hill. México. 519 - 520.
 - ✿ Havel J. (2004). A scientific review: The role of chromium in insulin resistance. *Nutrition*, 21, 2-14.
 - ✿ Hepburn D y Vincent J. (2002). 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 y Vincent J. (2003). Tissue and subcellular distribution of chromium picolinate with time after entering the blood stream. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 94, 86-93.
 - ✿ Hepburn D, Burney M, Wosky S, 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, O'Donnell J. (2003b). Nutritional supplement chromium picolinate causes sterility and lethal mutations in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of National Academy of Science*, 100, 3766-3771.
 - ✿ Holstein A, Maekawa M, Nagano T y Davidoff M. (1996). Myofibroblasts in the lamina propria of human semi-iferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. *Archives of Histology and Cytology*, 59, 109–125.



- ✿ Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, Takenaka A y Fujisawa M. (2007). Expresión de la leptina y el receptor de leptina en los testículos de pacientes fértiles e infértiles. *Andrologia*, 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.
- ✿ Jeongwu L, John H, Sarah C y Kim B. (1997). El sistema Fas es un regulador clave de la apoptosis de células germinales en el testículo. *Endocrinología*, 138, 2081-2088.
- ✿ 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.
- ✿ Kerr J, Wyllie A y Currie A. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239–257.
- ✿ Kim S, Woo J, Lee H, Kang D y Cha K. (2003). Determination of chromium (III) picolinate using high performance liquid chromatography ultraviolet spectrophotometry. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 24, 1517-1520.
- ✿ 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.
- ✿ Kothari S, Thompson A, Agarwal A y Du Plessis S. (2010). Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian journal of experimental biology*, 48, 425-435.
- ✿ Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke E y Melino G. (2009). Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16, 3–11.
- ✿ Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H y Gagnon C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.*, 2, 48-54.
- ✿ Lamson D y Plaza S. (2002). The safety and efficacy of high-dose chromium. *Alternative Medicine Review*, 7, 218-235.
- ✿ Leclerc P, De Lamirande E, y Gagnon C. (1997). Regulación de la fosforilación de la proteína-tirosina y la capacitación del esperma humano mediante derivados reactivos de oxígeno. *Biología y medicina de radicales libres*, 22, 643–656.
- ✿ Levina A y Lay P. (2008). Chemical properties and toxicity of chromium (III) nutritional



- supplements. *Chemical Research in Toxicology*, 21, 563–571.
- ✿ Lewis B y John A. (2005). Impact of Epididymal Maturation on the Tyrosine Phosphorylation Patterns Exhibited by Rat Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 64, 1545–1556.
 - ✿ Li W, He X, Yang S, Liu C, Wu H, Liu W, Lv M, Tang D, Tan J, Tang S, Chen Y, Wang J, Zhang Z, Wang H, Jin L, Zhang F y Cao Y. Biallelic mutations of CFAP251 cause sperm flagellar defects and human male infertility. *Journal of Human Genetics*, 64, 49–54.
 - ✿ López B, Konigsberg M, Ávalos A, Rodríguez A, Rodríguez E, Retana F y Arenas E. (2016). Apoptosis en espermatozoides. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3, 23–27.
 - ✿ Málaga Y, Ortiz D, Hernández I, Tovar J y Ayala A. (2005). Detención de la espermatogénesis. *Ginecología y Obstetricia de México*, 73, 500–508.
 - ✿ Manygoats KR, Yazzie M y Stearns DM. (2002). Ultrastructural damage in chromium picolinate-treated cells: a TEM study. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 7, 791–798.
 - ✿ 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.
 - ✿ Martínez N, Altagracia-Martínez, Kravzov-Jinich J, Hinojosa-Cruz J, Sánchez-Sánchez B y Díaz de León-Castañeda C. (2012). Estudio de la carga económica de la infertilidad femenina por anovulación en un hospital público de México: estudio piloto. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43, 66–72.
 - ✿ McDonald L. (1991). *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. 4ª Ed. Interamericana, México, 69–80.
 - ✿ McGahon A, Martin S, Bissonnette R, Mahboubi A, Shi Y, Mogil R, Nishioka W y Green D. (1995). The end of the (cell) line: Methods for the study of apoptosis in vitro. En: *Methods in cell biology Vol: 46 Cell death*. Schwartz LM y Osborne BA (Eds). USA. Academic Press Inc, 153–185.
 - ✿ Meresman G. (2011). Relevancia de la apoptosis en la reproducción femenina. *Investigación Clínica*, 52, 274–290.
 - ✿ Şentürk M, Uyanik F y Hamurcu Z. (2017). Effects of chromium picolinate on the parameters of oxidative and chromosomal DNA damage in rabbits. *Turkish Journal of Biochemistry*, 43, 110–118.
 - ✿ Molina M. (2009). Desarrollo puberal normal: Pubertad precoz. *Pediatría Atención Primaria*, 11, 127–142.
 - ✿ Mozaffari M, Baban B, Abdelsayed R, Liu J, Wim-borne H y Rodriguez N. (2012). Renal and glycemic effects of high-dose chromium picolinate in db/db mice: assessment of DNA damage. *J Nutrit Biochem*, 23, 977–985.



