



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**EFFECTO DE LA INGESTA DE PICOLINATO DE
CROMO SOBRE LA PROPORCIÓN DE CÉLULAS
DE LA LÍNEA GERMINAL EN SUS DIFERENTES
ESTADÍOS EN EL RATÓN MACHO ADULTO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

ARTURO ALEJANDRO NIETO MENDOZA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO



Ciudad de México

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**EFFECTO DE LA INGESTA DE PICOLINATO DE CROMO SOBRE LA
PROPORCIÓN DE CÉLULAS DE LA LÍNEA GERMINAL EN SUS
DIFERENTES ESTADÍOS EN EL RATÓN MACHO ADULTO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

ARTURO ALEJANDRO NIETO MENDOZA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO



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



Universidad Nacional
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que el alumno NIETO MENDOZA ARTURO ALEJANDRO, con número de cuenta 310146894, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día 30 de septiembre de 2019 a las 13:00 hrs., para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. LETICIA MORALES LEDESMA

VOCAL Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

SECRETARIO M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

SUPLENTE M. en C. CARLOS CAMILO SILVA MÉNDEZ

SUPLENTE Dra. ELIZABETH VIEYRA VALDEZ

El título de la tesis que presenta es: Efecto de la ingesta de picolinato de cromo sobre la proporción de células de la línea germinal en sus diferentes estadios en el ratón macho adulto.

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad de México, a 25 de septiembre de 2019

DR. VICENTE JESUS HERNANDEZ ABAD

DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCION

Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ
JEFE DE CARRERA

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, Mi *alma máter*, por permitirme formar parte de ella, por darme las herramientas, enseñanzas y conocimientos suficientes para poder llegar hasta este punto, poder ir por más y dejar en alto su nombre.

A la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**, por permitirme estudiar en sus aulas una de las profesiones más apasionantes como lo es la biología, por brindarme las enseñanzas y también los mejores amigos.

A **Escuela Nacional Preparatoria 6** por ser la primera en recibirme en nombre de mi amada universidad y brindarme a la vez los mejores momentos con amigos y uno de los tropiezos más grandes, que a su vez se convirtió en una de las lecciones más fuertes en mi vida.

A la **Dra. Patricia rosas Saucedo**, con gran gratitud, por sus enseñanzas, sus regaños y sobre todo su paciencia, gracias por permitirme trabajar bajo su dirección y por haberme brindado una pequeña parte de su conocimiento. También por ser parte del reto más importante de todo estudiante de licenciatura, la titulación. Con mucho cariño y admiración.

A los miembros del jurado:

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dra. Patricia Rosas Saucedo

M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez

M. en C. Carlos Camilo Silva Méndez

Dra. Elizabeth Vieyra Valdez

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

A la MVZ. Adriana Altamirano y al MVZ. Román Hernández, así como al personal técnico del bioterio de la FES-Zaragoza por el mantenimiento y cuidado brindado a los animales utilizados en este proyecto.

Al laboratorio 7 de la UMIEZ, donde por 3 años conviví con personas que disfrutaban su trabajo y que están comprometidas con su labor de enseñanza: Dra. Patria Rosas, Dra. Leticia Morales, Dra. Rosa Linares, Dra. Elizabeth Vieyra, Dra. Gabriela Rosas, Dra. Deyra Ramírez y Dra. Azucena Espinoza. Excelentes personas, docentes y con gran amor a la investigación.

Susana, Tania y Juan Carlos: A cada uno de ustedes muchísimas gracias, por su amistad, sus consejos y su apoyo durante su estancia en el laboratorio. En especial Sus, por siempre ser regañona, al final tú lo dijiste, me sirvió.

A la Dra. Rosa Linares Culebro. Gracias por todas sus palabras de apoyo y sus historias, que me motivan a seguir superándome y buscando nuevos retos profesionales para ser una mejor persona, además por acercarme a mi casa tantas veces. Muchas gracias.

Al Biol. José Luis Guzmán Santiago, a la Biol. Ilse Deneb Pérez Castañeda y al M. en C. Carlos camilo Silva Méndez por su apoyo fundamental para el desarrollo de la estadística.

A la Biol. Yolanda Cortés Altamirano, a la Dra. Bertha Peña Mendoza, al Dr. José Luis Gómez Márquez y a la Lic. Yvonne Arriaga López, por su invaluable apoyo durante los trámites administrativos referentes al examen.

A los profesores que fueron un modelo a seguir durante la carrera, por sus grandes conocimientos, por su humildad, su dedicación y por sus sabios consejos.

Dr. Carlos Castillejos Cruz

Biol. Elvia García Santos

Dra. Patricia Rivera García

Dra. Leticia Morales Ledesma

M. en C. María Magdalena Ayala

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dra. Dolores Escorza Carranza

Dra. Rosa Linares Culebro

Biól. José Luis Guzmán Santiago

Dra. Adriana Gutiérrez Hoya

A los animales de laboratorio, que sin ellos nada de esto hubiera sido posible.



Monumento al ratón de laboratorio, Instituto de Citología y Genética, Novosibirsk, Rusia.

