



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**CUANTIFICACIÓN DE ZINC Y CALCIO EN SUERO Y SEMEN DE
HUMANOS SANOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN
ATÓMICA: EFECTO DEL PICOLINATO DE CROMO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

ANA MARÍA ENCISO MONDRAGÓN

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. A. LOURDES CASTILLO GRANADA

JURADO:

**Q.F.B. FELIPE PÉREZ VEGA
M en C.A. LOURDES CASTILLO GRANADA
MTRA. MA. ISABEL GARDUÑO POZADAS
Q.F.B. ALICIA CABRERA AGUILAR
Q.F.B. TERESA BENÍTEZ ESCAMILLA**

**PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO
SUPLENTE
SUPLENTE**



MÉXICO, D.F.

MAYO DE 2010



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

Tesis presentada por: Ana María Enciso Mondragón

Director de tesis: M. en C. A. Lourdes Castillo Granada

Lugar de desarrollo:

**Laboratorio de Espectroscopia L-328 y el Laboratorio L-314 de la
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Campo II. UNAM.**

**Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza
UMIEZ.**

**Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo del Instituto
Valenciano de Infertilidad en la toma de muestras biológicas, como parte
del convenio**

UNAM-IVI 21453-230-25-II-08

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por estar conmigo en cada paso que doy

A mis padres Tomas y Blanca

Les agradezco por todo el apoyo, por quererme y darme la oportunidad de ser parte de su vida, por el gran esfuerzo que han hecho para proporcionarme lo necesario y estar conmigo en los momentos importantes, por permanecer juntos y darme una familia, por procurar siempre mi bienestar, en fin por ser los ángeles que me cuidan cada día.

Son lo más importante de mi vida, gracias por ser mis padres se que no pude tener mejores porque para mí ustedes lo son, lo único que espero es que se estén orgullosos de mi como yo lo estoy de ustedes y de ser su hija, los admiró y quiero mucho. Sé que nunca podre pagar todo lo que me han dado solo espero poder recompensar aunque sea una pequeña parte. Les dedico esta tesis porque gracias a ustedes logre una profesión.

A mis hermanos Angel, Alfredo y Gustavo

A pesar de los interminables desacuerdos agradezco que sean parte de mi vida, gracias por el apoyo, por no facilitarme la vida y preocuparse por mí aun cuando no soy su hermana favorita.

A mi familia

A Dulce y a esos niños lindos que quiero mucho Paz y Gabriel que con una sonrisa, un abrazo ó alguna inocente ocurrencia me hacen sonreír y recordar que se puede ser feliz con el más mínimo detalle, gracias por apoyarme.

A Fernando Quinto

Te agradezco el que me permitieras conocerte, poco a poco lograste convertirte en una de las pocas personas importantes de mi vida, además la mejoraste en muchos aspectos. Gracias no solo por ser mi compañero sino también mi amigo, por escucharme cuando lo necesito, por las frases de apoyo que me motivan a seguir con mis planes, por estar conmigo en los momentos difíciles y tratar de hacerme sentir mejor.

Gracias por demostrarme que siempre estás conmigo, que te preocupas por mi y por cuidarme tanto.

A la Maestra Lourdes Castillo

Le quiero agradecer el apoyo brindado porque sin él no hubiera sido posible la realización de este trabajo, por tomarse el tiempo para explicarme algo, regañarme cuando era necesario y por motivarme a terminar la tesis, por la confianza y el preocuparse no solo de mi desarrollo profesional sino también del aspecto personal y emocional. Agradezco el haberla conocido es una persona admirable, merece todo mi respeto y cariño, gracias y espero que me dé la oportunidad de seguir conociéndola.

A mis sinodales

Gracias no sólo por tomarse el tiempo de revisar mi trabajo, sino también por haber sido mis maestros durante la carrera y por transmitirme parte de su conocimiento.

“No es suficiente saber, hay que saber aplicar lo que uno sabe; no es suficiente querer, hay que saber realizar lo que uno quiere.”

Johann Wolfgang von Goethe

ÍNDICE

CONTENIDO	Página
I. INTRODUCCIÓN	11
II. MARCO TEÓRICO	13
1. ZINC	13
1.1. Absorción	13
1.2. Distribución	14
1.3. Deficiencia	14
1.4. Zinc y reproducción	15
1.5. Zinc y Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)	16
2. CALCIO	17
2.1. Absorción	18
2.2. Distribución	18
2.3. Deficiencia	19
2.4. Calcio y reproducción	19
2.5. Composición química del plasma seminal	21
2.6. Función del zinc en plasma seminal	21
2.7. Función del calcio en plasma seminal	22
2.8. Composición química del suero	23
2.9. Función del zinc en suero	23
2.10. Función del calcio en suero	23
3. CROMO	24
3.1. Absorción	24
3.2. Distribución	25
3.3. Deficiencia	25
3.4. Cromo y reproducción	25
3.5. Picolinato de cromo	25
3.6. Cromo y Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)	26
3.7. Cromo y su efecto en la concentración de zinc	27
4. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA	28
4.1. Descripción de la técnica de EAA	29
4.2. Lámpara de cátodo hueco	30
4.3. Quemador	32
4.4. Atomización	32
4.4.1. Atomizador de llama	32
4.5. Monocromador	33
4.6. Detector	33

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
IV. OBJETIVOS	36
1. Objetivo General	36
2. Objetivos Particulares	36
V. HIPÓTESIS	37
VI. MATERIAL Y MÉTODO	38
1. MATERIAL BIOLÓGICO	38
2. MATERIAL DE LABORATORIO	38
3. EQUIPO E INSTRUMENTOS	38
4. REACTIVOS	38
5. SOLUCIONES	38
6. MÉTODO	39
6.1. Selección de los individuos	39
6.2. Toma de muestras de semen	40
6.3. Procesamiento de muestra	40
6.4. Análisis estadístico	41
VII. RESULTADOS	42
1. Contenido de zinc en suero ($\mu\text{g/mL}$)	43
2. Contenido de zinc en plasma seminal ($\mu\text{g/mL}$)	48
3. Contenido de calcio en suero ($\mu\text{g/mL}$)	53
4. Contenido de calcio en plasma seminal ($\mu\text{g/mL}$)	58
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	63
IX. CONCLUSIONES	67
X. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES	68
XI. ANEXOS	69
1. Cálculos realizados para los parámetros de validación (Linealidad y precisión)	69
2. Formulas empleadas para la validación	74
XII. REFERENCIAS	76

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Diagrama que representa los componentes principales de un Espectrofotómetro de Absorción Atómica.	29
Figura 2. Estructura de una lámpara de cátodo hueco para EAA.	30
Figura 3. Eventos que ocurren en una lámpara de cátodo hueco.	31
Figura 4. Niveles de concentración promedio de zinc en suero en los tres periodos del tratamiento con L-carnitina (placebo) para el grupo testigo y los niveles de concentración para el grupo suplementado con picolinato de cromo.	44
Figura 5. Comparación de los valores testigo con la concentración poblacional de zinc en suero en cada fecha de estudio para ambos grupos.	46
Figura 6. Diagrama de barras de las medias poblacionales de zinc en suero en los periodos de estudio (antes, durante y después del tratamiento), donde se observan las columnas que presentan diferencia significativa.	47
Figura 7. Niveles de concentración promedio de zinc en plasma seminal en los tres periodos del tratamiento con L-carnitina (placebo) para el grupo testigo y los niveles de concentración para el grupo suplementado con picolinato de cromo.	49
Figura 8. Comparación de los valores testigo con la concentración media de zinc en plasma seminal en cada fecha de estudio para ambos grupos.	51
Figura 9. Diagrama de barras de las medias poblacionales de zinc en plasma seminal en los periodos de estudio (antes, durante y después del tratamiento), donde se observan las columnas que presentan diferencia significativa.	52

Figura 10. Niveles de concentración promedio de calcio en suero en los tres periodos del tratamiento con L-carnitina (placebo) para el grupo testigo y los niveles de concentración para el grupo suplementado con picolinato de cromo.	54
Figura 11. Comparación de los valores testigo con la concentración media poblacional de calcio en suero en cada fecha de estudio para ambos grupos.	56
Figura 12. Diagrama de barras de las medias poblacionales de calcio en suero en los periodos de estudio (antes, durante y después del tratamiento), donde se observan las columnas que presentan diferencia significativa.	57
Figura 13. Niveles de concentración promedio de calcio en plasma seminal en los tres periodos del tratamiento con L-carnitina (placebo) para el grupo testigo y los niveles de concentración para el grupo suplementado con picolinato de cromo.	59
Figura 14. Comparación de los valores testigo con la concentración media poblacional de calcio en plasma seminal para ambos grupos de estudio.	61
Figura 15. Diagrama de barras de las medias poblacionales de calcio en plasma seminal de los periodos de estudio (antes, durante y después del tratamiento), donde se observan las columnas que presentan diferencia significativa.	62

ÍNDICE DE TABLAS	Página
Tabla 1. Valores de concentración de zinc en semen.	21
Tabla 2. Valores de concentración de calcio en semen.	22
Tabla 3. Distribución de la ingesta de picolinato de cromo Cr(Pic)₃ y L-carnitina, en el grupo 1 y grupo 2.	39
Tabla 4. Valores de concentración de zinc en suero de hombres sanos de 21 a 27 años de un grupo que ingirió L-carnitina (placebo) y otro grupo suplementado con picolinato de cromo.	43
Tabla 5. Valores de concentración poblacional de zinc en suero para ambos grupos, los suplementados con L-carnitina (placebo) y los de picolinato de cromo.	45
Tabla 6. Valores de concentración de zinc en plasma seminal de hombres sanos de 21 a 27 años de un grupo que ingirió L-carnitina (placebo) y otro grupo suplementado con picolinato de cromo.	48
Tabla 7. Valores de concentración poblacional de zinc en plasma seminal para ambos grupos, los suplementados con L-carnitina (placebo) y los de picolinato de cromo.	50
Tabla 8. Valores de concentración de calcio en suero de hombres sanos de 21 a 27 años de un grupo que ingirió L-carnitina (placebo) y otro grupo suplementado con picolinato de cromo.	53
Tabla 9. Valores de concentración poblacional de calcio en suero para ambos grupos, los suplementados con L-carnitina (placebo) y los de picolinato de cromo.	55

Tabla 10. Valores de concentración de calcio en plasma seminal de hombres sanos de 21 a 27 años de un grupo que ingirió L-carnitina (placebo) y otro grupo suplementado con picolinato de cromo.	58
Tabla 11. Valores de concentración poblacional de calcio en plasma seminal para ambos grupos, los suplementados con L-carnitina (placebo) y los de picolinato de cromo.	60

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha dado gran importancia a los efectos de los contaminantes en los ecosistemas y su relación con la salud del hombre. El tema de la contaminación se ha convertido en un problema vital para la humanidad debido a la gravedad de sus efectos.

De mayor importancia es comprender los mecanismos reguladores y de defensa del organismo y su interacción con estos agentes tóxicos, tal es el caso del zinc el cual se caracteriza por ser uno de los elementos esenciales más abundantes en el organismo humano, en la fertilidad humana juega un papel importante pues contribuye a la estabilidad del acoplamiento de la cabeza a la cola de los espermatozoides y su desacoplamiento después de su liberación intracelular (1).

Además el zinc es un potente depurador del exceso de aniones superóxido, por lo tanto está implicado en la depuración y regulación de radicales libres en el organismo, ya sean los producidos cotidianamente así como los provocados por agentes tóxicos (2).

Con base en diversos estudios se ha correlacionado significativamente la concentración de zinc en fluido seminal con la densidad, motilidad y viabilidad del espermatozoide, los cuales son parámetros críticos en la calidad espermática. En un artículo publicado por *Chia Sin-Eng* menciona que *Saaranen* encontró que si se aumenta la concentración de zinc se incrementa la densidad, observación fue apoyada por *Stankovic* y *Mikac-Devic* los cuales describen el incremento de la motilidad espermática con el incremento en la concentración de zinc en el plasma seminal (2).

Sin embargo, se han obtenido resultados contradictorios sobre la relación entre el zinc presente en el fluido seminal con respecto a, la motilidad de los espermatozoides y su capacidad fecundante. En el estudio realizado por *Henkel R.*, sólo se encontró una correlación positiva débil entre el porcentaje de espermatozoides con movimiento circular o movimiento no lineal y la concentración de zinc. Mientras que en otro estudio se describe la correlación

negativa entre el zinc del plasma seminal y la motilidad de los espermatozoides, ya que altas concentraciones de zinc en el semen, tienen un efecto supresivo en la motilidad progresiva del espermatozoide (3, 4).

De igual modo el calcio ocupa el quinto lugar en la composición corporal se distribuye por igual entre los dientes y los tejidos blandos. El calcio juega un papel fundamental para la capacitación espermática y en el proceso de fecundación del óvulo. El estudio realizado por *Marín-Briggiler y col.*, mostró que cuando el esperma humano se incubó en un medio sin Ca^{2+} , se produjo una disminución significativa en la motilidad progresiva, en contraste los porcentajes máximos de motilidad y viabilidad se obtenidos en células incubadas en presencia de Ca^{2+} como CaCl_2 a una concentración de 0,22mM o mayores (5).

Dada la problemática social en la que cada vez se está más expuesto ya sea por la exposición a actividades profesionales, industriales, ambientales, terapéuticas y estéticas, deben considerarse los efectos que tienen los agentes tóxicos en el organismo. Una de las implicaciones de mayor interés para la sociedad científica es el impacto de estos contaminantes ambientales en la fertilidad humana, tal es el caso de compuestos hechos a base de cromo, como suplementos alimenticios, los cuales son recomendados para la disminución de peso, y regulación de la actividad de la insulina, los cuales mediante reacciones redox provocan la formación de especies reactivas de oxígeno afectando la calidad espermática, provocado por la alteración de varios componentes presentes en el plasma seminal como es el caso del zinc y calcio.

Debido a que el zinc y calcio son elementos importantes tanto para la estructura del espermatozoide y su intervención en diversos procesos de la reproducción humana, en el presente trabajo se cuantificó el nivel de zinc y calcio en suero y plasma seminal en un grupo de hombres jóvenes sanos a los que se les suministro picolinato de cromo como suplemento alimenticio, con la finalidad de determinar el efecto del cromo sobre los niveles de concentración en suero y plasma seminal de ambos metales, así como su relación con parámetros seminales.

II. MARCO TEÓRICO

1. ZINC

Es un elemento brillante, un metal blanco-azulado a gris, virtualmente insoluble en agua. Tiene un punto de fusión de 419.5°C y un punto de ebullición de 908°C. Actualmente la mayor parte del zinc producido se emplea en la galvanización del hierro y acero, así como en la manufacturación del latón. Los objetos galvanizados (alambres, clavos, láminas, etc.) se emplean en la industria del automóvil, la construcción, equipamientos de oficinas y utensilios de cocina, etc. También se utilizan grandes cantidades de zinc en la obtención de aleaciones, y en polvo se utiliza como agente reductor (6).

El Zinc (Zn) se caracteriza por ser un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza, pero no es abundante, ya que representa sólo el 0,012% de la corteza terrestre, en el cuerpo humano se encuentra principalmente en estado de oxidación 2+, la cantidad en el individuo adulto oscila entre 1 y 2,5 g, siendo el segundo oligoelemento en relación a la cantidad total en el organismo, superado tan sólo por el hierro (7).

1.1. Absorción

El zinc se absorbe principalmente en el intestino delgado, con una tasa de transporte mayor en el yeyuno. Sin embargo, administrado en forma oral pasa primero por el duodeno permitiendo una mayor absorción absoluta en este segmento, a pesar de la mayor tasa de transporte en el yeyuno. El zinc parece ser absorbido por difusión pasiva a través de un proceso mediado por acarreadores saturables (6).

1.2. Distribución

El zinc es un nutriente esencial, cofactor para 300 enzimas, se encuentra en todos los tejidos. En humanos, las concentraciones más elevadas están en el hígado, páncreas, riñones, y huesos, existiendo también concentraciones importantes en el ojo, próstata, espermatozoides, piel, pelo y uñas. En sangre, el zinc se encuentra en el plasma, eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Aproximadamente 98% del zinc en suero está enlazado a proteínas, 85% enlazado a albumina, 12% a alfa-macroglobulina, y el remanente a aminoácidos. Interviene en procesos bioquímicos necesarios para el desarrollo de la vida. Entre estos cabe destacar:

- Respiración celular.
- Utilización de oxígeno por parte de la célula,
- Replicación de ADN y ARN,
- Mantenimiento de la integridad de la membrana celular y
- Eliminación de radicales libres (6, 7).

1.3. Deficiencia

Los síntomas asociados con una deficiencia moderada de zinc incluye retardo en el crecimiento, hipogonadismo masculino, cambio en la piel, apetito pobre, letargo mental, adaptación oscura anormal, cambios neurosensoriales, funciones neurofisiológicas dañadas, oligospermia, decremento de la testosterona en suero, hiperamonemia y daño en la función inmune (1, 6, 8).