- ✿ Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, Gambera L, Baccetti B, Biagiotti R, Forti G y Maggi M. (2000). Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J. Androl.*, 21, 903–912.
- ✿ Murphy W. (2001). Resolution of the early placental mammal radiation using bayesian phylogenetics. *Science*, 294, 2348-2351.
- ✿ Mylonas C y Kouretas D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*, 13, 295-309.
- ✿ 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.
- ✿ Olmedo S, Chillik C y Kopelman S. (2003). Definición y causas de la infertilidad. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 54, 227-247.
- ✿ 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 D, Leighton F, Aspee A, Aliaga C y Lissi E. (2000). A comparison of methods employed to evaluate antioxidant capabilities. *Biol Res*, 33, 71-77.
- ✿ Pérez M y Lie C. (2012). Apoptosis, mecanismo de acción. *Medimay*, 18, 138-153.
- ✿ Pittler M, Stevinson C y Ernst E. (2003). Chromium picolinate for reducing body weight: Metaanalysis of randomized trials. *International Journal of Obesity*, 27, 522–529.
- ✿ Quintero V, Bermúdez-Cruz R y Castillo-Cadena J. (2015). Infertilidad masculina y fragmentación del ADN espermático: Un problema actual. *Tópicos de Investigación y Posgrado. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 18, 144-151.
- ✿ Rhodes M, Hébert C, Herbert R, Morinello E, Roycroft J, Travlos G y Abdo K. (2005). Absence of toxic effects in F344/N rats and B6C3F 1 mice following subchronic administration of chromium picolinate monohydrate. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 21–29.
- ✿ Rosas R. (2007). Infertilidad masculina. Causas, diagnóstico y tratamiento. *Ámbito farmacéutico. Divulgación sanitaria*, 26, 70-75.
- ✿ Ross M y Pawlina W. (2015). *Histología: Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular*. 6ª ed. Panamericana. México. 604-650.
- ✿ Ryan G, Wanko N, Redman A y Cook C. (2003). Chromium as adjunctive treatment for type 2 diabetes. *Annals of Pharmacotherapy*, 37, 876-885.
- ✿ Said T, Grunewald S, Paasch U, Glander H, Baumann T y Kriegel C. (2005). Advantage