DEDICATORIAS

A mi familia: Quienes han sido los que a lo largo de mi vida han sido testigos de mis descalabros, y más importante aún, participes de cada uno de mis logros, hoy en este día este momento es tan mío como de ustedes.

A mi madre: Gracias por permitirme llegar a este momento, por todo ese esfuerzo y largas jornadas de trabajo que hoy se ven reflejadas en este momento, el cual también es tuyo. Te amo.

A mi abuelita: Por ser un ejemplo de trabajo duro y de disciplina, gracias por tu esfuerzo, porque sin tu apoyo este momento no sería posible, gracias, por tanto, espero que el llegar a este momento sea un motivo de orgullo para ti. Te amo.

Tía Rosa: Gracias por tus regaños, por tu apoyo moral y económico, este logro también es tuyo.

A mi hermana por las risas y peleas; a mis primos, especialmente Carlos Daniel, por su apoyo y consejos.

Por todos aquellos que formaron parte de este logro y que hoy no están:

Tío Ángel: Por ser como un padre y darme lo mejor de ti, por enseñarme a usar las herramientas de trabajo. Donde quiera que estés mi más sincero agradecimiento, hoy gracias a tus enseñanzas he llegado a una de mis metas de vida. Con mucho cariño tu recuerdo sigue presente.

Tío Rafael: En sincero agradecimiento por tu apoyo a lo largo de mi etapa de estudiante.

A mis amigos:

Ricardo: Amigo, muchas gracias por andar ahí desde la primaria y hoy día, aún frecuentarnos.

Paty, gracias por tantos años de amistad, por tus regaños y tus reportes en la secundaria, hoy es un gusto tener una amistad como la tuya, vamos por muchos años más.

Filiberto, gracias por tu sincera amistad, tu apoyo en álgebra y cálculo y todos esos buenos momentos.

Carla (Carly) Y Melissa (Soberbia): Gracias por su amistad y por todos los momentos compartidos, aunque por las ocupaciones nos veamos poco, ustedes son parte de este logro. A Camila (Prima) Gracias por tu amistad.

Fabián, con quien pasé muchos buenos momentos en su compañía en la bendita prepa, hermano, a pesar de vernos una o dos veces al año es un gusto coincidir y poder platicar en compañía de unos tacos, un café y un cigarrillo.

Alan, por ser el primero que conocí en la FES y que sigue siendo un buen amigo y profesionalista, carnaluki, eres un crack. Wendy, por seguir siendo una gran amiga a pesar de tomar rumbos completamente diferentes.

Itzel, Gaby, Rafa, Carolina, Janeth, Gaby Castro y Mili: Por los buenos momentos que compartimos a lo largo de la carrera.

Axel, Sylvia y Nana: Con ustedes pasé momentos increíbles de trabajo y de diversión, éxito en sus vidas y sigamos con esta linda amistad.

Aline, por demostrar siempre buena actitud todo momento y darle prioridad siempre a lo que uno disfruta.

Mario, por su gran amistad y apoyo, además por ser una gran persona.

Ian, ese mi atunes, gracias por todos esos cigarrillos y platicas durante esos momentos donde todo iba cuesta arriba, gracias por tu apoyo, nunca dejes de ser autentico.

Daniel, por ser un claro ejemplo que el desmadre no está peleado con la responsabilidad y que si te está llevando... pues que te lleve de la mejor forma posible.

Toño, por siempre hacer que todo parezca fácil y nunca desistir de los objetivos.

Ilse, contigo las palabras me faltan, gracias por todo tu apoyo, tus enseñanzas, por siempre ser ejemplo de perseverancia, y de completa dedicación, de siempre dar el 100 y no rendirse a pesar de la adversidad, hoy te puedo decir que tienes mi completa admiración, como amiga, como mujer y como profesional. Gracias por tanto y por estar conmigo en este largo camino.

A Nallely, Fer, Hugo, Beto, Misa, David, Michelle, Maya, Ángel, Marisela y Carolina, porque sin ustedes el laboratorio no hubiera sido una experiencia completa, a todos ustedes muchas gracias, los quiero.

A Universum museo de las ciencias por abrirme sus puertas y permitirme formar parte de su equipo de trabajo, además de conocer amigos y personas increíbles ahí adentro, Alicia, Andy, Ofe, Raúl, Jahaziel, Cinthia, Gis, Geo, Marianne y especialmente a Luisa Nivón, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y demostrar siempre una excelente actitud y calidez humana, eres la mejor.

A mis compañeros de la sala de agua: Ilse, Leo, Sebas, Larissa, Helen, Pao, Paco, Moni, Fer, Alan, Arturo, Hugo, Marco, Andrea y Carmen, por los buenos momentos en su compañía y los aprendizajes que cada uno me ha dejado.

A todos aquellos que no mencione, deseo que tengan siempre éxito en sus vidas.

In memoriam del Biol. Luis Samuel Campos Lince.

“Jamás permitas que mentes pequeñas te convenzan de que tus sueños son demasiado grandes para ti.”
Fernando Valdez.

“En tu vida siempre sé el número uno, con actitud.” Rodrigo Romeh.

“Si caminas solo, llegarás más rápido; si caminas acompañado, llegarás más lejos.” Proverbio chino.