En rata macho induce atrofia de los túbulos seminíferos, decremento en la secreción de la testosterona y error en la espermatogénesis particularmente en las últimas etapas cuando el contenido de zinc se incrementa en la maduración del esperma (9).

1.4. Zinc y reproducción

El zinc es importante en varios de los aspectos de la reproducción masculina. Las concentraciones más elevadas están en los órganos genitales en comparación con otros tejidos y fluidos corporales, en particular en la glándula prostática, que es responsable en gran medida del alto contenido de zinc en el plasma seminal. En el espermatozoide el zinc se localiza predominantemente en las Fibras Densas Externas (**FDE**) (3, 4, 10).

El zinc testicular es importante para la espermatogénesis y está involucrado en una serie de funciones de importancia para la fisiología espermática. En diferentes especies de animales, el contenido de este elemento en el tejido testicular varía en un rango que va de 20 a 200 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, estos valores son similares en hígado, páncreas, riñón y huesos. En contraste, el contenido en glándula prostática, líquido seminal y espermatozoides eyaculados es mucho mayor varía de 800 a 3000 $\mu\text{g/g}$ de tejido seco. Se observa un aumento en el contenido de zinc del espermatozoide después de la exposición al líquido seminal, lo que sugiere que los espermatozoides acumulan el metal cuando se desplazan desde los testículos a la uretra (1).

El zinc también es responsable de la actividad antibacterial y al parecer busca especies reactivas de oxígeno dentro del plasma seminal. En los testículos, el zinc mantiene funciones testiculares y es incorporado en las células espermáticas, además se ha demostrado que tiene actividad antioxidante, es un estabilizante-membranal y mantiene la viabilidad del esperma por inhibición de la ADNasa (2, 4, 8, 11).

En 2007 *Ebisch y col.*, describen que la concentración de zinc en el plasma seminal, fue inferior en los hombres con subfertilidad idiopática en comparación con controles fértiles. Se ha demostrado que en hombres con recuento menor a 20 millones de células por mililitro muestran una concentración de zinc en plasma seminal ligeramente inferior en comparación con los hombres con recuento espermático normal de 50 a 150 millones de espermatozoides por mililitro (10, 12).

1.5. Zinc y especies reactivas de oxígeno (ERO)

Las especies reactivas de oxígeno son agentes oxidantes altamente reactivos y forman parte de una clase de moléculas conocidas como radicales libres (RL). Un RL es cualquier molécula que contiene uno o más electrones desapareados, tienen una vida media en el rango de nanosegundos a milisegundos, son generados fisiológicamente por la transferencia de un electrón durante el metabolismo celular por ejemplo: en los procesos que generan energía en la mitocondria, donde estas reacciones solamente toman lugar en compartimientos especiales, o en el proceso oxidativo de los leucocitos polimorfo nucleares durante el mecanismo de defensa fisiológica (13, 14, 15).

Bajo ciertas condiciones, el oxígeno inerte puede inicialmente reaccionar con moléculas orgánicas a través de procesos bioquímicos originando a la formación de especies reactivas de oxígeno, entre ellos los radicales libres, los cuales son especies altamente reactivas, entre las que se encuentran: el superóxido ($\bullet\text{O}$) radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y el óxido nítrico. Se producen durante el metabolismo celular normal y en algunas ocasiones, como respuesta a la exposición a radiaciones ionizantes, rayos ultravioleta, contaminación ambiental, humo del cigarrillo, hipoxia, exceso de ejercicio, reacción inflamatoria, e isquemia (16, 17).

Las especies reactivas de oxígeno, reaccionan muy rápidamente con la mayoría de los compuestos orgánicos y comienzan una serie de reacciones en cadena que modifican la estructura de algunas moléculas biológicas, particularmente de aquellas que poseen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (16, 17).

Cada radical libre formado en el organismo puede iniciar una serie de reacciones en cadena que continúan hasta que estos radicales son eliminados. Existen otras moléculas que no son radicales libres como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) pero que actúan fisiológicamente como tal, tienen una vida media más larga, pasan a través de la membrana y no están cargadas eléctricamente, el sistema antioxidante protege a los tejidos de los efectos de los RL (14, 17, 18).

El zinc es un potente depurador del exceso de aniones superóxido producidos por los espermatozoides defectuosos y/o leucocitos en el semen humano después de la eyaculación. El espermatozoide produce especies reactivas de oxígeno principalmente cuando ocurre un defecto durante la espermatogénesis. Existe una correlación positiva fuerte entre los espermatozoides inmaduros y la producción de ERO, la cual en un giro afecta negativamente a la calidad del esperma (2, 19).

Las especies reactivas de oxígeno tienen un papel significativo en muchos de los procesos fisiológicos del esperma tal como, capacitación, hiperactivación, y fusión del espermatozoide-óvulo. Sin embargo, estos provocan diversos procesos patológicos en el sistema reproductor masculino, que se han asociado a la infertilidad masculina. Los espermatozoides son sensibles a ERO porque carecen de defensas citoplasmáticas, además por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (19, 20).

Por lo tanto se sugiere que el semen, debido a su alto contenido de zinc, ejerce una protección, con la suficiente actividad antioxidante para contrarrestar las especies reactivas de oxígeno, como peróxido de hidrógeno, anión superóxido, y radical hidroxilo (2, 21, 22).

El cambio en el estado del zinc puede influir en el balance entre la producción de ERO y defensa antioxidante. Se ha demostrado que una dieta deficiente de zinc puede resultar en altos niveles de daño oxidativo en los lípidos testiculares, proteínas y ADN. Se ha descrito que la deficiencia de zinc detiene la maduración de las células espermáticas (23).

2. CALCIO

El calcio con masa atómica 40 y estado de oxidación de 2^+ , es un elemento metálico, suave, de color blanco plateado. Tiene un punto de fusión de 842°C y punto de ebullición de 1484°C . En la composición elemental del organismo humano, ocupa el quinto lugar después de oxígeno, carbono, hidrógeno y nitrógeno, constituye el 1,9% del peso en el organismo (24).

El Contenido de calcio ionizado en el líquido extracelular es aproximadamente 4,8mg/100mL. En el plasma hay una fracción de 3,2mg/100mL de calcio enlazado a una albúmina. En el compartimento celular la concentración de calcio total es comparable con la del líquido extracelular (24).

2.1. Absorción

En virtud de las condiciones fisiológicas, los iones Ca^{2+} son absorbidos principalmente en el intestino delgado. Pequeñas cantidades son absorbidas en el estómago y el intestino grueso, en el colon menos del 10%. El orden de la tasa de absorción es: duodeno > yeyuno > íleon (25).

La biodisponibilidad del Ca^{2+} en la dieta afecta su eficiencia de absorción intestinal. Una dieta baja en Ca^{2+} aumenta el coeficiente de absorción intestinal. La variabilidad de la absorción intestinal también está relacionada a las necesidades fisiológica de Ca^{2+} pero en general cuando aumentan los requerimientos y/o la ingesta es baja, mejora la eficiencia de absorción (25).

2.2. Distribución

En general, el transporte de Ca^{2+} es mediado por una variedad de procesos complejos que son regulados por hormonas, factores de desarrollo y factores fisiológicos. El 99% del calcio en el organismo humano es localizado en el esqueleto. El 1% remanente se distribuye por igual entre los dientes y tejidos blandos, con solo el 0.1% en el fluido extracelular. Aproximadamente el 50% del calcio total de la sangre se encuentra en la forma ionizada fisiológicamente activa, el 10% aproximadamente está formando complejos con citrato, fosfato u otros aniones, y el 40% restante unido a proteínas, principalmente albúmina (25).

El calcio en la sangre tiene la función de regular procesos vitales para el organismo tal como la coagulación de la sangre por ser el factor IV, contracción muscular, transmisión nerviosa y mediación de algunas acciones hormonales (25).

El calcio entra en el líquido extracelular en el intestino delgado por la absorción y la resorción ósea, sale del fluido extracelular a través del tracto gastrointestinal, riñones y piel, entra al hueso al momento de su formación. Además, el flujo de calcio se produce en todas las membranas celulares. El flujo de calcio también es un mediador importante de los efectos hormonales a través de varias vías de señalización intracelular (25).

2.3. Deficiencia

Cuando la deficiencia es a largo plazo y desde etapas tempranas de la vida, puede causar entre otras consecuencias:

Deformidades óseas: como la osteomalacia, raquitismo y osteoporosis.

Tetania: niveles muy bajos de calcio en sangre aumentan la irritabilidad de las fibras y los centros nerviosos, lo que resulta en espasmos musculares conocidos como calambres, una condición llamada tetania (26).

Otras enfermedades: hipertensión arterial, hipercolesterolemia, y cáncer de colon y recto (26).

2.4. Calcio y reproducción

La reacción acrosómica del espermatozoide mamífero es un proceso calcio-dependiente que es regulado por canales de iones calcio voltaje-dependiente (CCVD). Localizados en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide. La capacidad de los espermatozoides para desplazarse y fertilizar el óvulo es modulada por los cambios de permeabilidad iónica inducida por estímulos ambientales y los componentes del óvulo de la capa exterior. Es probable que el Ca^{2+} sea el mensajero clave en este intercambio de información (27, 28, 29).

El éxito de la fertilización requiere que el espermatozoide viaje largas distancias y someterse a la capacitación (un proceso calcio-dependiente que el espermatozoide requiere para fertilizar el óvulo), antes de llegar al óvulo femenino. Después de alcanzar su objetivo, los espermatozoides deben interactuar con la matriz

extracelular del óvulo, incluidas las proteínas de la zona pelúcida y liberar el material acrosomal. Se considera que el calcio ejerce función sobre la mayoría de estos procesos, sino es que en todos (27, 30).

El calcio tiene un papel predominante en la regulación de la motilidad, en procesos funcionales como el crecimiento y diferenciación durante la espermatogénesis; y en la fertilización incluyendo la iniciación de la reacción acrosómica. Los gradientes de calcio a través de la membrana del plasma, requerido para la homeostasis del calcio y señal, son mantenidos en parte por la membrana del plasma y la actividad de la ATPasa-calcio (11, 31, 32).

La necesidad de iones calcio extracelulares para la inducción de la reacción acrosómica esta mediada por estímulos fisiológicos. La afluencia de este catión es uno de los primeros acontecimientos descritos en la señal de la cascada de transducción que conduce a la pérdida acrosomal en respuesta al líquido folicular, la progesterona, o zona pelúcida (33).

En cuanto a los requisitos de Ca^{2+} para la capacitación del espermatozoide se requieren concentraciones milimolares de este catión para permitir la aparición de algunos eventos relacionados con este proceso en los humanos. En cuanto a la interacción del espermatozoide con el óvulo, los espermatozoides de varias especies requieren iones calcio para enlazarse y penetrar en la zona pelúcida y fusionarse con la membrana plasmática del óvulo (33).

En un estudio *in vitro* usando tejidos testiculares de ratas, se produjo un aumento del zinc en presencia de iones de calcio. Este aumento de iones de zinc no se produjo en ausencia de iones de calcio, lo que indica que los iones zinc actúan sinérgicamente con el calcio iónico y desempeñan un papel esencial en la función testicular (9).

2.5. Composición química del plasma seminal

El plasma seminal es un medio rico y complejo. Sirve a la vez de vehículo y de medio nutritivo además de protector de los espermatozoides (34).

Está compuesto de:

– Constituyentes minerales: Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} .

2.6. Función del zinc en plasma seminal.

El zinc es un catión específico del plasma seminal con características bactericidas. Su papel es estabilizar la condensación de la cromatina. Es transportado por el citrato y las proteínas. La concentración en plasma seminal descritas en la literatura varía desde 8.4 a 20.2 mg/dL (34).

Tabla 1. Valores de concentración de zinc en semen (35).

Zn (mg/100mL)	Referencias
10.5	Abou-Shakra et al, 1989
13.0	Arver and Sjoberg, 1982
20.2	Carpino and Siciliano, 1998
19.0	Cooper et al, 1991
17.2	Hirsch et al, 1991
16.5	Homonnai et al, 1978
14.0	Jeyendran et al, 1989
16.0	Kavanagh, 1985
11.7	Lewis-Jones et al, 1996
16.1	Mandal and Bhattacharyya, 1986
16.7	Mandal and Bhattacharyya, 1987a
14.0	Mann and Lutwak-Mann, 1981
13.4	Mawson and Fischer, 1956
19.0	Papadimas et al, 1983
16.6	Paz et al, 1977
14.6	Ponchietti et al, 1984
14.7	Rosecrans et al, 1987
10.6	Sorensen et al, 1999
19.5	Stankovic and Mikac-Devic, 1976
13.0	Stegmayr et al, 1982
12.4	Umeyama et al, 1986
14.4	Wood et al, 1982

2.7. Función del calcio en plasma seminal

El calcio es considerado un primer regulador de la motilidad del espermatozoide, capacitación e iniciación del proceso de la reacción acrosómica. Además participa en el crecimiento y diferenciación durante la espermatogénesis. La concentración en plasma seminal varía desde 13.7 a 53.3 mg/dL (31).

Tabla 2. Valores de concentración de calcio en semen (35).

Referencias	
Ca (mg/100mL)	
16.7	Abou-Shakra et al, 1989
24.9	Adamopoulos and Deliyiannis, 1983
23.0	Arver and Sjoberg, 1982
32.0	Bondani et al, 1973
38.0	Fong et al, 1986
44.5	Ford and Harrison, 1984
25.0	Gershbein and Thielen, 1988
24.5	Hirsch et al, 1991
31.9	Homonnai et al, 1978
26.1	Homonnai et al, 1980
20.8	Huggins and Johnson, 1933
24.9	Huggins et al, 1942
26.0	Jeyendran et al, 1989
30.0	Kavanagh, 1985
22.0	Kilic et al, 1996
40.9	Mandal and Bhattacharyya, 1987a
23.3	Mandal and Bhattacharyya, 1990
16.0	Ponchietti et al, 1984
13.7	Prien et al, 1990
25.8	Rosecrans et al, 1987
53.3	Sorensen et al, 1999
33.0	Stegmayr et al, 1982
24.5	Umeyama et al, 1986

2.8. Composición química del suero

En condiciones normales, la sangre mantiene su estado líquido mientras permanece en los vasos sanguíneos. Si se retira del cuerpo, se endurece y forma un gel con un líquido, este líquido de color amarillo recibe el nombre de suero que es simplemente el plasma menos las proteínas de la coagulación.

Los componentes principales del suero son: agua, albúmina, globulina, urea, ácido úrico, creatinina, sales de amoníaco, aminoácidos, glucosa, ácidos grasos, glicerol, hormonas, bióxido de carbono, zinc, calcio, potasio, sodio, magnesio, cloro, fosfatos, sulfatos y carbonatos (12).

2.9. Función del zinc en suero

Casi todo el zinc en suero está enlazado a proteínas: 60-80% se enlaza a la albúmina (formando un complejo metal-proteína); 30-40% está unido a alfa-macroglobulina (formando una metaloproteína); 2-8% está asociado con la transferrina y aminoácidos libres. La unión con albúmina se relaciona con el transporte, además la cantidad de albúmina libre regula la cantidad de zinc dentro del organismo humano durante la absorción del zinc. El zinc enlazado libremente a albumina es intercambiado para su absorción por la célula. La fracción enlazada a los aminoácidos libres influye en la excreción urinaria del zinc. La concentración en suero descrita en la literatura varía desde 0.70 a 1.50 $\mu\text{g/mL}$ (36).

2.10. Función del calcio en suero

El calcio es un nutriente importante de la sangre, de la cantidad total de calcio, el 50% es calcio ionizado libre, 10% esta combinado con varios aniones (incluidos, bicarbonato, citrato, fosfato, lactato y sulfato) y el 40% remanente esta enlazado a proteínas del suero principalmente albúmina. El calcio es requerido para varios procesos fisiológicos incluyendo transmisión neuromuscular, contracción del musculo liso y esquelético, automatismo cardiaco, función nerviosa, división celular y movimiento. La concentración en suero descrita en la literatura varía desde 88 a 103 $\mu\text{g/mL}$ (37, 38).

3. CROMO

El cromo (Cr) es un elemento metálico. Las tres formas más estables en las cuales el cromo está presente en el medio ambiente son: 0 (metal y aleación), +3 (cromo trivalente), y +6 (cromo hexavalente). En el estado de valencia +3, la química del cromo es dominada por la formación de un complejo estable con ligandos orgánicos e inorgánicos (39).

El cromo es un micronutriente esencial. El cromo trivalente ayuda a metabolizar la insulina, y convertir azúcar en energía, se encuentra en cantidades de microgramos, suministrado por alimentos, principalmente en frutas, verduras y productos de grano, además una serie de suplementos dietéticos consumidos por la población contienen cromo trivalente; muchos de los cuales son combinaciones de vitaminas y minerales (40, 41, 42).

3.1. Absorción

La absorción de sales inorgánicas de este metal es baja (<2%), puede aumentar cuando esta unido a moléculas orgánicas. La principal proteína transportadora de cromo es la transferrina, que también desempeña una función crítica en el movimiento de cromo de la sangre a la cromodulina, la cuál es una proteína enlazante de bajo peso molecular que se une al cromo favoreciendo su absorción, (LMWCr: low molecular weight chromium) (43).