- of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed*, 10, 740-746.
- ✿ 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.
 - ✿ Sánchez S. (2019). El boom de las vitaminas y los suplementos alimenticios 'zero'. (online) *Expansión*. Available at: <https://expansion.mx/empresas/2018/01/29/el-boom-de-las-vitaminas-y-los-suplementos-alimenticios-zero>.
 - ✿ Sans M. (2004). Estudio biológico de *Mus domesticus ruttii*, 1772 en una zona de polimorfismo robertsoniano. Facultad de Medicina. Departamento de Biología Animal. Barcelona, España. 110.
 - ✿ Schteingart H. (2005). Efecto de las especies reactivas de oxígeno en la infertilidad masculina. Aplicación potencial de los antioxidantes en tratamientos in vivo e in vitro. *Rev. argent. Androl*, 14, 90-99.
 - ✿ Shen H. (2002). Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Human Reproduction*, 17, 1266–1273.
 - ✿ Simanainen U, Haavisto T, Tuomisto J, Paranko J, Toppari J, Tuomisto J y Viluksela M. (2004). Pattern of Male Reproductive System Effects After in Utero and Lactational 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) Exposure in Three Differentially TCDD-Sensitive Rat Lines. *Toxicological Sciences*, 80, 101–108.
 - ✿ Sobarzo C y Bustos O. (2000). Sperm quality in mice acutely treated with parathion. *Asian J. Androl*, 2(2), 147-50, 2000.
 - ✿ Speetjens J, Collins R, Vincent J y Woski S. (1999). The nutritional supplement chromium(III) tris(piccolinate) cleaves DNA. *Chemical Research in Toxicology*, 12, 483-487.
 - ✿ Stearns D, Wise J, Patierno S y Wetterhahn K. (1995). Chromium(III) picolinate produces chromosome damage in Chinese hamster ovary cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 9, 1643–1648.
 - ✿ Stohs S, Bagchi D, Hassoun E y Bagchi M. (2001). Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol*, 20, 77-88.
 - ✿ Tomioka H, Shimizu T, Tatano Y. (2007). Effects of picolinic acid on the antimicrobial functions of host macrophages against *Mycobacterium avium* complex. *Int J Antimicrobial Agents*, 29, 460-468.
 - ✿ Travacio M, María P y Llesuy S. (2001). La errata de “Cromo (VI) induce estrés oxidativo en el cerebro del ratón”. *Toxicología*, 162, 139–148.
 - ✿ Tresguerres J. (2010). Fisiología del testículo. En: *Fisiología Humana*. 4ª. Edición. 1059-1072.



- ✿ Treuting P y Dintzis S. (2012). *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*. Elsevier Science. 30-90.
- ✿ Urroz C. (2000). *Elementos de Anatomía y Fisiología Animal*. Ed. EUNED. Costa Rica. 191- 195.
- ✿ Vásquez M. y Ulate M. (2010). *Body Weight and Appetite Regulation*. *Acta Médica Costarricense*, 52, 79–89.
- ✿ Vidal C. (2001). *Esterilidad e infertilidad humanas. Abordaje y tratamiento*. Ciencia y vida. Instituto Valenciano de Infertilidad. Unidad de Reproducción. Valencia, España.
- ✿ Vincent J. (2000). *The biochemistry of chromium*. *J. Nutrition*, 130, 715-718.
- ✿ Vite V, Ortiz N, Hernández M, Tovar R y Ayala A. (2005). *Análisis epidemiológico de la infertilidad en una población mexicana*. *Ginecología y Obstetricia de México*, 73, 360–364.
- ✿ Yazaki Y, Faridi Z, Ma Y, Ali A, Northrup V, Njike V y Katz D. (2010). *A pilot study of chromium picolinate for weight loss*. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 16, 291–299.
- ✿ Yoshida M, Hatakeyama E, Hosomi R, Kanda S, Nishiyama T y Fukunaga K. (2010). *Tissue accumulation and urinary excretion of chromium in rats fed diets containing graded levels of chromium chloride or chromium picolinate*. *The Journal of Toxicological Sciences*, 35, 485–491.
- ✿ Yu B, Qi Y, Liu D, Gao X, Chen H y Bai C. (2014). *Cigarette smoking is associated with abnormal histone-to-protamine transition in human sperm*. *Fertility and Sterility*, 101, 51-57.