“El carácter de un hombre no debe ser juzgado después de celebrar una victoria, sino con lo que hace cuando está contra el muro. Así que no importa que tan grande sea el obstáculo, o cuán dolorosa sea la falla...nunca te rindas, levántate, sacúdete, continúa, adáptate y supera el obstáculo.”
John Cena.

Índice	Página
Resumen	1
Introducción	3
1. Funciones del testículo	4
- Espermatogénesis	4
- Esteroidogénesis	7
2. Regulación de las funciones del testículo	10
- Eje hipotálamo-hipófisis-testículo	10
3. Fertilidad e infertilidad	11
4. Suplementos alimenticios	12
5. Picolinato de cromo	13
- Cromo	14
- Ácido picolínico	16
- Efectos del picolinato de cromo	18
Planteamiento del problema	21
Hipótesis	21
Objetivo general	21
Objetivos particulares	22
Materiales y Métodos	23
Resultados	32
Discusión	38
Conclusiones	42
Bibliografía	43

Resumen

Comercializado como suplemento alimenticio, el picolinato de cromo (PicCr) ha sido ampliamente promocionado como constructor muscular y agente de pérdida de peso, dirigido mayormente a adultos jóvenes en edad reproductiva. Sin embargo, existen evidencias que ponen en discusión dicha publicidad.

Estudios con diversos modelos biológicos describen al PicCr como mutagénico, clastogénico, citotóxico, fetotóxico e inductor de apoptosis. En el ratón hembra adulto, la ingesta diaria de PicCr disminuye la respuesta ovulatoria y la fertilidad. En el varón, el consumo de este suplemento decrece los parámetros seminales.

Previamente mostramos en el ratón macho adulto, que el tratamiento con PicCr por un ciclo espermático disminuye los parámetros seminales, entre ellos la concentración de espermatozoides. Por ello, en este trabajo se decidió realizar el estudio histológico de los testículos de estos animales, evaluando la proporción de los diferentes tipos celulares de la línea germinal.

Para realizar este estudio utilizamos ratones macho adultos de la cepa CD1, divididos en los siguientes grupos experimentales: a) Testigo, animales sin ningún tratamiento, b) Vehículo (Vh) aceite de maíz, c) 0.12 μg de PicCr (concentración equivalente a la recomendada para consumo humano) y d) 1.2 μg de PicCr (diez veces la concentración equivalente a la recomendada para consumo humano). Los tratamientos se administraron por 35 días (un ciclo espermático).

Se utilizaron los testículos izquierdos de cada grupo experimental. Los órganos se procesaron para su estudio histológico. Se evaluaron 100 túbulos por animal, se midió el diámetro tubular promedio y se cuantificó el número de células de la línea germinal, considerando el estadio del ciclo del epitelio seminífero.

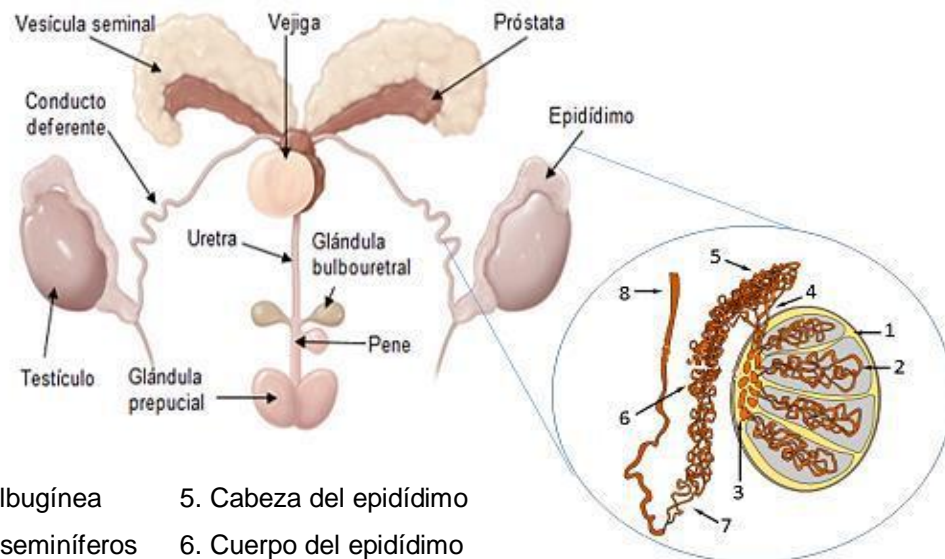
El tratamiento con PicCr no modificó el diámetro tubular. El análisis comparativo de los grupos experimentales por cada tipo celular no mostró diferencias. Sin embargo, en el análisis

por estadios se observó que la proporción de espermatogonias en los animales tratados con PicCr disminuyó entre el 40 y 60% y el de espermatocitos I, II y espermatidas desciende entre el 60 y 80%. La proporción de espermatogonias en el estadio 2 y 8 disminuyó de forma directamente proporcional a la concentración de PicCr y en los espermatocitos I y II esta correlación ocurrió en el estadio 4 y 3 respectivamente. Solo con la concentración de 1.2 µg de PicCr se observó aumento en la proporción de espermatocitos II, lo que podría ser un efecto de compensación de la gónada (hormesis).