La transferrina del plasma que contiene el cromo se une a los receptores de la transferrina y es interiorizado por endocitosis, el cromo se libera de la transferrina, y como elemento libre es enlazado por cromodulina (43).

Con este paso, el cromo es transformado de transferrina a la cromodulina, el cual normalmente existe en las células insulino-dependientes en la forma apo, inactiva. Vinculada con iones cromo convierte su forma inactiva cromodulina a su holo, o forma activa (43).

3.2. Distribución

Los compuestos de Cr(III) son eliminados rápidamente de la sangre y más lentamente de los tejidos. El contenido de cromo en sangre como un porcentaje de concentración de la sangre decrece de 94% en 30 minutos a 17% en 24 horas y a 5% en 96 horas. Dentro de varias horas de dosificación, 50% del cromo en plasma es distribuido al hígado, bazo, y otros órganos. Después de 3 meses, en el hígado esta contenido 50% de la carga corporal del cromo. Los complejos de cromo (III), los cuales son enlazados a ligandos de bajo peso molecular son más susceptibles para ser capaces de atravesar las membranas celulares. Una cantidad significativa de cromo absorbido se acumula en el hueso (39).

3.3. Deficiencia

La deficiencia de cromo causa cambios en el metabolismo de la glucosa y lípidos, puede estar asociado con el principio de diabetes en la madurez, enfermedades cardiovasculares, así como colesterol elevado en suero y triglicéridos, desordenes del sistema nervioso, neuropatía y encefalopatía (39, 44, 45).

3.4. Cromo y reproducción

El cromo (III) se encuentra naturalmente en los alimentos y es asociado con suplementos nutricionales en varias formas complejas. El complejo más popular es el picolinato de cromo el cual es un compuesto orgánico de Cr(III) y ácido picolinico, seguido del nicotinato y el citrato de cromo que se emplean como suplementos nutricionales (46).

3.5. Picolinato de cromo

El picolinato de cromo es una forma de cromo trivalente que esta disponible como suplemento dietético para evitar la deficiencia de cromo, el Cr(Pic)₃ ha mostrado efectos benéficos en la reducción de factores de riesgo asociados a la diabetes.

Es ampliamente utilizado debido a su actividad sobre la insulina, lípidos en sangre y los posibles efectos en la reducción de peso (47, 48).

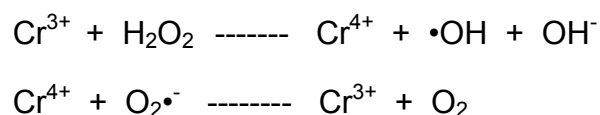
El suplemento de picolinato de cromo se ha popularizado porque hay incremento de masa sin grasa, disminución de la grasa y del porcentaje de masa corporal, aumento de la fuerza muscular y tamaño de los músculos, control de la glucosa, disminución de colesterol y triglicéridos en suero, además de sensación de mayor energía y vigor, aun cuando la mayoría de los estudios realizados mencionan que los efectos sobre el peso o masa corporal magra son de corto plazo (47).

Se sugiere que la toxicidad del Cr(III) se debe a la acumulación intracelular del metal, lo cual puede ser un factor importante en la formación de enlaces entre el cromo y el ADN, causando efectos genotóxicos, además el cromo trivalente puede afectar el metabolismo y estado del hierro, ya que este compite con el hierro trivalente, por la unión a la transferrina, especialmente en altas concentraciones (42, 47, 49, 50).

3.6. Cromo y especies reactivas de oxígeno (ERO)

El efecto de cromo trivalente sobre los organismos depende también de la forma de Cr^{3+} a que los organismos están expuestos, ya que puede existir como iones libres, ó más comúnmente en complejos con ácidos orgánicos (51).

El cromo por ser un elemento cambiante en valencia puede entrar en procesos redox,



Cuando el Cr^{3+} entra en las células, puede ser enlazado a ligandos como tioles de baja y alta masa molecular (particularmente metalotioneinas) o participar en procesos redox. En la reacciones redox, se puede inducir la oxidación de lípidos, proteínas y DNA, etc. o depleción de glutatión (51).

Esta capacidad aparentemente se deriva de la combinación cromo y picolinato, ni el picolinato ni el cromo (III) se catalizan por separado. Los ligandos del picolinato cambian el potencial redox del centro crómico de tal manera que es susceptible a la reducción por agentes biológicos como ascorbatos o tioles. La reducción de especies de cromo puede interactuar con oxígeno para producir especies reactivas de oxígeno. (42, 47, 49, 50, 52).

Los radicales libres son importantes tanto para explicar la función normal como la patofisiología del espermatozoide humano. El espermatozoide es vulnerable al daño peroxidativo de los radicales libres porque poseen en su membrana un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados los cuales son necesarios para mantener la fluidez requerida en la fusión de la membrana durante la fertilización. Niveles altos de RL pueden alterar la permeabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide, causando anomalías en la morfología espermática y alteración en la motilidad, dañando así la fertilidad masculina (13, 53, 54).

3.7. Cromo y su efecto en la concentración de zinc

La exposición a Cr(VI), provoca una disminución de la concentración de zinc en el semen, lo que puede originar una reducción en el nivel total de antioxidantes con un consecuente aumento de especies reactivas de oxígeno, Cr(VI)-inducidas, lo que resulta en lesiones oxidativas en las células germinales (23).

En un estudio se describe que la toxicidad de Cr(III) se debe a la producción de radicales libres generados de la reacción del Cr(II) con H_2O_2 y peróxidos de lípidos. El Cr(II) se forma mediante la reducción de Cr(III) por reductores biológicos como L-cisteína y NADPH. La administración oral de cromo incrementa los peróxidos de lípidos, disminuye el glutatión reducido y la actividad de enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en la cual el zinc está presente (11, 55, 56)

4. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

La Espectroscopía de Absorción Atómica (**EAA**) es una técnica elemento-selectiva que provee sensibilidad analítica a los niveles de $\mu\text{g/mL}$ (ppm) para llama y ng/mL (ppb) en horno de grafito y generador de hidruros. La cuantificación por EAA se logra midiendo la cantidad de radiación absorbida por átomos libres y neutros a una determinada longitud de onda analítica conocida como Línea de Resonancia (57).

Los principios de la cuantificación por Absorción Atómica (**AA**) siguen la ley Beer-Lambert, es decir, que el aumento de la absorbancia tiene una relación lineal a la concentración de los átomos del analito en fase gaseosa (57).

La EAA se diferencia de otras técnicas espectroscópicas predominantemente en la naturaleza de la fuente de radiación que se utiliza, generalmente lámparas de cátodo hueco (LCH), y el uso de calor para producir átomos libres y neutros como las especies absorbentes. Las líneas atómicas producidas por la fuente de radiación son estrechas con un grosor en promedio de 0.001 nm (57).

Los componentes instrumentales básicos (Figura 1), para la Absorción Atómica con llama requiere de: (58).

- a) Fuente de radiación: la más utilizada usualmente es una lámpara de cátodo hueco, para determinados elementos se emplea la lámpara de descarga sin electrodos (LDE). Se utiliza una lámpara específica para cada uno de los elementos a cuantificar (58).
- b) Nebulizador: por aspiración neumática de la muestra líquida, se forma una fina niebla (58).
- c) Quemador: por efecto de la temperatura alcanzada en la combustión y por la reacción de la combustión misma, se favorece la formación de átomos libres y neutros a partir de los componentes en solución (57, 58).
- d) Celda para la muestra: es llama que permite la atomización del analito (59).

- e) Monocromador: aísla la longitud de onda específica, a través de los dos componentes en este proceso, los cuales son la ventana de entrada permite que la radiación de la lámpara de cátodo hueco llegue a la rejilla de dispersión y la ventana de salida, que se coloca después del elemento de dispersión, su función es permitir que solo la radiación de la longitud de onda correcta pase al detector (59).
- f) Detector: mide la radiación que proviene de la llama, usualmente es un tubo fotomultiplicador (59).
- g) Amplificador o sistema electrónico, amplifica la señal eléctrica producida (58).
- h) Sistema electrónico: transforma estos cambios en la intensidad de la radiación en lecturas de absorbancia (58).

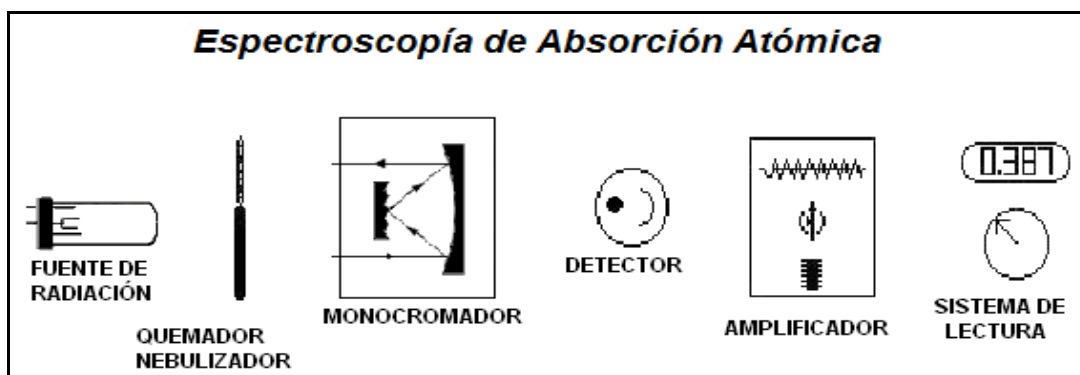


Figura 1. Diagrama que representa los componentes principales de un Espectrofotómetro de Absorción Atómica.

4.1. Descripción de la técnica de EAA

La muestra en forma líquida es aspirada por efecto neumático a través de un tubo capilar y conducida a un nebulizador que tiene la función de transformar la solución en una fina niebla, la cual en la cámara de premezclado se mezcla con los gases oxidante y combustible, llegan a la cabeza del quemador y en la llama se producen una serie de eventos para obtener átomos libres y neutros. Estos átomos absorben cuantitativamente la radiación emitida por la lámpara, la cantidad de radiación absorbida está en función de su concentración (51).

La señal de la lámpara una vez que pasa por la llama llega al monocromador, que tiene como finalidad el discriminar todas las señales que acompañan la línea de interés. Esta señal de radiación electromagnética llega a un detector o transductor y pasa a un amplificador y por último a un sistema de lectura (60).

4.2. Lámpara de cátodo hueco

Consta de un ánodo de tungsteno y un cátodo cilíndrico que está fabricado del elemento metálico para el que está hecha la lámpara, todo el sistema se encuentra en un tubo de vidrio sellado, relleno con un gas noble, como helio, argón, o neón (Figura 2) (60).

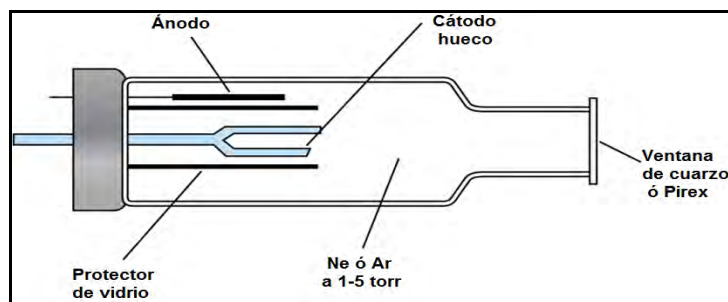


Figura 2. Estructura de una Lámpara de cátodo hueco para EAA.

El proceso dentro la lámpara de cátodo hueco se inicia al aplicar una diferencia de potencial eléctrico que ioniza el gas inerte, las moléculas de gas inerte cargado positivamente chocan contra el cátodo y se desaloja un átomo del elemento metálico del que está fabricado (58, 60).

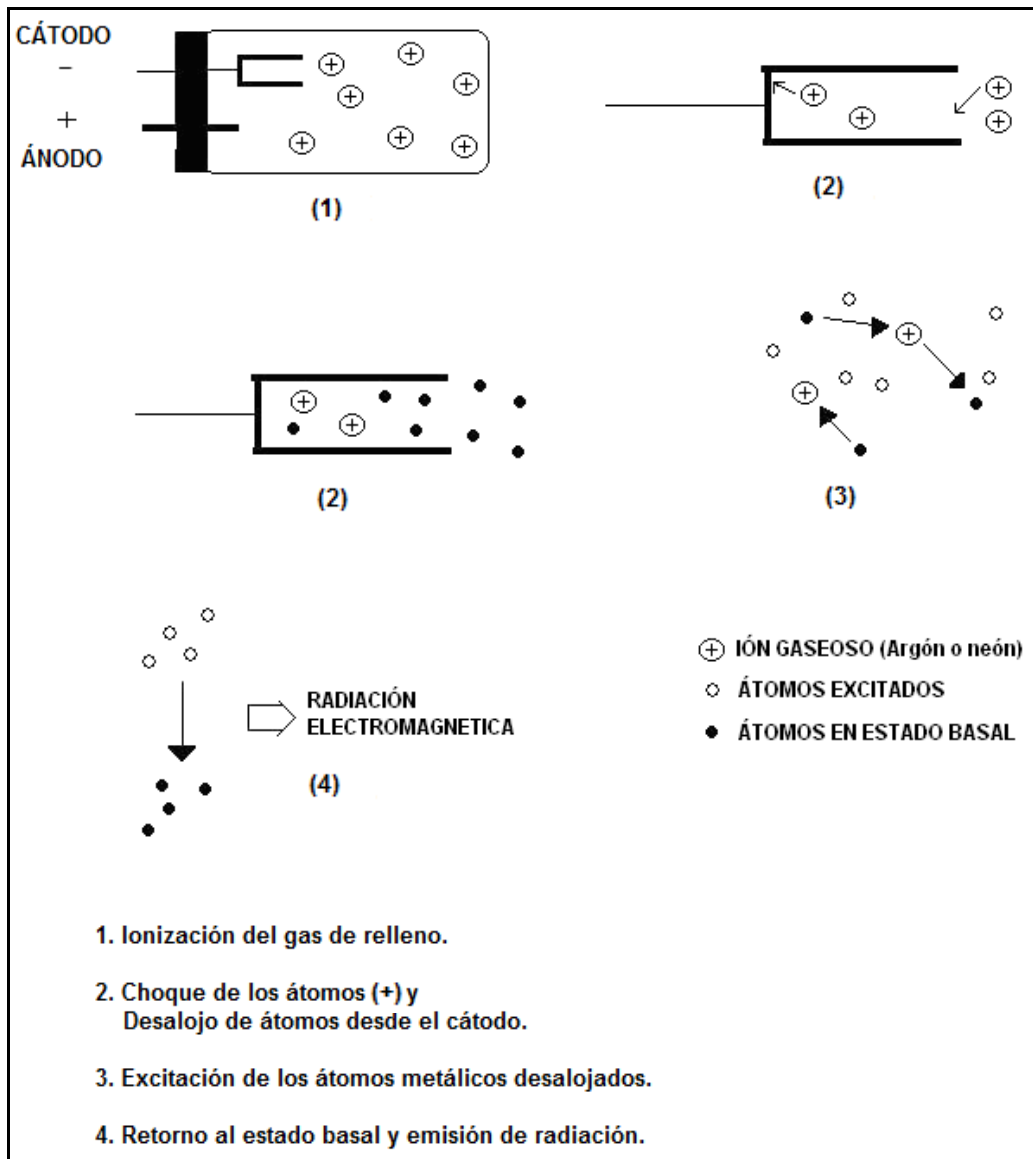


Figura 3. Eventos que ocurren en una lámpara de cátodo hueco

A través de esta serie de procesos se obtiene un haz de radiación. El resultado final es la obtención de un espectro característico del elemento del que está hecho el cátodo de la lámpara (59, 60).

4.3. Quemador

En el sistema de llama, la fuente de energía para la producción de los átomos libres es calor, comúnmente desde una llama de aire/acetileno (2400°C) u óxido nitroso/acetileno (2800°C). La muestra es introducida a través del sistema Nebulizador-Quemador de Flujo Laminar. La cabeza del quemador es alineado de manera que el haz de radiación que proviene de la lámpara de cátodo hueco pase a través de la llama para la llama aire-acetileno se emplea un quemador de 10cm de longitud en la rampa y de 5cm para la llama óxido nitroso-acetileno (58, 60).

4.4. Atomización

El paso de atomización puede ser ejecutado con éxito por cualquiera de las llamas o métodos electrotérmicos. En los dos métodos, se utiliza la energía térmica para vaporizar el analito del material, para romper los enlaces químicos dentro de los componentes de las moléculas y llevar al analito hasta su forma atómica gaseosa libre y neutra. El porcentaje de los átomos de interés en la molécula que son convertidos a la fase gaseosa durante el proceso de atomización es llamada eficiencia de atomización (57).