Los resultados muestran, en el ratón macho adulto, que la ingesta de PicCr en la dosis similar a la recomendada para consumo humano y diez veces más disminuyen la proporción de espermatogonias y por ende la proporción del resto de las células del epitelio germinal, evento que puede ser el origen de la disminución en la concentración espermática observada previamente en el seminograma de estos ratones.

Introducción

El sistema reproductor del macho se compone de los testículos, los epidídimos, los conductos deferentes, el conducto eyaculador, las glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales, la próstata, las glándulas coagulantes, las glándulas prepuciales y las glándulas bulbouretrales o de Cowper), el pene y la uretra (Urroz, 2000). El aparato reproductor del ratón además incluye a las (Knoblauch y True 2012) (Fig. 1).



- | | |
|------------------------|-------------------------|
| 1. Túnica albugínea | 5. Cabeza del epidídimo |
| 2. Túbulos seminíferos | 6. Cuerpo del epidídimo |
| 3. <i>Rete testis</i> | 7. Cola de epidídimo |
| 4. Conductos eferentes | 8. Conductos deferentes |

Figura 1. Representación esquemática del sistema reproductor del ratón macho (Tomado y modificado de Knoblauch y True, 2012; Chavira, 2017).

La función de las glándulas y los conductos es transportar al exterior a los espermatozoides en el plasma seminal, que funciona como vehículo y medio nutritivo y protector de los gametos. Este está compuesto de minerales, carbohidratos, ácidos orgánicos, lípidos, esteroides, aminoácidos, espermina, glutatión y proteínas (Poirot y Cherruau, 2005), lo que les permitirá alcanzar y fecundar a los gametos femeninos (Drake y col., 2015).

En el ser humano, el sistema reproductor se encuentra distribuido en abdomen, la pelvis y el perineo (Boron y Boulpaep, 2017). En el ratón este sistema se encuentra ubicado entre las regiones umbilical, inguinal y pélvica (Komárek, 2004).

1. Funciones del testículo

Las funciones del testículo son la producción de gametos (espermatogénesis) y la síntesis y liberación de hormonas esteroides (esteroidogénesis) y proteicas (Garthner y Hiatt, 2008).

- **Espermatogénesis**

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual se desarrollan y diferencian los gametos masculinos, partiendo de espermatogonias hasta transformarse en espermatozoides (Bustos Obregón y Díaz, 1999). En el humano este proceso tarda 75 días (Gilbert, 2005) y en el ratón 35 días (Franca y col., 1998) (Fig. 2).

A partir de la pubertad, las células germinales primordiales, que son diploides, se dividen constantemente por mitosis para producir células llamadas espermatogonias (Córdoba y col., 2003; Gilbert, 2005). Las espermatogonias de tipo A, son una población surgida de las células madre espermatogónicas que comienzan a proliferar; una porción de ellas permanece como células troncales. Estas últimas mantienen el número apropiado de espermatogonias durante toda la vida reproductiva del individuo; el resto experimentan un limitado número de divisiones mitóticas (A1-A4 e intermedias), siendo la última división la que da origen a las espermatogonias de tipo B. Estas se mantienen unidas por puentes citoplasmáticos, lo que les permite sincronizarse y llevar procesos divisorios a la vez (McLaren y Southee, 1997; Geneser, 2000; Maeda y col., 2000; Gilbert, 2005) (Fig. 2).

Las células de tipo B que entran en meiosis dan lugar a los espermatocitos primarios (espermatocitogénesis) que al término de la meiosis dan como resultado dos espermatocitos secundarios que se transforman en espermátidas. Este último tipo celular, que en ese momento es una célula redonda sin flagelo, presenta una serie de cambios que culminan con la formación del espermatozoide (espermiogénesis) (McLaren y Southee, 1997; Geneser, 2000; Maeda y col., 2000; Gilbert, 2005) (Fig. 2).

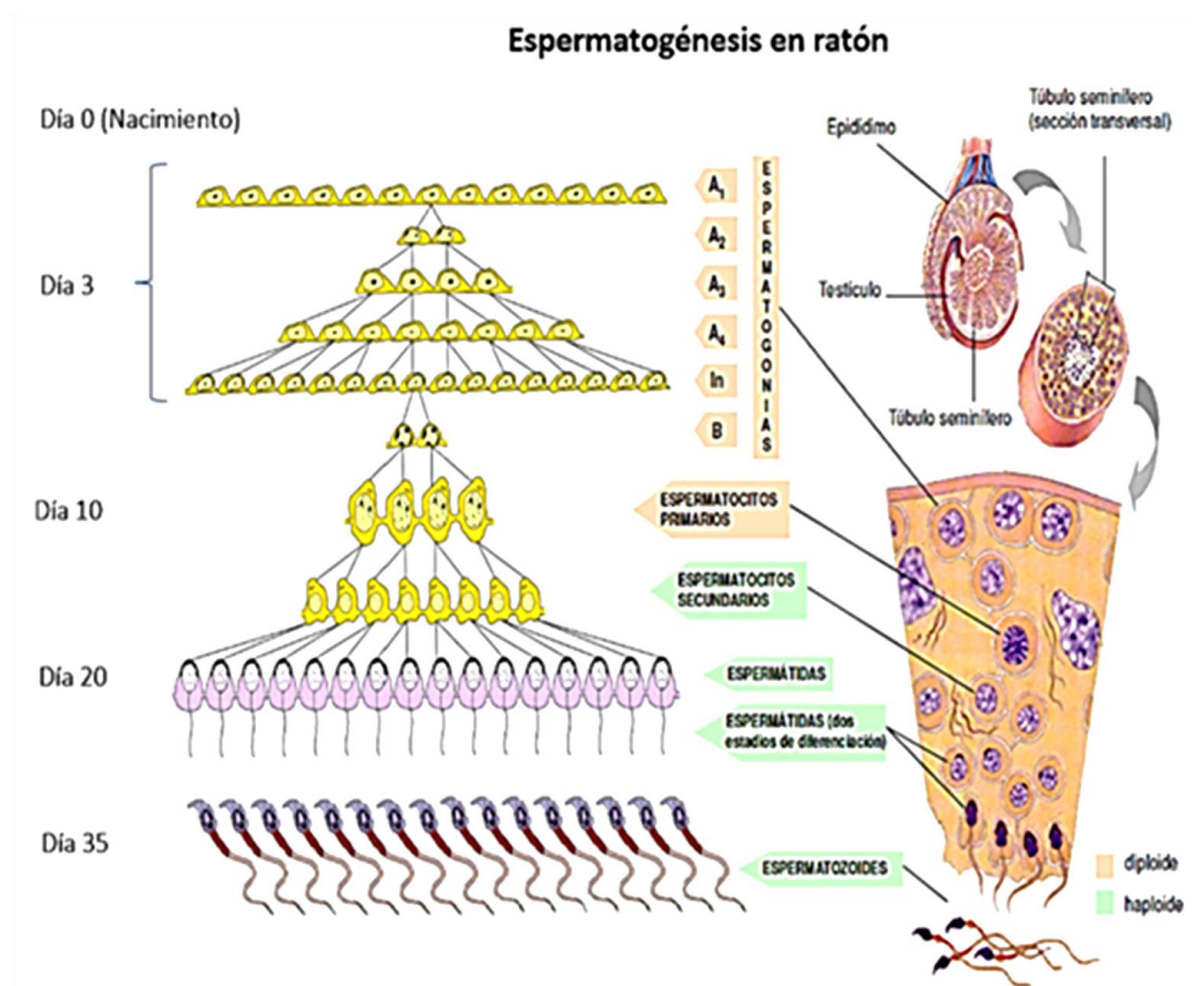


Figura 2. Espermatogénesis de ratón (Tomado de Sans, 2004; Chavira, 2017).

La espermiogénesis se divide en cuatro etapas (Olivera y col., 2006) (Fig. 3):

- **Fase de Golgi:** El aparato de Golgi se acerca al núcleo, desprende vesículas que se superponen y poco a poco se unen para convertirse en la vesícula acrosómica localizada en la parte superior del núcleo. Los centriolos situados en forma de T, muy cercanos al aparato de Golgi, van migrando hacia lo que será la base del núcleo. El centriolo proximal se sitúa en la parte inferior del núcleo y, a partir del centriolo distal crece el axonema que está conformado por dos microtúbulos centrales y nueve pares de microtúbulos periféricos.
- **Fase de capuchón:** El acrosoma se aplana formando una capucha sobre el núcleo. Las histonas son sustituidas por protaminas, lo que conduce a una compactación mayor del núcleo, de tal forma que no puede haber replicación ni transcripción.
- **Fase acrosómica:** La espermátida gira de tal forma que el acrosoma queda en dirección de la membrana basal; se posan gránulos en el acrosoma, el citoplasma se desplaza hacia la base de la cabeza y se localiza por debajo de la unión núcleo axonema. Las mitocondrias se asocian alrededor de este último en su parte cercana al núcleo, formando la pieza media. En esta fase el espermatozoide adquiere su morfología definitiva.
- **Fase de maduración:** Aquí se observan las características finales de los espermatozoides, como la forma de la cabeza, que es característica de cada especie, cubierta en dos terceras partes por el acrosoma. El flagelo, compuesto por las piezas media, principal y final. En la pieza media se encuentran las mitocondrias en forma de hélice. En esta fase se elimina gran parte del citoplasma por desplazamiento del mismo hacia la pieza terminal del flagelo, originando la llamada gota citoplasmática. El proceso de maduración termina con la espermiación, que es la separación de los espermatozoides de las células de Sertoli y su liberación a la luz del túbulo seminífero. De ahí pasan a la *rete testis* y mediante movimientos peristálticos los espermatozoides son transportados hacia los conductos eferentes y posteriormente al epidídimo, donde son almacenados en la cola del mismo (Fig. 1).