4.4.1. Atomizador de llama

Los procesos dentro de la llama hasta llegar a la atomización se inician cuando la solución de la muestra es aspirada hacia el nebulizador por efecto neumático, se nebuliza y mezcla con el oxidante y el combustible, juntos llegan a la cabeza del quemador. En la llama lo primero es la desolvatación, en la que el disolvente se evapora para producir un aerosol molecular finamente dividido. Luego, este se volatiliza para formar moléculas de gas. La disociación de la mayor parte de dichas moléculas produce un gas atómico. Algunos de los átomos del gas se ionizan para formar cationes y electrones. Otras moléculas y átomos se producen en la llama como resultado de las interacciones del combustible con el oxidante y con las distintas especies de la muestra (60).

La atomización de un analito no es homogénea en toda la llama. La máxima producción de átomos libres en la llama es dictada por la variación de temperatura en las diferentes zonas de la llama y por la tasa de difusión de los gases en la llama que sirven para diluir la población de átomos-libres. Para lograr la máxima sensibilidad, la radiación de la línea fuente pasa a través del área de la llama que contiene el mayor número de libre átomos. Esta condición se cumple mediante la optimización de la altura y la orientación de la cabeza del quemador en relación con el haz de radiación que pasa a través de la llama paralela al eje principal del quemador (57).

4.5. Monocromador

La función del monocromador es aislar la radiación de la longitud de onda seleccionada o línea de resonancia a la que se va a cuantificar el analito, y permitir que esté llegue al detector (59).

Los componentes básicos del monocromador son las aberturas de entrada y salida y una rejilla de dispersión. La abertura de entrada (slit), permite que la radiación de la lámpara de cátodo hueco alcance el elemento de dispersión, pero evita que todas las demás radiaciones como radiación de luces dispersas, sigan de frente con la trayectoria de la radiación. La abertura de salida (slit), esta después de la rejilla de dispersión, su función es permitir que solo la radiación correcta y deseada de la longitud de onda pase al detector (59, 60).

4.6. Detector

El detector usado comúnmente en espectroscopia de absorción atómica es un tubo fotomultiplicador. El fotomultiplicador es una serie de electrodos (o dinodos), cada uno con una superficie emisiva y un potencial positivo con respecto al electrodo anterior. Cuando un fotón llega a la primera superficie de emisiones, un electrón es expulsado y atraído al siguiente dinodo. Este es acelerado en el proceso, y cuando este llega al próximo dinodo expulsa varios electrones. Estos, a su vez, son atraídos a los siguientes dinodos, y que a su vez cada uno expulsa varios electrones. Este proceso es continuo a través de cada dinodo, y una lluvia

de electrones llega al final del puesto de recolección. De esta forma, el único fotón es el responsable de una lenta generación de electrones y, por tanto, una importante señal eléctrica (59).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En años recientes se ha incrementado la cantidad de casos de infertilidad masculina, lo cual ha desencadenado una serie de esfuerzos por determinar las posibles causas de tales sucesos. En múltiples estudios se asocia la producción de radicales libres, como una posible causa de infertilidad masculina pues estos compuestos oxidantes están asociados a la generación de daño peroxidativo de la membrana plasmática de los espermatozoides disminuyendo de este modo su viabilidad.

Uno de los generadores de estrés oxidativo son los compuestos de cromo, a los cuales la población en general está bajo constante exposición no solo por exposición ocupacional sino también por la ingesta de suplementos alimenticios que contienen cromo.

De ahí la importancia de la cuantificación de zinc, el cual se caracteriza por ser un oligoelemento con propiedades antioxidantes, lo cual presumiblemente podría fungir como regulador o inhibidor de daño oxidativo a causa de las especies reactivas de oxígeno. De igual manera es de vital importancia la determinación de calcio extracelular pues su principal función es activar por diversos procesos el calcio intracelular y así regular la iniciación de la reacción acrosómica, además de ser un factor crucial en el momento de la fertilización.

En la actualidad estudios recientes asocian la ingesta de suplementos alimenticios de cromo con una disminución en los parámetros seminales así como un incremento en la concentración de cromo en el organismo por lo tanto el desarrollo experimental de este trabajo se enfoca a la cuantificación de zinc y calcio en muestras de suero y plasma seminal provenientes de voluntarios sanos (jóvenes entre 22 a 27 años), los cuales ingirieron un suplemento alimenticio basado en picolinato de cromo, los resultados serán comparados con valores basales de zinc y calcio además de parámetros seminales y concentración de cromo para así poder determinar las interacciones de estos metales fundamentales para los procesos reproductivos con agentes altamente tóxicos como el cromo.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo General:

Establecer el efecto de la exposición a cromo sobre los niveles de concentración de Zn y Ca en suero y plasma seminal como consecuencia de la administración de picolinato de cromo en hombres jóvenes sanos.

2. Objetivos Particulares:

- Aplicar la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica con llama para la cuantificación de Zinc y Calcio en muestras de suero y plasma seminal.

- Establecer la concentración de Zinc y Calcio en suero y plasma seminal al inicio del estudio sin administración del suplemento alimenticio, durante la administración y en la fase final de suspensión del suplemento.

- Determinar el efecto de la administración del suplemento alimenticio en la concentración de Zn y Ca en la población estudiada.

- Contrastar los datos obtenidos para ambos metales con resultados publicados de la calidad espermática y cuantificación de cromo en las mismas muestras biológicas.

V. HIPÓTESIS

Aplicando la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica es posible determinar la concentración de zinc y calcio en plasma seminal y suero humano, y con ello establecer el efecto del picolinato de cromo en los niveles de concentración de ambos metales en los fluidos biológicos mencionados.

VI. MATERIAL Y MÉTODO

1. MATERIAL BIOLÓGICO

- 12 Varones sanos

2. MATERIAL DE LABORATORIO

- Guantes de látex
- Vasos de precipitados de 10, 50 y 100 mL Pyrex
- Probeta graduada de 20 y 500 mL Pyrex
- Tubos de ensaye de 10 mL Pyrex
- Vasos de precipitados de 10, 50, 100, 250 y 500 mL Pyrex
- Pipetas Pasteur
- Matraces aforados de 2, 5, 50, 100 mL Pyrex
- Pipetas volumétricas de 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mL Pyrex.

3. EQUIPO E INSTRUMENTOS

- Centrifuga. BECKMAN MODEL TJ-6.
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica. VARIAN AA-1475.
- Balanza analítica. OHAUS.

4. REACTIVOS

- Ácido nítrico concentrado J. T. BAKER
- Agua desionizada
- Solución de referencia de Zinc (1000 µg/mL) J.T BAKER
- Solución de referencia de Calcio (1000 µg/mL) J.T BAKER
- Acetileno (presión 0.8 Kg/cm).
- Aire (presión 2.8 Kg/cm)

5. SOLUCIONES

- Ácido nítrico al 5 %
- Óxido de Lantano al 0.2%

6. MÉTODO

6.1. Selección de los individuos

Se reclutaron varones jóvenes entre 21 y 27 años de edad, se les informó del proyecto y se obtuvo el consentimiento informado para el proyecto de investigación, se les ingresó en el ensayo basándose en los datos de la historia clínica y el análisis previo de muestras de semen y suero que indicaron que eran individuos sanos. Los varones se dividieron en dos grupos al azar, el grupo 1 ingirió una dosis diaria de 200 µg de picolinato de cromo, el grupo 2 ingirió una dosis diaria de 200 µg de L-carnitina como placebo. En ambos grupos se realizaron cuatro tomas de muestras de suero y tres de semen espaciadas uniformemente durante los diez días previos al inicio de la ingesta de L-carnitina y picolinato de cromo. La ingesta de estos compuestos tuvo un periodo de 21 días durante el cual se tomaron siete muestras de suero y cuatro de semen espaciadas uniformemente. Al concluir la ingesta se lograron tomar tres muestras de suero y dos de semen espaciadas cada tercer y quinto día respectivamente.

Tabla 1. Distribución de la ingesta de picolinato de cromo Cr(Pic)₃ y L-carnitina, en el grupo 1 y grupo 2:

Grupo 1	Sin ingesta de Cr(Pic) ₃ por 10 días, se tomaron 3 muestras de semen y 4 de suero.	Dosis diaria de 200 µg Cr(Pic) ₃ por 21 días, se tomaron 4 muestras de semen y 7 de suero.	Sin ingesta de Cr(Pic) ₃ por 7 días, se tomaron 2 muestras de semen y 3 de suero.
Grupo 2	Sin ingesta de L-carnitina, por 10 días se tomaron 3 muestras de semen y 4 de suero.	Dosis diaria de 200 µg L-carnitina por 21 días, se tomaron 4 muestras de semen y 7 de suero.	Sin ingesta de L-carnitina por 7 días, se tomaron 2 muestras de semen y 3 de suero.

6.2. Toma de muestras de semen

6.2.1. Se respetó un periodo de abstinencia sexual de 3 a 4 días entre cada muestra de semen de acuerdo al manual de la OMS (1999). Las muestras se obtuvieron por masturbación directa en un envase de plástico estéril. El plasma seminal fue obtenido a 1000 rpm por 15 min a temperatura ambiente el sobrenadante fue separado y almacenado a 4°C en tubos de vidrio libre de metales. De cada individuo se contó con muestras antes durante y después de la ingesta del complemento alimenticio. Las muestras se recolectaron cada tercer día, se centrifugaron para obtener el plasma seminal. Los procedimientos seguidos para el análisis de semen siguieron los criterios de la OMS.

6.2.2. Se tomaron muestras de sangre cada tercer día a partir de la fecha de inicio del estudio, las cuales fueron centrifugadas y se separó el suero sanguíneo.

6.3. Procesamiento de muestra

Las muestras de suero y semen se diluyeron 1:4 con una solución de óxido de lantano al 0.2%.

La cuantificación se realizó por Espectrofotometría de Absorción Atómica con llama, empleando como fuente de radiación una lámpara de cátodo hueco para zinc, realizando las lecturas a una línea de resonancia de 213.0 nm y una lámpara de cátodo hueco para calcio realizando las lecturas a una línea de resonancia de 422.7 nm. Se empleó la llama de aire-acetileno. En ambos casos se prepararon soluciones de referencia de concentración conocida, se grafico la curva de calibración y se interpolaron los resultados de absorbancia obtenidos para cada una de las muestras.

6.4. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media \pm error estándar medio (e.e.m) y el análisis estadístico se realizó mediante el empleo de paquete estadístico Statgraphics Plus 5.1, con el que se realizó la comparación de los datos entre los grupos de estudio (voluntarios testigo vs voluntarios con tratamiento de L-carnitina y los sometidos al tratamiento con picolinato de cromo) de las fases de estudio que se dividieron en antes, durante y después de la ingesta de ambos suplementos, por medio de la prueba de Contraste Múltiple de Rango, para obtener cuál de estas fases presentaba diferencia estadísticamente significativa a un nivel de confianza de 95% comparando contra en valor testigo (antes de la ingesta).

VII. RESULTADOS

Debido a que la concentración de zinc y calcio en suero y plasma seminal, del grupo de L-carnitina no presentan un comportamiento homogéneo, el análisis estadístico de los periodos de estudio se comparó contra los valores de todos los voluntarios antes de la ingesta.

En la Tabla 3, se observan los resultados de la concentración de zinc ($\mu\text{g/mL}$) en suero para el grupo de L-carnitina y el grupo que suplementado con picolinato de cromo, agrupados de acuerdo a las fechas en que fueron recolectadas las muestras, así como los periodos en que se dividió el estudio.

1. Contenido de zinc en suero ($\mu\text{g/mL}$)

Tabla 1. Valores de concentración de zinc en suero de hombres sanos de 21 a 27 años de un grupo que ingirió L-carnitina (placebo) y otro grupo suplementado con picolinato de cromo.

TIPO DE TRATAMIENTO	VOLUNTARIO	ANTES DEL TRATAMIENTO				DURANTE EL TRATAMIENTO								DESPUÉS DEL TRATAMIENTO		
		07/04/2008	11/04/2008	14/04/2008	18/04/2008	21/04/2008	25/04/2008	28/04/2008	02/05/2008	05/05/2008	07/05/2008	09/05/2008	12/05/2008	14/05/2008	16/05/2008	
PLACEBO	L-Carnitina	4	0.70	0.85	1.05	0.95	0.90	0.80	1.20	0.75	0.50	1.30	0.55	1.10	1.25	1.00
		8	0.60	0.70	1.10	0.65	0.75	1.20	1.05	1.55	0.85	0.55	1.45	0.60	0.70	1.55
TRATAMIENTO	Cr(Pic) ₃	3	0.50	1.15	1.25	0.65	0.95	0.75	0.70	0.55	0.50	0.55	1.10	0.30	0.75	1.45
		5	0.80	1.20	0.85	1.30	0.40	0.35	0.95	1.30	0.30	0.65	1.05	0.80	1.15	1.20
		9	0.90	0.75	1.05	0.40	0.40	1.05	0.85	0.85	0.80	0.40	0.60	0.35	0.40	0.65
		10	0.65	1.10	1.55	2.35	0.55	0.85	0.45	0.60	0.40	0.60	0.45	0.45	0.50	1.40
		13	0.85	2.40	0.70	0.30	0.50	0.90	0.50	0.40	0.70	1.05	0.50	0.55	0.75	1.55
		17	0.85	1.30	1.40	0.85	1.35	1.00	0.80	1.15	0.95	1.00	1.40	0.35	0.85	1.30
		18	1.10	0.90	1.40	0.85	0.90	0.95	0.35	1.00	1.10	0.30	0.25	0.40	1.00	1.25
		19	1.30	0.90	1.15	0.60	1.50	0.65	0.60	0.50	0.30	0.45	0.60	0.50	0.55	0.50
		20	1.40	0.45	0.90	0.30	0.40	0.90	1.05	0.50	0.55	1.15	1.25	0.70	0.80	1.05
		21	1.80	0.50	0.70	0.65	0.30	1.45	0.65	0.95	1.00	0.40	0.15	0.30	0.45	0.85

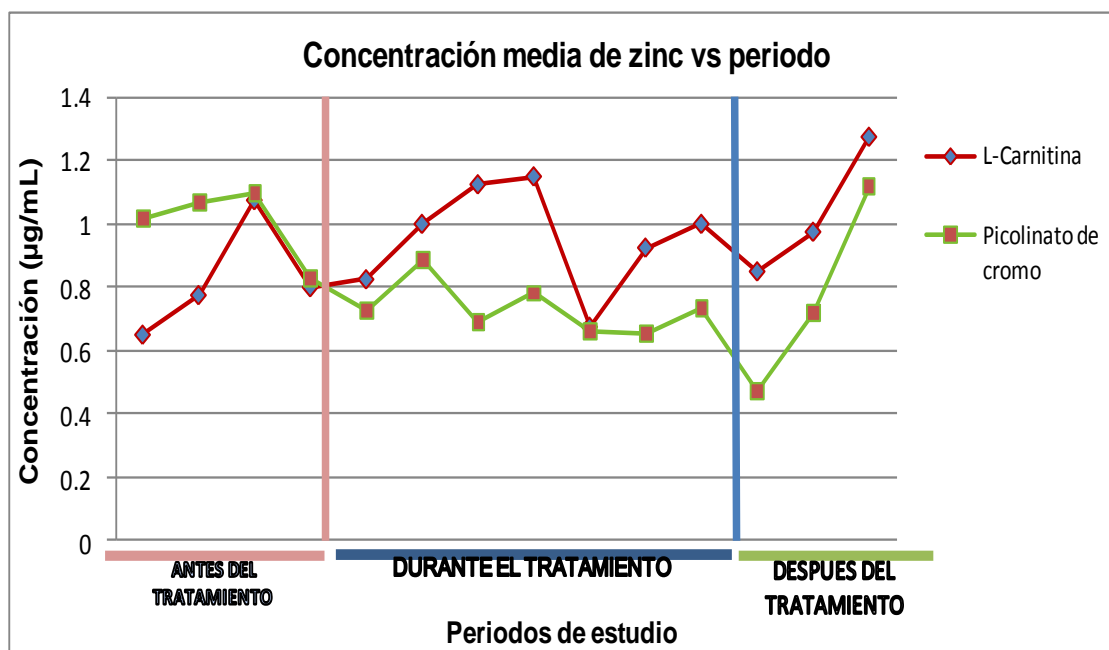


Figura 1. Niveles de concentración promedio de zinc en suero en los tres periodos del tratamiento con L-carnitina (placebo) para el grupo testigo y los niveles de concentración para el grupo suplementado con picolinato de cromo.

En la Figura 4, se observan los datos de los valores de concentración de zinc en suero de hombres sanos de 21 a 27 años de un grupo que ingirió L-carnitina (placebo) y otro grupo suplementado con picolinato de cromo (Tabla 3), representados en un gráfico de dispersión agrupando los datos por medio del uso de la media de la concentración de zinc en suero por fecha de toma y para cada periodo del estudio, observándose una variabilidad con respecto a la concentración del metal durante y después del tratamiento, tanto para el grupo suplementado con picolinato de cromo como al que se le suministró L-carnitina advirtiéndose que existe un decremento en la concentración de zinc una vez iniciada la ingesta del suplemento alimenticio a base de cromo y su posterior incremento una vez suprimida la de este.