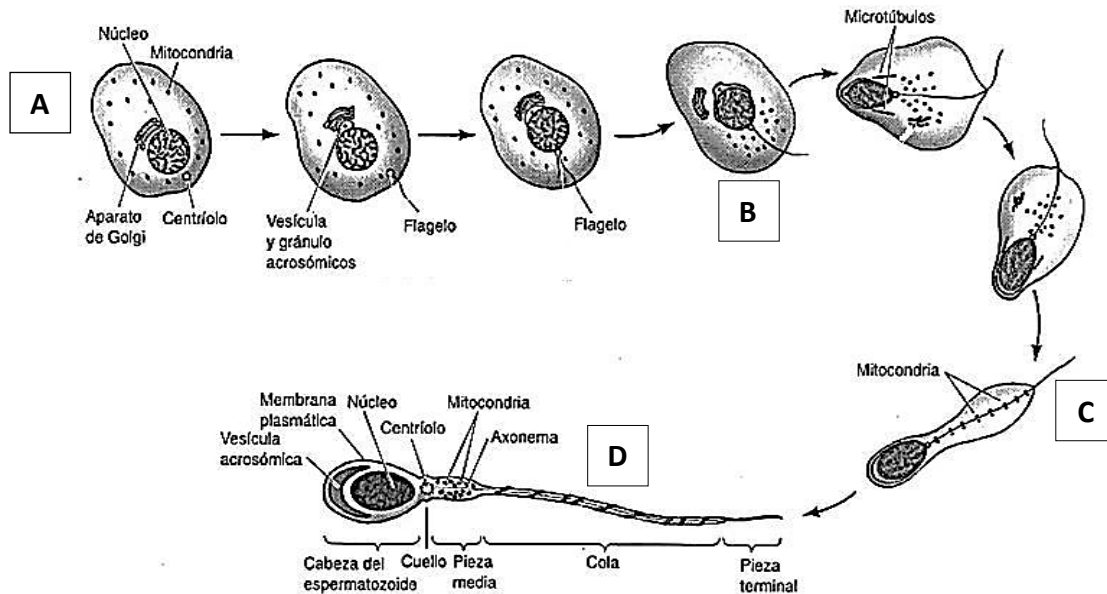


Figura 3. Esquema que muestra las fases de la espermiogénesis. A) Fase de Golgi, B) Fase de capuchón, C) Fase acrosómica y D) Fase de maduración (Tomado y modificado de biologiajسد.blogspot.com/2011/11/espermiogenesis.html).

• Esteroidogénesis

La esteroidogénesis es el conjunto de reacciones metabólicas en la síntesis de las hormonas esteroideas (Casabiell, 2006), que derivan del colesterol y contienen el mismo anillo de ciclopentanofenantreno (Auchus, 2015).

El colesterol se obtiene por tres vías, el que se genera en el retículo endoplásmico a partir de acetil-CoA, el sintetizado *de novo* a partir de los ésteres de colesterol y el que proviene de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Este último debe estar libre de ácidos grasos, lo que es posible gracias a la acción de la enzima colesterol esterasa que separa ambos componentes en el intestino (Tresguerres, 2006; Gómez-Chang y col., 2012).

La esteroidogénesis en las gónadas implica el transporte del colesterol del citoplasma a la mitocondria, evento que depende de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) que es una fosfoproteína dependiente de AMPc y que regula la translocación intra

mitocondrial del colesterol, siendo este el paso limitante en la biosíntesis de las hormonas esteroides (Tresguerres, 2006).

En la membrana interna de la mitocondria se encuentra la enzima citocromo P450_{scc}/CYP11A1 que escinde la cadena lateral del colesterol y lo convierte en pregnenolona (Kerr y col., 2006; Gómez-Chang y col., 2012).

La pregnenolona es biotransformada siguiendo la ruta $\Delta 5$ o $\Delta 4$. En la primera, la enzima 17 α -hidroxilasa permite el cambio a 17 α -hidroxipregnenolona, esta a su vez es transformada por la enzima 17 α -hidroxilasa en dehidroepiandrosterona (DHEA). Posteriormente la DHEA es convertida en androstenediol por la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) y finalmente la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) lo transforma en testosterona. En el caso de la ruta $\Delta 4$ la pregnenolona es transformada por la 3 β -HSD en progesterona, misma que por efecto de la 17 α -hidroxilasa origina la 17 α -hidroxiprogesteronona que es transformada en androstenediona por medio de la misma enzima. Finalmente, se forma testosterona, por la enzima 17 β -HSD (Gal y col., 2007; Jara y González, 2011). En el roedor la vía predominante en la síntesis de testosterona es la $\Delta 4$ (Gómez-Chang y col., 2012) (Fig. 4).

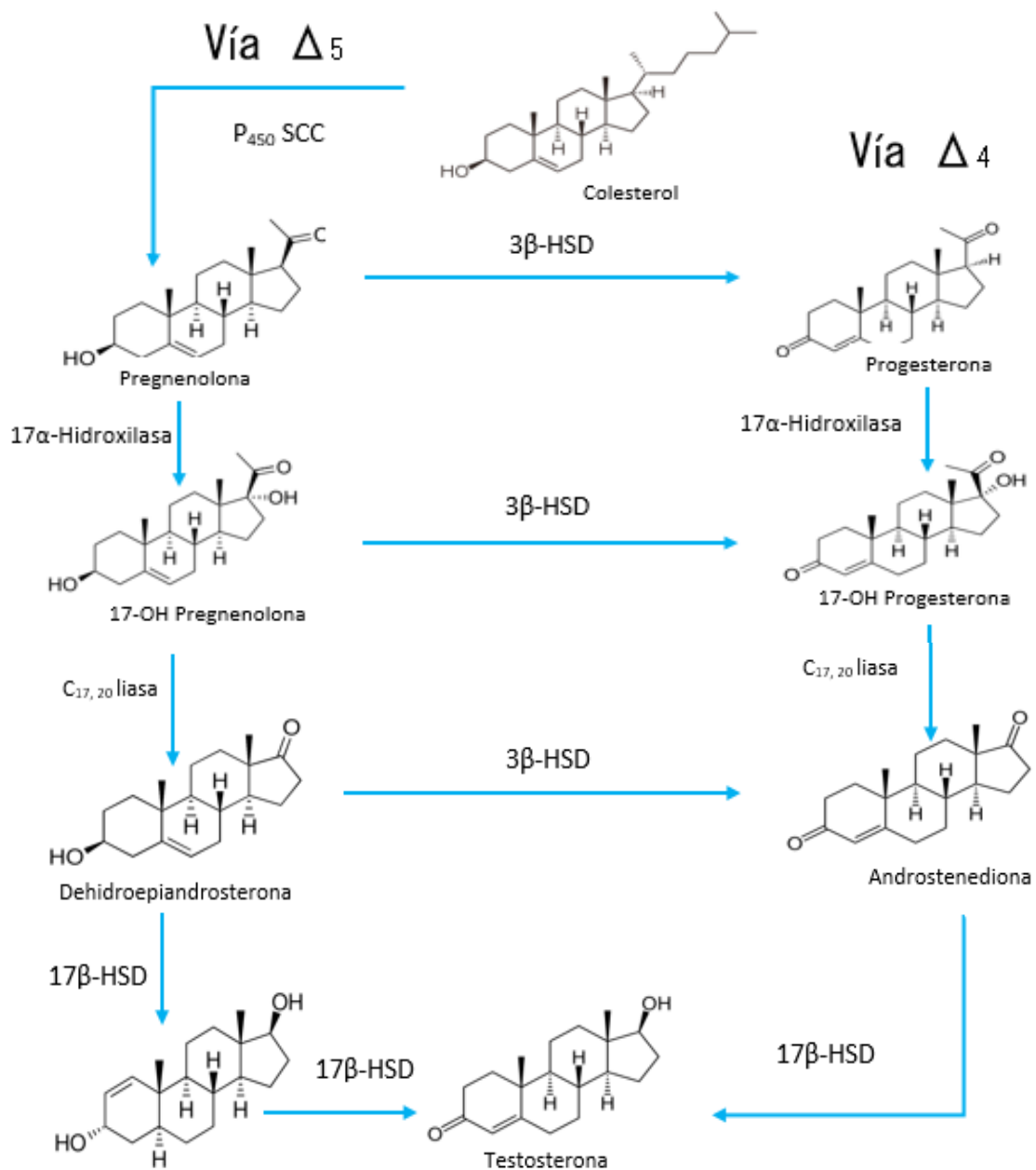


Figura 4. Síntesis de testosterona. Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol ($P_{450\text{ SCC}}$), 3β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa ($3\beta\text{-HSD}$), 17α -Hidroxilasa, 17 -Hidroxipregnenolona ($17\text{-OH Pregnenolona}$), 17β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa ($17\beta\text{-HSD}$) (Tomado y modificado de Tresguerres, 2010).

2. Regulación de las funciones del testículo

- Eje hipotálamo-hipófisis-testículo

La función testicular es regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo. En el hipotálamo se sintetiza la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), que es un decapeptido secretado de manera pulsátil al plexo capilar de la eminencia media y transportado por el sistema porta hipotálamo-hipofisario a la adenohipófisis donde estimula la secreción de la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Hayes y col., 2001) (Fig. 5).