Tabla 2. Valores de concentración poblacional de zinc en suero para ambos grupos, los suplementados con L-carnitina (placebo) y los de picolinato de cromo.

NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE ZINC EN SUERO ($\mu\text{g/mL}$)											
SIN TRATAMIENTO TESTIGO	TRATAMIENTO CON:	DURANTE EL TRATAMIENTO							DESPUÉS DEL TRATAMIENTO		
0.97 \pm 0.06 n = 48	L-Carnitina n = 2	0.83 \pm 0.07	1.00 \pm 0.20	1.13 \pm 0.07	1.15 \pm 0.40	0.68 \pm 0.18	0.93 \pm 0.38	1.00 \pm 0.45	0.85 \pm 0.25	0.98 \pm 0.28	1.28 \pm 0.28
	Picolinato de cromo n = 10	0.73 \pm 0.14	0.89 \pm 0.09	0.69 \pm 0.07	0.78 \pm 0.10	0.66 \pm 0.09	0.66 \pm 0.10	0.74 \pm 0.14	0.47 \pm 0.10	0.72 \pm 0.08	1.12 \pm 0.11

n = Número de muestra.

En la Figura 5 mediante el uso de la gráfica de barras se muestran los datos de la Tabla 1, en esta se muestra nuevamente el comportamiento de la concentración de zinc en suero para ambos grupos de estudio, en cuanto al comportamiento del metal para el grupo de L-carnitina se observa que existe la tendencia a incrementar la concentración de zinc, en comparación con el grupo que ingirió picolinato de cromo en el cual se observa una tendencia negativa del metal en este fluido biológico, todo esto con respecto a los valores que se han considerado como testigo (valores obtenidos antes de la ingesta de alguno de los suplementos), para cada una de las fechas de ingesta de suplemento mientras que una vez concluido el periodo de toma se observa una recuperación errática en el nivel de zinc, debido a que no se alcanza el valor control no se presenta una recuperación total.

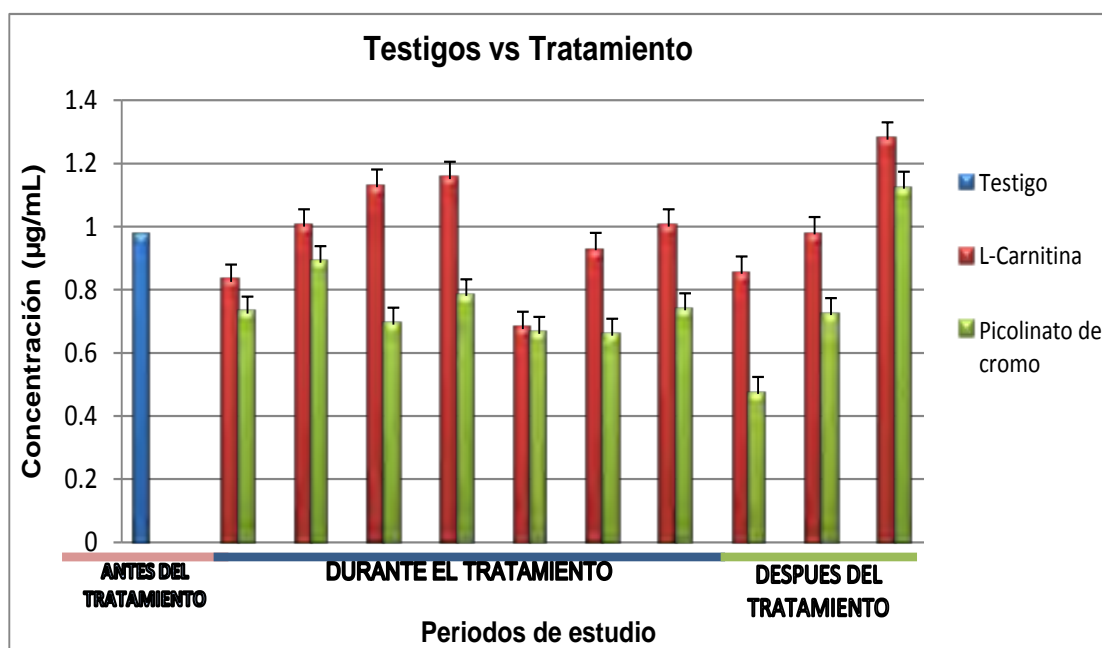
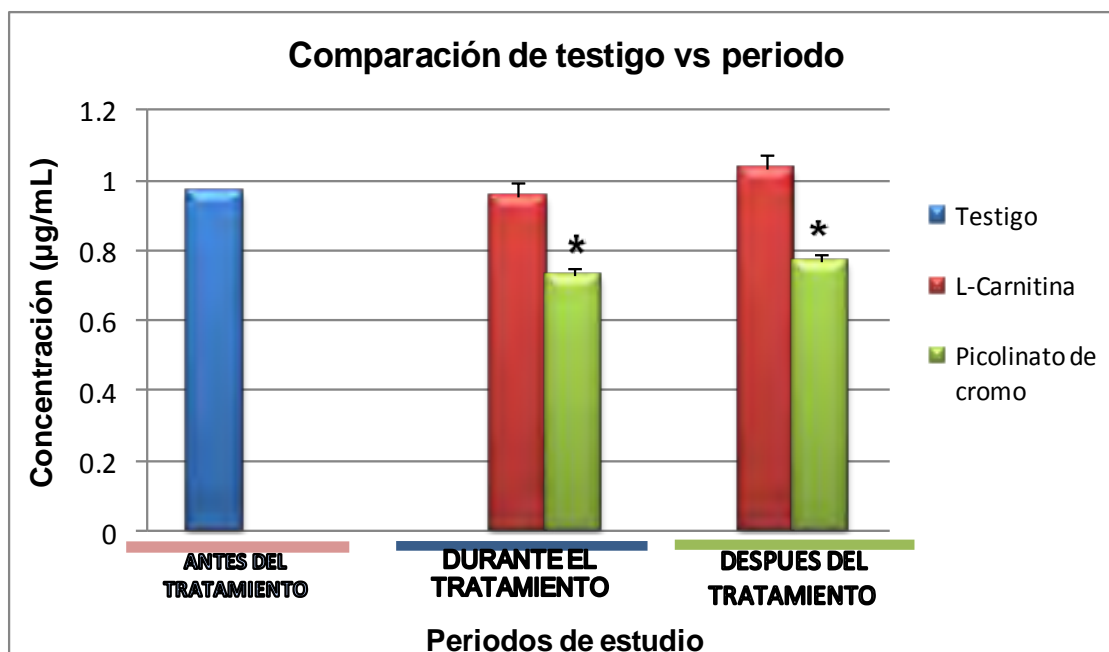


Figura 2. Comparación de los valores testigo con la concentración poblacional de zinc en suero en cada fecha de estudio para ambos grupos.

En la Figura 6 se agruparon los datos de acuerdo a los tres periodos del estudio mediante el uso de la media de medias concerniente a cada periodo de tratamiento de acuerdo al análisis estadístico realizado este indica que existe diferencia significativa entre los valores testigo y los valores de concentración para ambos grupos.



* $\text{Cr}(\text{pic})_3$ $p < 0.05$ vs Testigo

Figura 3. Diagrama de barras de las medias poblacionales de zinc en suero en los periodos de estudio (antes, durante y después del tratamiento), donde se observan las columnas que presentan diferencia significativa.

De igual manera en la Figura 6, se observa que el grupo tratado con picolinato de cromo presenta una disminución en la concentración de zinc, mientras que los voluntarios que ingirieron L-carnitina mostraron un incremento en la concentración del metal en suero, sin embargo no se presenta una recuperación a valores basales que corresponden al inicio del estudio.

2. Contenido de zinc en plasma seminal ($\mu\text{g/mL}$)

Tabla 3. Valores de concentración de zinc en plasma seminal de hombres sanos de 21 a 27 años de un grupo que ingirió L-carnitina (placebo) y otro grupo suplementado con picolinato de cromo.

TIPO DE TRATAMIENTO		VOLUNTARIO	ANTES DEL TRATAMIENTO		DURANTE EL TRATAMIENTO				DESPUÉS DEL TRATAMIENTO	
			07/04/2008	18/04/2008	21/04/2008	28/04/2008	05/05/2008	07/05/2008	12/05/2008	16/05/2008
PLACEBO	L-Carnitina	4	33.60	39.00	37.25	36.65	30.75	31.15	36.40	32.60
		8	36.80	40.05	23.90	36.05	38.15	29.10	22.80	21.90
TRATAMIENTO	Cr(Pic) ₃	3	34.55	34.15	35.70	36.80	36.05	34.00	32.35	38.25
		5	42.35	42.05	42.90	26.55	17.60	16.00	20.90	22.30
		9	45.30	43.30	42.35	40.25	33.25	29.55	26.15	23.85
		10	32.85	34.75	28.85	23.80	27.55	21.35	29.00	32.35
		13	43.75	50.25	46.80	45.90	46.45	45.90	46.25	48.25
		17	42.50	45.40	40.05	37.00	34.90	36.25	39.65	39.25
		18	47.00	44.30	42.90	39.70	33.95	34.10	45.05	46.45
		19	43.10	44.40	40.80	36.30	30.75	15.10	38.30	39.60
		20	42.85	43.60	37.90	43.85	41.00	34.85	42.55	40.55
21	40.90	33.15	30.75	36.30	29.70	39.15	34.40	36.15		

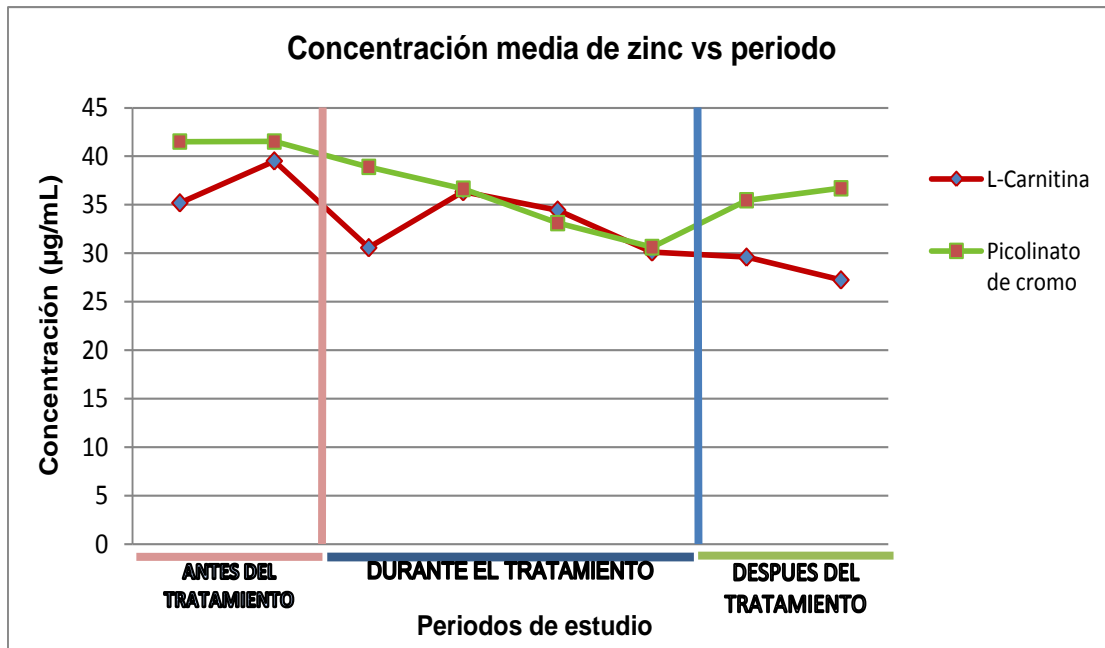


Figura 4. Niveles de concentración promedio de zinc en plasma seminal en los tres periodos del tratamiento con L-carnitina (placebo) para el grupo testigo y los niveles de concentración para el grupo suplementado con picolinato de cromo.

La Figura 7 representa la media de la concentración para zinc en plasma seminal, esta gráfica representa la variabilidad en la concentración de zinc entre el grupo de carnitina y el de picolinato, a diferencia del suero en el plasma seminal la concentración de zinc disminuye para ambos grupos.

Tabla 4. Valores de concentración poblacional de zinc en plasma seminal para ambos grupos, los suplementados con L-carnitina (placebo) y los de picolinato de cromo.

NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE ZINC EN PLASMA SEMINAL ($\mu\text{g/mL}$)							
SIN TRATAMIENTO TESTIGO	TRATAMIENTO CON:	DURANTE EL TRATAMIENTO				DESPUÉS DEL TRATAMIENTO	
40.83 \pm 1.00 n = 24	L-Carnitina n = 2	30.58 \pm 6.67	36.35 \pm 0.30	34.45 \pm 3.70	30.13 \pm 1.02	29.60 \pm 6.80	27.75 \pm 5.35
	Picolinato de cromo n = 10	38.90 \pm 1.79	36.65 \pm 2.18	33.12 \pm 2.45	30.63 \pm 3.20	35.46 \pm 2.66	36.70 \pm 2.69

n = Número de muestra.

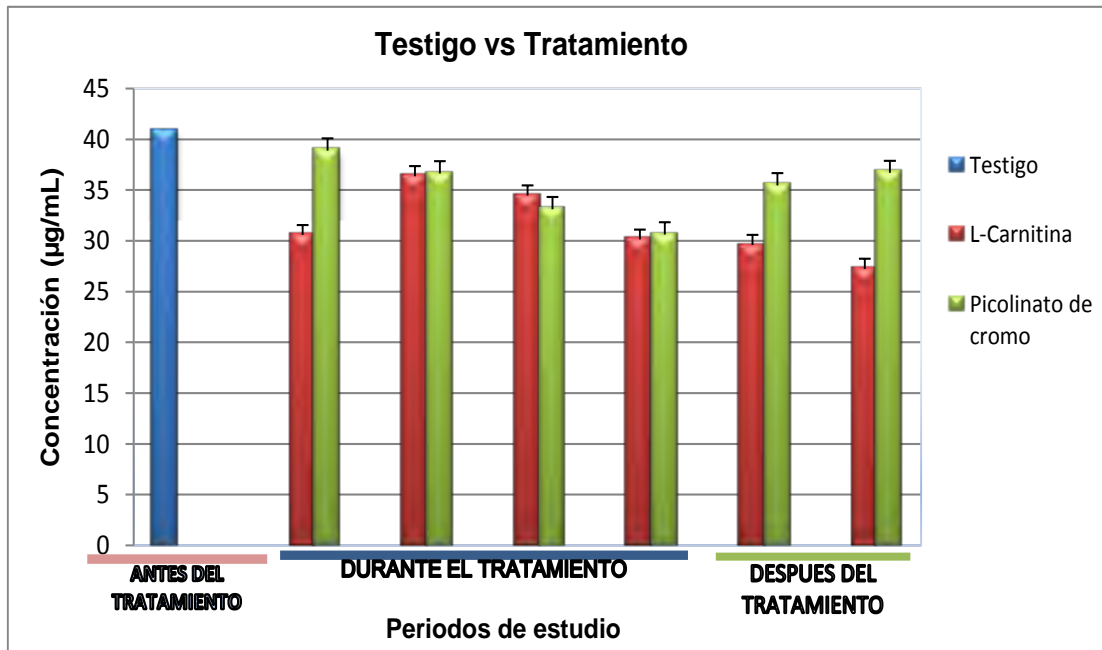
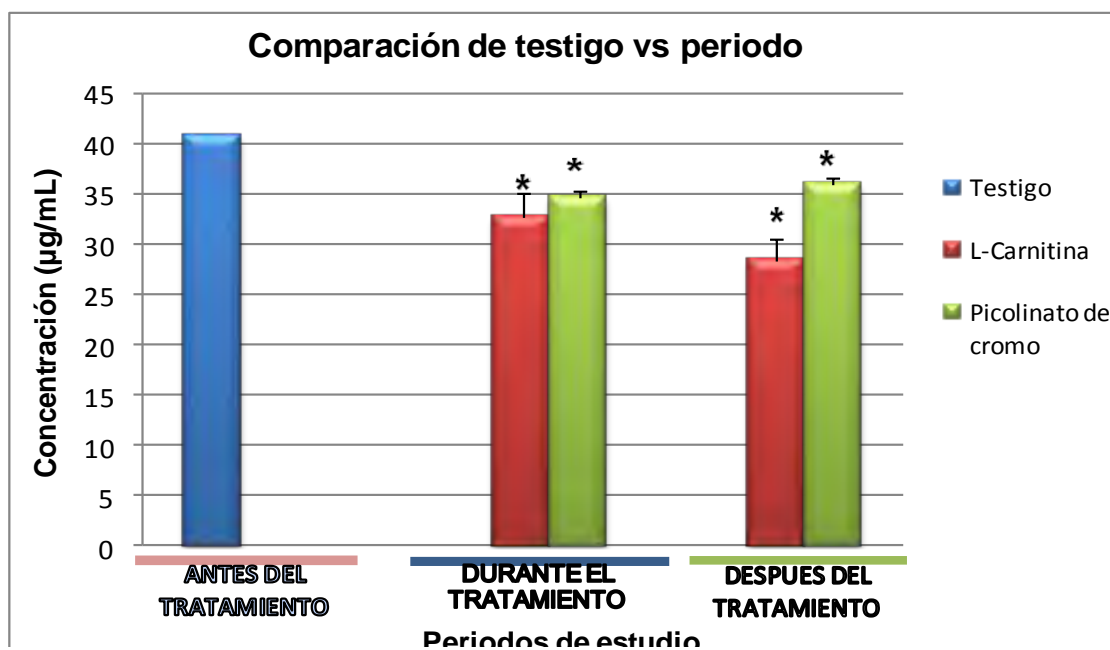


Figura 5. Comparación de los valores testigo con la concentración media de zinc en plasma seminal de cada fecha de estudio para ambos grupos.

En la Figura 8, se muestran los niveles de zinc correspondiente a cada fecha, en la cual se observa que durante el tratamiento se tiene la misma tendencia para ambos grupos, ya que en ambos se presenta una disminución de zinc, sin embargo en el grupo tratado con picolinato de cromo después de suspender el suplemento, se muestra una ligera recuperación, situación que no ocurre en el grupo de L-carnitina.



* $\text{Cr}(\text{pic})_3$ $p < 0.05$ vs Testigo, * L-carnitina $p < 0.05$ vs Testigo

Figura 6. Diagrama de barras de las medias poblacionales de zinc en plasma seminal en los periodos de estudio (antes, durante y después del tratamiento), donde se observan las columnas que presentan diferencia significativa.

En la Figura 9 se evidencia que existe diferencia significativa entre los grupos tratados, durante y después del tratamiento, además en el grupo de picolinato de cromo existe una ligera recuperación en la concentración del zinc, sin embargo, aún hay diferencia significativa entre la media de picolinato y la media de los valores testigo, sin en cambio L-carnitina no presenta recuperación, por el contrario, la concentración de zinc sigue disminuyendo aún cuando el placebo se ha suspendido.

3. Contenido de calcio en suero ($\mu\text{g/mL}$)

Tabla 5. Valores de concentración de calcio en suero de hombres sanos de 21 a 27 años de un grupo que ingirió L-carnitina (placebo) y otro grupo suplementado con picolinato de cromo.

TIPO DE TRATAMIENTO		VOLUNTARIO	ANTES DEL TRATAMIENTO				DURANTE EL TRATAMIENTO							DESPUÉS DEL TRATAMIENTO		
			07/04/2008	11/04/2008	14/04/2008	18/04/2008	21/04/2008	25/04/2008	28/04/2008	02/05/2008	05/05/2008	07/05/2008	09/05/2008	12/05/2008	14/05/2008	16/05/2008
PLACEBO	L-Carnitina	4	86.40	73.50	85.35	84.60	86.25	93.05	82.15	89.45	93.00	83.25	92.90	81.00	89.70	91.90
		8	69.00	102.45	102.75	80.55	80.85	98.45	83.40	90.20	81.90	85.90	87.55	81.30	88.95	101.25
T R A T A M I E N T O	Cr(Pic) ₃	3	78.00	99.75	98.85	76.05	74.55	71.40	71.55	82.55	74.40	71.55	85.05	67.95	73.35	72.00
		5	85.20	80.10	95.25	63.75	54.45	52.25	84.45	81.75	78.90	53.55	70.95	71.70	72.30	69.75
		9	80.52	105.60	106.50	52.95	78.00	72.90	78.30	82.90	89.40	73.50	85.50	60.00	75.60	63.00
		10	80.55	100.50	101.10	103.50	79.65	75.70	76.65	76.95	62.43	73.65	75.00	76.11	95.40	105.99
		13	99.15	100.50	94.20	87.99	77.55	74.95	60.30	71.30	60.50	70.05	80.40	74.70	81.55	82.45
		17	81.60	98.55	97.95	72.00	96.15	93.45	73.65	71.00	71.10	70.95	93.45	72.45	95.55	74.25
		18	77.40	73.05	96.60	79.05	75.45	75.10	101.70	94.50	95.70	68.70	67.05	89.25	90.30	72.15
		19	79.20	97.80	83.10	73.95	73.05	72.10	67.50	65.10	46.05	90.00	85.95	87.00	87.75	85.95
		20	86.55	71.82	82.35	46.05	56.10	82.05	82.20	34.95	61.50	82.20	83.85	78.00	60.60	62.25
		21	89.85	111.00	63.30	60.15	38.85	91.65	61.50	79.20	81.00	45.15	22.51	56.85	75.00	56.25

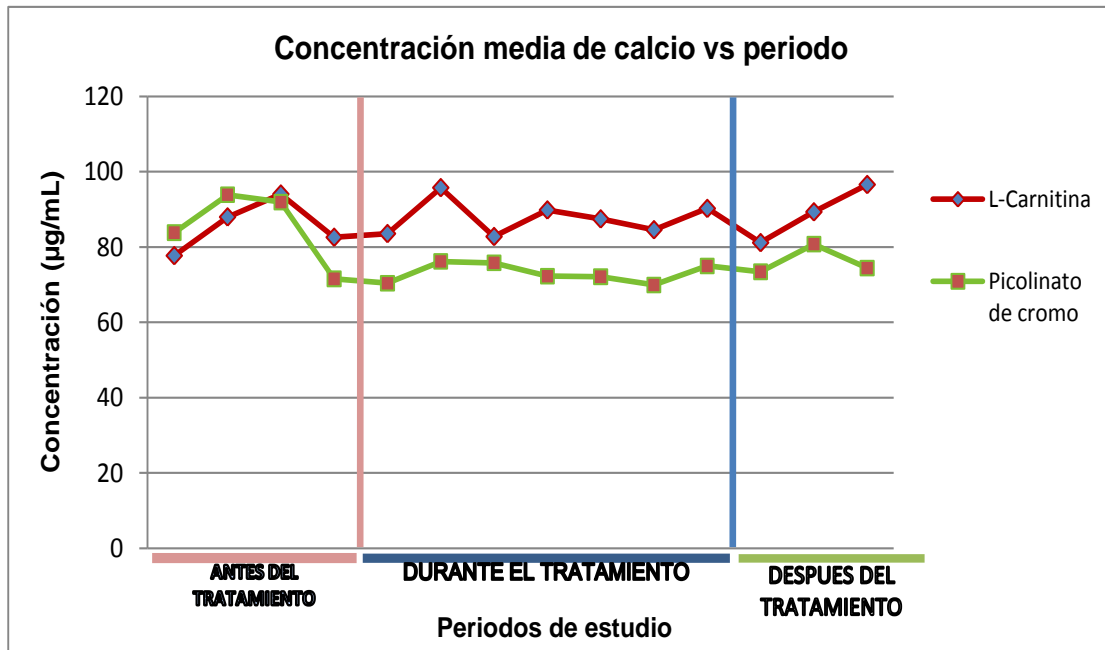


Figura 7. Niveles de concentración promedio de calcio en suero en los tres periodos del tratamiento con L-carnitina (placebo) para el grupo testigo y los niveles de concentración para el grupo suplementado con picolinato de cromo.

En la Figura 10 se observan las concentraciones medias de calcio en suero para cada fecha del estudio, la tendencia de los datos es similar a las encontradas para el zinc en suero, ya que, el placebo (L-carnitina) contribuye al aumento del calcio aún cuando se presenta variabilidad en las concentraciones, del mismo modo en el caso del picolinato de cromo se observa una disminución en la concentración del calcio en suero al igual que en el zinc.

Tabla 6. Valores de concentración poblacional de calcio en suero para ambos grupos, los suplementados con L-carnitina (placebo) y los de picolinato de cromo.

NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE CALCIO EN SUERO ($\mu\text{g}/\text{mL}$)											
SIN TRATAMIENTO TESTIGO	TRATAMIENTO CON:	DURANTE EL TRATAMIENTO							DESPUÉS DEL TRATAMIENTO		
85.33 \pm 2.12 n = 48	L-Carnitina n = 2	83.55 \pm 2.70	95.75 \pm 2.70	82.78 \pm 0.62	89.83 \pm 0.38	87.45 \pm 5.55	84.58 \pm 1.32	90.23 \pm 2.68	81.15 \pm 0.15	89.33 \pm 0.38	96.58 \pm 4.68
	Picolinato de cromo n = 10	70.38 \pm 5.12	76.16 \pm 3.65	75.78 \pm 3.84	72.27 \pm 5.54	72.10 \pm 4.72	69.93 \pm 4.04	74.97 \pm 6.34	73.40 \pm 3.25	80.74 \pm 3.60	74.40 \pm 4.52

n = Número de muestra.

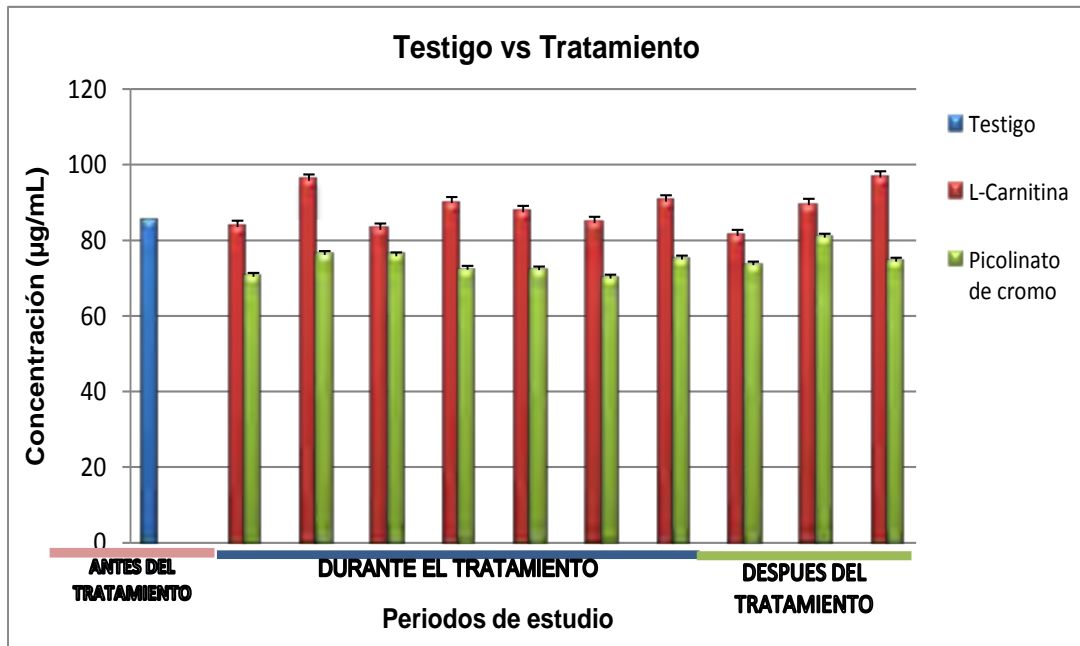
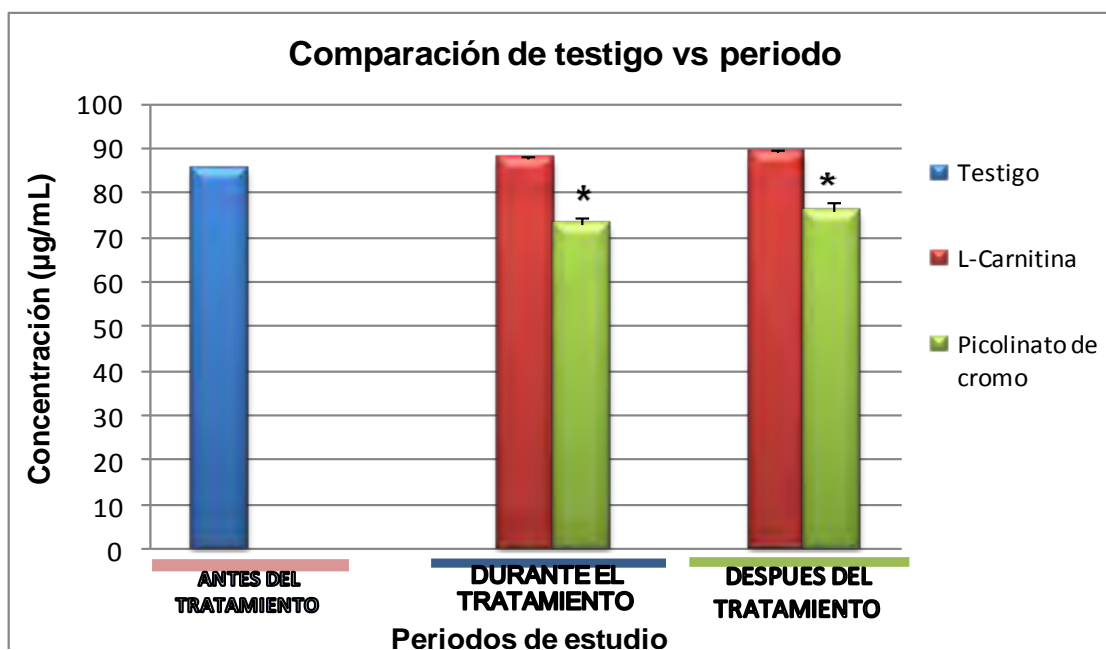


Figura 8. Comparación de los valores testigo con la concentración media poblacional de calcio en suero en cada fecha de estudio para ambos grupos.

De acuerdo al análisis de la Figura 11, se observa la misma tendencia para ambos grupos, ya que en ambos se presenta una disminución, sin embargo en el grupo tratado con picolinato de cromo después de suspender el suplemento, se muestra una ligera recuperación, situación que no ocurre en el grupo de L-carnitina.



* $\text{Cr}(\text{pic})_3$ $p < 0.05$ vs Testigo.

Figura 9. Diagrama de barras de las medias poblacionales de calcio en suero en los periodos de estudio (antes, durante y después del tratamiento), donde se observan las columnas que presentan diferencia significativa.

En la Figura 12 la concentración de calcio en el grupo tratado con L-carnitina tiende a aumentar, aun cuando se suprimio la ingesta del placebo lo que indica que el calcio presenta el mismo comportamiento que el zinc mostrado en la Figura 6, de igual modo el grupo de picolinato presenta diferencia significativa con respecto a los valor control, se muestra un decremento en la concentración del metal durante la ingesta y posteriormente una ligera recuperación cuando se suspende el tratamiento, sin embargo ninguno de los dos metales regresan al estado basal.

4. Contenido de calcio en plasma seminal ($\mu\text{g/mL}$)

Tabla 7. Valores de concentración de calcio en plasma seminal de hombres sanos de 21 a 27 años de un grupo que ingirió L-carnitina (placebo) y otro grupo suplementado con picolinato de cromo.

TIPO DE TRATAMIENTO		VOLUNTARIO	ANTES DEL TRATAMIENTO		DURANTE EL TRATAMIENTO				DESPUÉS DEL TRATAMIENTO	
			07/04/2008	18/04/2008	21/04/2008	28/04/2008	05/05/2008	07/05/2008	12/05/2008	16/05/2008
PLACEBO	L-Carnitina	4	28.05	31.20	28.75	17.75	22.05	25.40	23.70	20.90
		8	25.80	28.85	22.75	19.50	20.85	21.30	21.05	18.25
T R A T A M I E N T O	Cr(Pic) ₃	3	26.20	21.30	22.40	25.15	23.35	23.85	24.10	24.25
		5	21.80	21.05	27.50	16.26	16.15	12.16	17.20	23.40
		9	26.75	21.95	22.35	24.35	18.70	19.25	18.55	15.45
		10	28.60	25.30	21.90	23.60	24.20	19.70	20.30	17.10
		13	34.15	29.80	27.13	25.08	21.28	22.08	24.78	24.98
		17	37.95	27.25	16.95	19.65	16.65	32.05	13.50	26.40
		18	31.50	32.40	27.45	22.50	20.35	17.75	28.75	24.10
		19	29.67	30.30	34.05	20.05	30.30	25.90	21.65	32.60
		20	46.45	40.65	35.85	30.85	26.85	25.80	37.10	39.10
		21	28.40	27.60	26.80	25.30	24.20	20.75	26.30	34.60

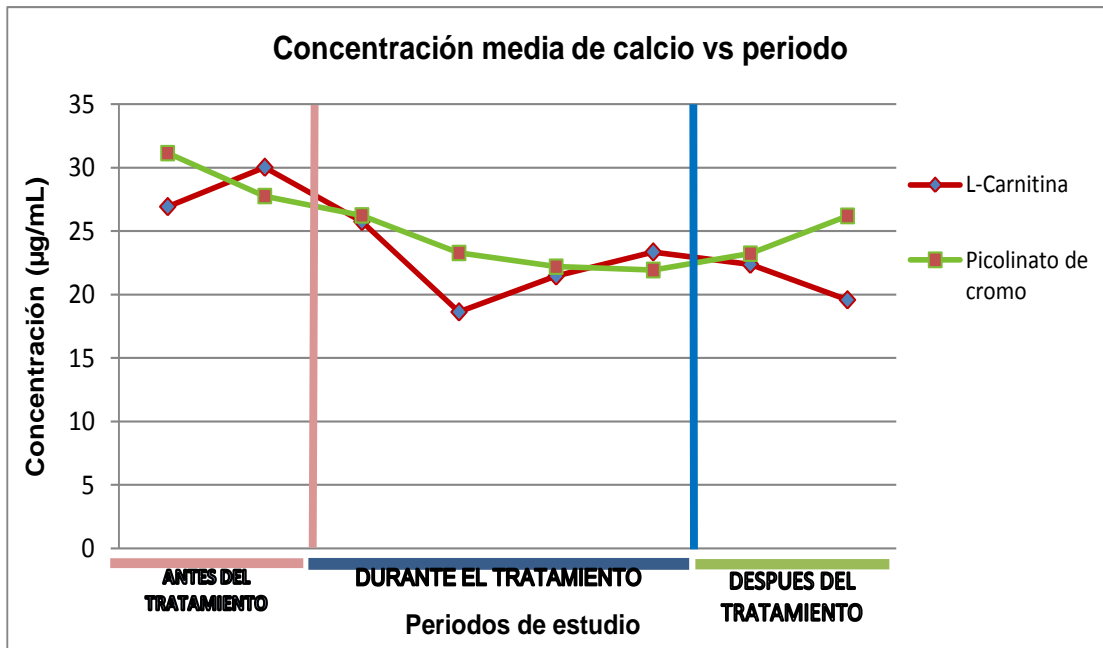


Figura 10. Niveles de concentración de calcio promedio en plasma seminal en los tres periodos del tratamiento con L-carnitina (placebo) para el grupo testigo y los niveles de concentración para el grupo suplementado con picolinato de cromo.

En cuanto a la concentración de calcio en el plasma seminal se presenta una variabilidad importante en el comportamiento del metal en este fluido, la tendencia es similar a la de zinc en el mismo fluido, el calcio presenta diferencia significativa entre ambos grupos de tratamiento y el valor control.

Tabla 8. Valores de concentración poblacional de calcio en plasma seminal para ambos grupos, los suplementados con L-carnitina (placebo) y los de picolinato de cromo.

NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE CALCIO EN PLASMA SEMINAL ($\mu\text{g/mL}$)							
SIN TRATAMIENTO TESTIGO	TRATAMIENTO CON:	DURANTE EL TRATAMIENTO				DESPUÉS DEL TRATAMIENTO	
29.29 \pm 1.34 n = 24	L-Carnitina n = 2	25.75 \pm 3.00	18.63 \pm 0.88	21.45 \pm 0.60	23.35 \pm 2.05	22.38 \pm 1.33	19.58 \pm 1.33
	Picolinato de cromo n = 10	26.24 \pm 1.80	23.28 \pm 1.26	22.20 \pm 1.42	21.93 \pm 1.71	23.22 \pm 2.11	26.20 \pm 2.34

n = Número de muestra.

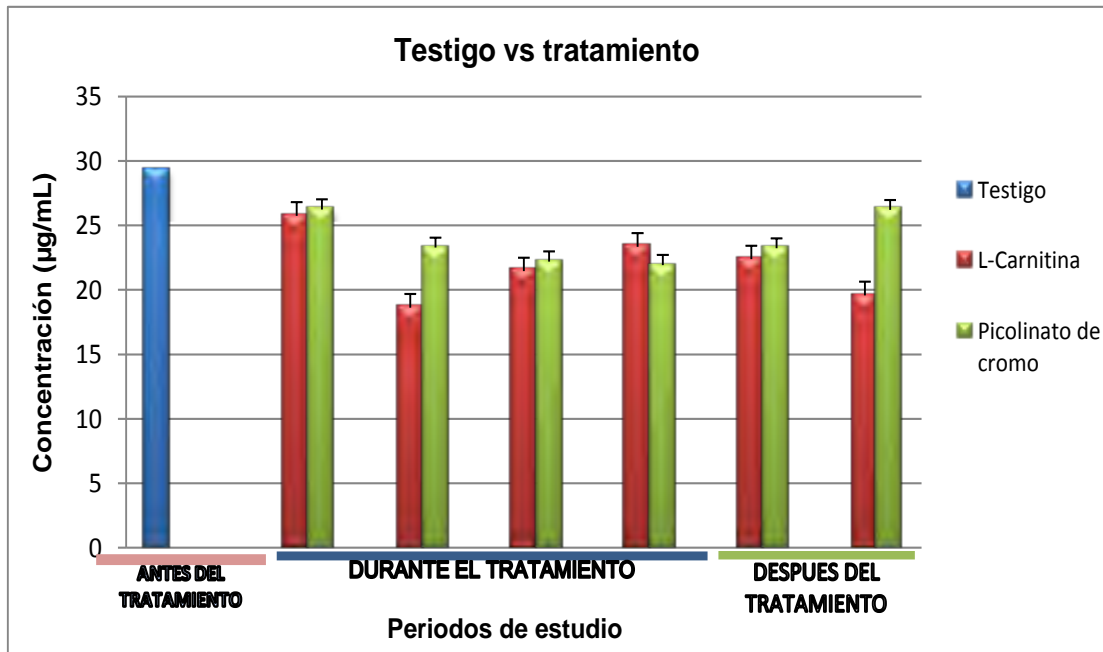
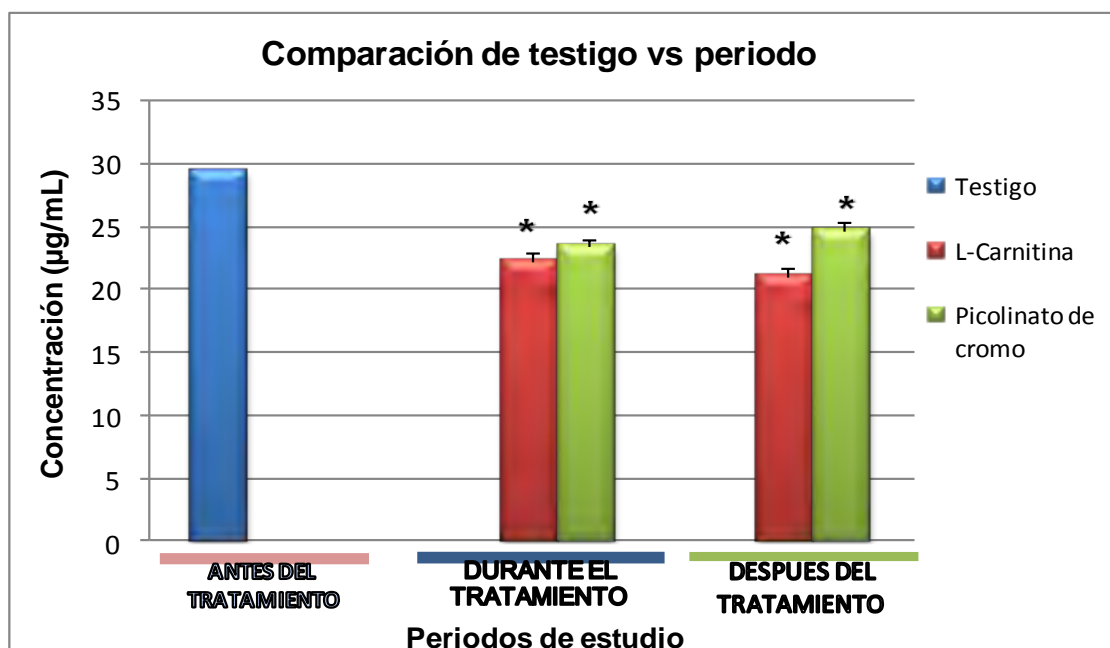


Figura 11. Comparación de los valores testigo con la concentración media poblacional de calcio en plasma seminal para ambos grupos de estudio.

La Figura 14 representa mediante el gráfico de barras la tendencia del calcio en el plasma seminal, en ambos grupos hay disminución de la concentración del metal, el comportamiento del calcio en el plasma seminal es similar al del zinc en este mismo fluido, ambos metales presentan diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados y los valores tomados como testigo (antes de la ingesta).



* $\text{Cr}(\text{pic})_3$ $p < 0.05$ vs Testigo, * L-carnitina $p < 0.05$ vs Testigo

Figura 12. Diagrama de barras de los valores poblacionales de calcio en plasma seminal de los periodos de estudio (antes, durante y después del tratamiento), donde se observan las columnas que presentan diferencia significativa.

De acuerdo al análisis estadístico realizado para los datos de la Tabla 7 los dos grupos presentan diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor testigo, el grupo con L-carnitina presenta una disminución importante de la concentración del metal aún después de suprimir el placebo, en cuanto al grupo con picolinato de cromo se presenta una disminución de calcio durante la ingesta del suplemento con ligera recuperación después de suprimir la administración del suplemento.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La actividad del placebo (L-carnitina) presentó diversos comportamientos ya que aumentó la concentración de zinc y la calcio en suero, en el plasma seminal provocó reducción de la concentración de ambos metales, en un estudio en realizado en 1989 por *Deana R.*, se menciona que es un antioxidante natural del plasma seminal que tiene la función de transportar ácidos grasos poliinsaturados a la mitocondria para generar energía, sin embargo describe que al presentarse una sobreexposición causa alteración en el ciclo del calcio e inhibe la oxidación de los ácidos grasos contribuyendo a la generación de especies reactivas de oxígeno (61, 62, 63).

Con base en lo anterior se establece que existe una relación en la alteración de los niveles de calcio y zinc con respecto a la L-carnitina ya que de acuerdo al estudio publicado por *Rosas Avilene* en 2009 el grupo suministrado con placebo (L-carnitina), presentó modificación en algunos parámetros seminales, con esto se sugiere que existe un exceso de carnitina, ya que además de haberse administrado como suplemento alimenticio es una sustancia producida naturalmente por el organismo, esto pudo contribuir a la sobreexposición provocando la disminución de ambos metales y por lo tanto un efecto sobre los parámetros seminales (61, 64, 65).

En un artículo publicado por *González Muñoz* en 2006., menciona que el uso de picolinato de cromo está basado en su contribución para la disminución de grasa corporal y por mejorar la actividad de la insulina, sin embargo otros estudios sugiere el uso de este suplemento además de no ser significativo en la disminución de la masa corporal provoca posible mutagénesis y carcinogénesis debido a su acumulación en organismo, además de causar daño a la membrana del espermatozoide debido a la excesiva producción de radicales libres (66, 67).

De acuerdo al trabajo publicado por *Quinto Fernando* en 2009, en el cuál se determinó la concentración de cromo en ambos fluidos biológicos en muestras equivalentes, se estableció que existe un rápido incremento en la concentración del metal cromo tanto en suero como en plasma seminal durante la ingesta del picolinato de cromo a lo largo del periodo de tratamiento. Al correlacionar estos

resultados con los obtenidos en el presente trabajo se observa una disminución en la concentración de zinc, por lo que se plantea que esta disminución se debe al aumento en la generación de radicales libres como consecuencia de la acumulación de cromo, por lo tanto se consume mayor cantidad de zinc para producir suficientes enzimas antioxidantes que contrarresten los altos niveles especies reactivas. Con respecto al calcio, este presenta comportamiento similar al zinc. Al concluir el estudio en la fase final al suspender el suplemento (picolinato de cromo o L-carnitina), no se llega a los valores de concentración que tenían los voluntarios al iniciar el estudio en ambos fluidos biológicos, sin embargo al realizar el análisis estadístico entre los datos obtenidos durante la suplementación y durante la suspensión muestran diferencia significativa. Suponemos que de haber sido más prolongada la fase final se hubiera regresado a los valores basales originales (Figura 9 y 15) (68).

El trabajo publicado por *Quinto F.*, menciona que al suprimir la ingesta del suplemento disminuye la concentración de cromo en plasma seminal, presumiblemente como resultado de un proceso de desintoxicación del organismo con tendencia a la normalidad. Al empatar los resultados de la concentración de zinc y calcio en plasma seminal y suero del presente estudio al finalizar la suplementación con los resultados obtenidos para la concentración de cromo en estos fluidos biológicos obtenidos por *Quinto F.* en la misma fase, se observa una relación inversamente proporcional entre la concentración de zinc y calcio con respecto a cromo. Al disminuir el cromo en ambos fluidos aumenta la concentración de calcio y zinc, manifestándose así la relación existente entre estos metales (68).

Haciendo referencia nuevamente al trabajo publicado por *Rosas* en el 2009, en el cuál se trabajaron muestras equivalentes, se demostró que el uso del picolinato de cromo afecta drásticamente los parámetros seminales como movilidad la cual disminuyó hasta un 50%, la morfología espermática se alteró presentando defectos de cabeza, pieza media y cola, así como, la reducción en la cantidad de espermatozoides vivos, esto puede deberse a la disminución de zinc ya que diversos autores mencionan que este metal es indispensable para la morfología así como para la motilidad, ya que forma parte de las fibras densas externas, estructuras que se encuentran en el flagelo y que le confieren cierto grado de rigidez a esta parte del espermatozoide favoreciendo su motilidad (65, 69).

En un estudio experimental en semen de búfalos se encontró que la concentración de espermatozoides, espermatozoides vivos y motilidad espermática fue estadísticamente significativa en grupos suplementados con zinc comparados con el grupo control. En otro estudio, el riesgo de astenozoospermia incrementa significativamente cuando los niveles de zinc disminuyen. En un caso de estudio control, en el que se incluyeron 50 infértiles oligospermicos y 25 hombres saludables se encontró que los niveles de zinc en suero y semen fueron menores en el grupo de infértiles en contraste con los controles sanos. Estos hallazgos indican que la disminución de la concentración de zinc fue perjudicial para los parámetros seminales (70).

Con respecto al calcio, en un estudio realizado en *Chlamydomonas*, se encontró que el calcio regula la motilidad flagelar a través de la regulación de la dineína impulsada por deslizamiento de los microtúbulos. Hay pruebas convincentes que el calcio trabaja a través de la calmodulina para influir en la capacitación, la reacción acrosómica, y motilidad del espermatozoide en mamíferos. Otros estudios han identificado una relación entre la calmodulina y la regulación de calcio en los espermatozoides, por lo cual se puede mencionar que si disminuye la cantidad de calcio presente en el plasma seminal, como se representa en las Figura 15 en la cual se muestra que con la ingesta de picolinato de cromo disminuye la concentración de calcio en plasma seminal lo que afectó la calidad espermática como se describió en el estudio publicado por *Rosas A.* (65, 71).

Por otra parte hay diversos factores que pueden afectar la concentración de ambos metales en el organismo, no solo por el exceso de cromo, sino también por el ácido picolinico que forma parte de la estructura del suplemento suministrado, ya que en el artículo publicado por *Ravi N.*, indica que este es un quelante de zinc y calcio lo cual podría reducir la cantidad disponible de estos metales en el organismo (72).

Por otro lado el zinc y el calcio son elementos esenciales para el organismo, ambos metales se encuentran en muchos alimentos tales como leche, yema de huevo, mariscos, carnes rojas y leguminosas, los cuales se ingieren de manera periódica y tomando en cuenta que ningún voluntario se sometió a un régimen alimenticio es posible estipular que la variabilidad poblacional por fecha representada en las gráficas anteriores se debe a la falta de control en la ingesta

de alimentos y al funcionamiento del organismo de cada individuo, sin embargo, cabe señalar que hay correlación entre este estudio y los realizados por *Rosas y Quinto*, en los cuales se demostró que el uso del picolinato de cromo afecta tanto los parámetros seminales como la concentración de cromo y con esto una probable alteración en los niveles no solo de zinc y calcio sino posiblemente de otros nutrientes (7, 65, 68).

La importancia de realizar estudios que ayuden a elucidar posibles efectos tóxicos de algunos suplementos comercializados en la actualidad contribuyen a generar conciencia entre la población del control en el uso de estos, ya que mediante publicidad se hace creer que los suplementos solo poseen propiedades benéficas, sin embargo, en muchas ocasiones causan alteraciones que en la mayoría de los casos no son relacionadas al consumo de estos y por lo tanto no se puede dar un tratamiento adecuado, tal es el caso del picolinato de cromo, que en trabajo realizado por *Rosas A.*, se menciona que no existe diferencia en la actividad de la insulina y que además no contribuye en nada el consumo de grasa, pero si se logra demostrar que se presenta alteración en la calidad espermática, suceso que en la actualidad no es muy conocido y que es necesario tener en cuenta cuando se realice un estudio de fertilidad (65).

IX. CONCLUSIONES

- Mediante el uso de la Técnica de Espectroscopía de Absorción Atómica se logró la cuantificación de zinc y calcio en suero y plasma seminal provenientes de hombres jóvenes sanos.

- En el estudio realizado se encontró que el suplemento de L-carnitina influye sobre la concentración de zinc y calcio, en suero eleva el nivel de ambos, mientras que en el plasma seminal los disminuye, aun después de suprimir la ingesta, por lo cual no se recomienda el uso como placebo.

- El suplemento de picolinato de cromo originó disminución de Zn y Ca en suero y plasma seminal lo cual provocó disminución de los valores control de los parámetros seminales, por lo tanto no se recomienda la ingesta del suplemento.

- El análisis estadístico de los datos obtenidos se encontró que existe diferencia significativa entre la concentración de ambos metales durante y después de la ingesta de picolinato de cromo respecto al valor de las muestras control (concentración de zinc y calcio antes de la ingesta del suplemento).

- Se encontró que una vez que se suspende la administración oral de picolinato de cromo hay una recuperación en los niveles de concentración de Zn y Ca, sin embargo no se logró regresar a los valores control.

X. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

- Se sugiere repetir el estudio en ratas macho en condiciones controladas de alimentación, administración oral de las sustancias involucradas, tiempo de administración para con esto disminuir la probabilidad de errores.

- Debido a que la L-carnitina (placebo) presentó efectos sobre los niveles de concentración de Zn y Ca en suero y plasma seminal, se propone realizar el estudio sin la ingesta de algún suplemento o considerar un tercer grupo al que no se le administre ningún suplemento durante el estudio.

- Considerar la cuantificación de cada sustancia involucrada en el estudio con la finalidad de determinar como influye cada una en los niveles de concentración de zinc y calcio en el suero y plasma seminal y de este modo relacionar su efecto en la calidad espermática.

XI. ANEXOS

1. Cálculos realizados para los parámetros de validación (Linealidad y precisión)

1.1. Linealidad para zinc

LINEALIDAD DE ZINC		
Muestra	X ($\mu\text{g/mL}$)	Y (absorbancia)
1	0.5	0.100
2	0.5	0.100
3	0.5	0.100
4	1.0	0.153
5	1.0	0.151
6	1.0	0.154
7	2.0	0.259
8	2.0	0.260
9	2.0	0.262
10	3.0	0.347
11	3.0	0.346
12	3.0	0.346
13	4.0	0.415
14	4.0	0.417
15	4.0	0.415

Pendiente	b_1	0.0907
Ordenada al origen	b_0	0.0652
Coef. de det	r^2	0.9917
IC(β_1)		0.0857 - 0.0957

1.2. Precisión para zinc

PRECISIÓN DE ZINC	
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia
2.0	0.259
2.0	0.260
2.0	0.262
2.0	0.259
2.0	0.261
2.0	0.262

Media	0.2605
Desviación estándar	0.0014
C.V	0.5291

1.3. Linealidad para calcio

LINEALIDAD DE CALCIO		
Muestra	X($\mu\text{g/mL}$)	Y (absorbancia)
1	0.5	0.082
2	0.5	0.082
3	0.5	0.082
4	1.0	0.132
5	1.0	0.131
6	1.0	0.132
7	2.0	0.212
8	2.0	0.213
9	2.0	0.212
10	3.0	0.280
11	3.0	0.280
12	3.0	0.279
13	4.0	0.337
14	4.0	0.337
15	4.0	0.337

Pendiente	b_1	0.0725
Ordenada al origen	b_0	0.0562
Coef. de det	r^2	0.9917
IC(β_1)		0.0685 - 0.0765

1.4. Precisión para calcio

PRECISIÓN DE CALCIO	
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia
2	0.212
2	0.213
2	0.212
2	0.213
2	0.214
2	0.213

Media	0.213
Desviación estándar.	0.00075
C.V	0.3537

1.5. Criterios de aceptación para linealidad y precisión del sistema

PARÁMETRO	VALOR EXPERIMENTAL		CRITERIO DE ACEPTACIÓN
PRECISIÓN DEL SISTEMA			$CV \leq 3\%$
Zinc	CV= 0.5291%		
Calcio	CV= 0.3536%		
LINEALIDAD DEL SISTEMA			$r^2 \geq 0.98$ IC(β_1) No debe incluir el 0
Zinc	$r^2 = 0.9917$		
	ICI(β_1) = 0.0857	ICS(β_1) = 0.0956	
Calcio	$r^2 = 0.9916$		
	ICI(β_1) = 0.0685	ICS(β_1) = 0.0765	

2. Formulas empleadas para la validación

2.1. Precisión del sistema

Media aritmética

$$\hat{y} = \frac{\Sigma y}{n}$$

Desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{s}{\hat{y}} * 100$$

$$\Sigma y = x_1 + x_2 + \dots + x_n$$

2.2. Linealidad del sistema

Pendiente

$$b^1 = \frac{n \Sigma xy - \Sigma x \Sigma y}{n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}$$

Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\Sigma y - b_1 \Sigma x}{n}$$

Coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y))^2}{(n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2)(n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2)}$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}}}$$

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{\Sigma y^2 - b_1 \Sigma xy - b_0 \Sigma y}{n-2}}$$

XII. REFERENCIAS

1. Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews* 1993;73(1):79-118.
2. Chia Sin-Eng, Ong Choon-Nam , Chua Lay-Ha, Ho Lee-Mee, and Tay Sun-Kuie. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *Journal of Andrology*. 2000;21(1):53-7.
3. Henkel R, Bittner J, Weber R, Huther Friedrich, Miska Werner. Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. *Fertility and Sterility* 1999;71(6):1138-43.
4. Henkel R, Baldauf C and Schill W-B. Resorption of the element zinc from spermatozoa by the epididymal epithelium. *Reprod Dom Anim* 2003;38:97–101.
5. Marín-Briggiler CI, Jha KN, Chertihin O, Buffone MG, Herr JC, Vazquez-Levin MH, et al. Evidence of the presence of calcium/calmodulin-dependent protein kinase iv in human sperm and its involvement in motility regulation. *Journal of Cell Science* 2005;118(9):2013-22.
6. Environmental Protection Agency. Toxicological review of zinc and compounds. 2005:6-10.
7. Rubio C, González Weller D, Martín-Izquierdo RE, Revert C, Rodríguez I, Hardisson A. El zinc: oligoelemento esencial. *Nutr Hosp* 2007;22(1):101-7.
8. Lewis-Jones DI, Aird IA, Biljan MM, Kingsland CR. Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma. *Human Reproduction* 1996;11(11):2465-67
9. Kaji M. Zinc in endocrinology. *International Pediatrics*. 2001;16:1-7.
10. Ebisch IMW, Thomas CMG, Peters WHM, Braat DDM, Steegers-Theunissen RPM. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Human Reproduction Update*. 2007;13:163-74.

11. Hosseinzadeh CA, Marzony TE, Chaichi JM. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutrition Research* 2009;29:82-8.
12. Tortora GJ, Anagnostakos NP. *Principios de anatomía y fisiología*. 6ª edición. Harla, 1993.
13. Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of Andrology* 2004;25(1):5-18.
14. Gurer-Orhan H, Sabir HU, Ozgunes H. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *toxicology letters*. 2004;195:147-54.
15. Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2004;2:1-7.
16. Li GJ, Zhang LL, Lu L, Wu P, Zheng W. Occupational exposure to welding fume among welders: alterations of manganese, iron, zinc, copper, and lead in body fluids and the oxidative stress status. *Journal Occupational Environment Medical*. 2004;46(3):241-8.
17. Taylor CT. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2001;10:189-98.
18. Shi Xianglin, Dalal NS, Kasprzak KS. Generation of free radicals from hydrogen peroxide and lipid hydroperoxides in the presence of Cr(III). *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993;302:294-9.
19. Agarwal A, Prabakaran SA, and Said TM. Prevention of oxidative stress minireview injury to sperm. *Journal of Andrology* 2005;26(6):654-60
20. Kumar TR, Muralidhara. Induction of oxidative stress by organic hidroperoxides in testis and epididymal sperm of rats *in vivo*. *Journal of Andrology* 2007;28(1):77-85.
21. Sahin K, Smith MO, Onderci M, Sahin N, Gursu MF, Kucuk O. Supplementation of zinc from organic or inorganic source improves performance and antioxidant status of heat-distressed quail. *Poultry Science* 2005;84:882-7.

22. Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: A common factor in testicular dysfunction. *Journal of Andrology* 2008;29(5):488-98.
23. Li Hong, Chen Qiongyu, Li Shien, Yao Wu, Li Linghong, Shi Xianglin, et al. Effect of Cr(VI) exposure on sperm quality: human and animal studies. *Ann occup Hyg.* 2001;45(7):505-11.
24. FAO/WHO. Chapter 11: Calcium.151-71.
25. Perez AV, Picotto G, Carpentieri AR, Rivoira MA, Peralta Lopez ME, Tolosa de Talamoni NG. Minireview on regulation of intestinal calcium absorption. *Digestion.* 2008;77:22-34.
26. Mahan K, Escote S. *Nutrición y dietoterapia de Krause.* 1996 [cited].
27. Fraire-Zamora JJ, González-Martínez MT. Effect of intracellular pH on depolarization-evoked calcium influx in human sperm. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287:1688-96.
28. Goodwin LO, Leeds NB, Guzowski D, Hurley IR, Pergolizzi RG, Benoff S. Identification of structural elements of the testis-specific voltage dependent calcium channel that potentially regulate its biophysical properties. *Molecular Human Reproduction* 1999;5(4):311-22.
29. Darszon A, Nishigaki T, Wood C, Treviño CL, Felix R, Beltrán C. Calcium channels and Ca^{2+} fluctuations in sperm physiology. *International Review of Cytology* 2005;243:79-172.
30. Schuh K, Cartwright EJ, Jankevics E, Bundschu K, Liebermann J, Williams JC, et al. Plasma membrane Ca^{2+} ATPase is required for sperm motility and male fertility. *The Journal of Biological Chemistry* 2004;279(27):28220–6.
31. Kumosani TA, Elshal MF, Al-Jonaid AA, Abduljabar HS. The influence of smoking on semen quality, seminal microelements and Ca^{2+} -ATPase activity among infertile and fertile men. *Clinical Biochemistry.* 2008;41:1199-203.
32. Zhang D, Gopalakrishnan M. Sperm ion channels: molecular targets for the next generation of contraceptive medicines?. *Journal of Andrology* 2005;26(6):643-53.

-
33. Marín-Briggiler CI, Gonzalez-EF, Buffone M, Calamera JC, Tezón JG, Vazquez-Levin MH. Calcium requirements for human sperm function in vitro. *Fertility and Sterility*. 2003;79(6):1396-403.
34. Poirot C, Cherruau B. Infertilidad masculina: aspectos clínicos e investigaciones biológicas. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2005;39(2):225-41.
35. Owen DH, Katz DF. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *Journal of Andrology* 2005;26(4):459-69.
36. Folin M, Contiero E, Vaselli GM. Zinc content of normal human serum its correlation with some hematic parameters. *BioMetals* 1994;7:75-9.
37. Bushinsky DA, Monk RD. Calcium. *Lancet* 1998;352:306-311
38. Bronner F, Pansu D. Nutritional aspects of calcium absorption. *Journal of Nutrition* 1999;129:9-12.
39. Environmental Protection Agency. Trivalent chromium. *Toxicological Review*. 1998:1-8.
40. Berner TO, Murphy MM, Slesinski R. Determining the safety of chromium tripicolinate for addition to foods as a nutrient supplement. *Food and Chemical Toxicology* 2004;42:1029-42.
41. Kumar S, Sathwara NG, Gautam AK, Agarwal K, Shah B, Kulkarni PK, et al. Semen quality of industrial workers occupationally exposed to chromium. *Journal of Occupational Health* 2005;47:424-30.
42. Mahmoud AA, Karam SH, Abdel-Wahhab MA. Chromium-picolinate induced ocular changes: Protective Role of Ascorbic Acid. *Toxicology*. 2006;226:143-51.
43. Cefalu WT, Hu FB. Role of chromium in human health and in diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(11):2741-51.
44. Volpe SL, Hui-Wen H, Kanokwan L, I. LI. Effect of chromium supplementation and exercise on body composition, resting metabolic rate and selected biochemical parameters in moderately obese women following an exercise program. *Journal of the American College of Nutrition*. 2001;20(4):293-306.

45. Vincent JB. Mechanisms of chromium action: low-molecular-weight chromium-binding substance. *Journal of the American College of Nutrition* 1999;18(1):6-12.
46. Luigi DL. Supplements and the endocrine system in athletes. *Clin Sports Med*. 2008;27:131-51.
47. Hininger I, Benaraba R, Osman M, Faure H, Roussel AM, Anderson RA. Safety of trivalent chromium complexes: no evidence for DNA damage in human HaCaT keratinocytes. *Free Radical Biology & Medicine* 2007;42:1759-65.
48. Komorowski JR, Greenberg D, Juturu V. Chromium picolinate does not produce chromosome damage. *Toxicology in vitro* 2008;22:819-26.
49. Campbell WW, Beard JL, Joseph LJ, Davey SL, Evans WJ. Chromium picolinate supplementation and resistive training by older men: effects on iron-status and hematologic indexes. *Am J Clin Nutr* 1997;66:944-9.
50. Gámez Alvarado A, Sáenz Blanco R, Morales Mora E. El Cromo como elemento esencial en los humanos. *Rev Costarric Cienc Méd* 2002;23(1):55-68.
51. Lushchak Oleh V, Kubrak Olha I, Torous Ihor M, Nazarchuk Tetyana Y, Storey Kenneth B, Lushchak Volodymyr I. Trivalent chromium induces oxidative stress in goldfish brain. *Chemosphere*. 2009;75:56-62.
52. Hepburn DD, Xiao Jiarong, Bindom S, Vincent JB, O'Donnell J. Nutritional supplement chromium picolinate causes sterility and lethal mutations in *Drosophila melanogaster*. *PNAS*. 2003;100(7):3766-71.
53. Tortolero I, Bellabarba-Arata G, Osuna JA, Gómez R, Regadera J. Estrés oxidativo y función espermática. *Rev Venez Endocrinol Metab* 2005;3(3):12-9.
54. Zayas Alba LE, Benítez Monzón G, Yáñez Peláez LA, Quintero Pérez Y. Papel del estrés oxidativo en la infertilidad masculina. *Rev Cubana Invest Biomed* 2000;19(3):205-5.
55. Sugiyama M. Role of cellular antioxidants in metal-induced damage. *Cell Biology and Toxicology* 1994;10:1-22.
56. Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 2005;12:1161-1208.

-
57. Lagalante AF. Atomic Absorption Spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews*. 1999;34(3):173-89.
58. Perkin Elmer Inc. Guide to inorganic analysis. In press 2004.
59. Robinson JW. Atomic spectroscopy. 2 ed. E.U.A.: Marcel Dekker, Inc.; 1996.
60. Skoog DA, Holler J, Crouch SR. Fundamentos de química analítica. 8 ed. México, D.F: Thomson Editores S.A de C.V; 2005.
61. Deana R, Rigoni F, Francesconi M, Cavallini L, Arslan P, Siliprandi N. Effect of L-carnitine and L-aminocarnitine on calcium transport, motility, and enzyme release from ejaculated bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction* 1989;41:949-55.
62. Neuman S.L, Lin T. L, Hester PY. The effect of dietary carnitine on semen traits of white leghorn roosters. *Poultry Science* 2002;81:495-503.
63. Kobayashi D, Tamai I, Sai Y, Yoshida K, Wakayama T, Kido Y, et al. Transport of carnitine and acetylcarnitine by carnitine/organic cation transporter (OCTN) 2 and OCTN3 into epididymal spermatozoa. *Reproduction* 2007;134:651-8.
64. Sarica S, Corduk M, Cedden F, Yildirim M, Kilinc K. The effects of dietary L-carnitine supplementation on semen traits, reproductive parameters, and testicular histology of japanese quail breeders. *J. Appl.Poult.Res* 2007;16:178-86
65. Rosas Fuentes A. Efecto del picolinato de cromo en parámetros seminales y en las concentraciones de glucosa e insulina [tesis].México:UNAM;2009.
66. González Muñoz MJ, Meseguer I, Martínez Para MC, Aguilar V, Bernao A. Repercusiones del picolinato de cromo en el metabolismo proteico en función de la edad. *Nutrición Hospitalaria* 2006;21(6):709-14.
67. Aydemir B, Onaran Ilhan, Kiziler Ali R, Alici B, Akyolcu Mehmet C. The influence of oxidative damage on viscosity of seminal fluid in infertile men. *Journal of Andrology* 2008;29(1):41-6.
68. Quinto Vilchis F. Pruebas de desempeño para la cuantificación de cromo en semen y suero por Espectrofotometría de Absorción Atómica Electrotérmica con corrector Zeeman (ZGFAA) [tesis] .México:UNAM;2009.

69. Elzanaty S, Malm J. Effects of ejaculation-to-analysis delay on levels of markers of epididymal and accessory sex gland functions and sperm motility. *Journal of Andrology* 2007;28(6):847-52.

70. Li Yuyan, Wu Junqing, Yuan Wei, Zhou Weijin, Gao Ersheng. Are serum zinc and copper levels related to semen quality?. *Fertility and Sterility* 2008;89(4):1008-11.

71. Turner RM. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility?. *Journal of Andrology* 2003;24(6):790-803.

72. Ravi N, Ravi A, Hamilton P. Quantitative structure toxicity relationship of picolinic acid analogs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:E-Abstract 460.