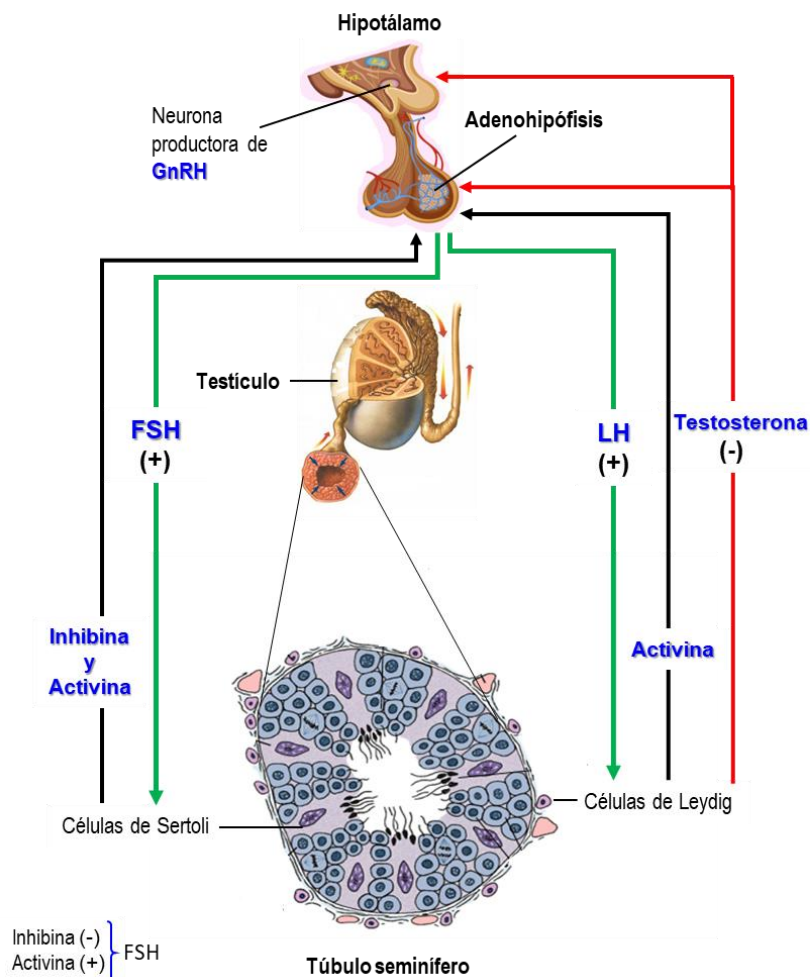


Figura 5. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo. Células de Sertoli y células de Leydig. Hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH) (Tomado y modificado de Kasper y col., 2016).

La FSH y la LH son glicoproteínas compuestas por una subunidad α común en ambas y una subunidad β que les confiere su especificidad (Rajkovic y col., 2006). En el macho, la FSH estimula a las células de Sertoli y promueve la espermatogénesis en los túbulos y la LH controla la secreción de testosterona por las células de Leydig (Prieto y Vázquez., 2002; Jubiz y Cruz., 2007) (Fig. 5).

A su vez, las hormonas producidas en el testículo regulan la secreción de las gonadotropinas. Parte de la testosterona que se sintetiza en las células de Leydig ingresa al túbulo seminífero, mientras que el resto ingresa en los vasos sanguíneos. A nivel hipotalámico, la testosterona ejerce un efecto de retroalimentación negativa que retarda la actividad del generador de pulsos de GnRH, lo que disminuye la secreción de la LH, inhibiendo así la secreción de la testosterona por los testículos. La inhibina es una glucoproteína sintetizada por las células de Sertoli y ejerce un efecto inhibitor sobre la secreción de FSH por la adenohipófisis, al antagonizar con los efectos estimulantes de la activina que es secretada por las células de Leydig (Lee y col., 1989) y de Sertoli. La interacción coordinada de estas hormonas regula la espermatogénesis (Rozell y Okrainetz, 2009; Barret y col., 2010; Tresguerres, 2010; Guyton y Hall, 2016) (Fig. 5).

3. Fertilidad e infertilidad

La fertilidad se define como la capacidad de concebir y procrear y así perpetuar la especie (Barbieri, 2001). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010), la infertilidad es una enfermedad del sistema reproductivo caracterizada por la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales regulares y sin protección.

A nivel mundial, alrededor del 15% de las parejas en edad reproductiva no consiguen el embarazo en el plazo de un año (Dohle y col., 2010; Luna, 2013). La infertilidad puede ser por causas anatómicas, endócrinas, genéticas, inmunológicas e idiopáticas (origen desconocido) (Jalón y col., 2006).

El diagnóstico de la infertilidad masculina deberá centrarse en varios trastornos, ya que es de naturaleza multifactorial (Dohle y col., 2010). En 2010 se estimó que 48.5 millones de

parejas en todo el mundo eran infértiles y de estas, el 40% corresponden al factor masculino (Mascarenhas y col., 2012).

Levine y col. (2017) llevaron a cabo un meta análisis con 7,518 resúmenes y 2,510 artículos completos y mostraron datos sobre la concentración espermática y el recuento total de espermatozoides de un total de 42,935 hombres que proporcionaron muestras de semen de 1973 a 2011. El análisis de los resultados mostró disminución del 50% en el número de espermatozoides en hombres occidentales en los últimos 40 años, dejando en evidencia la problemática en la salud reproductiva causada por diversos factores ambientales (químicos, pesticidas, metales pesados, contaminación ambiental, entre otros).

La disminución en la calidad del semen también puede deberse a otros factores como estrés, drogas, alcohol, tabaco, así como aspectos nutricionales, por ejemplo, hábitos alimenticios, deficiencias de macro y micronutrientes, entre otras (Rosas, 2007). Vinculado con los últimos factores está el consumo de suplementos alimenticios, los cuales, en la mayoría de las veces, son utilizados sin mayor respaldo científico que justifique su uso (Rodríguez, 2011).

4. Suplementos alimenticios

Una dieta equilibrada ha de contemplar el ajuste entre la ingesta y el gasto energético. Las reglas de la alimentación saludable se establecen a partir de criterios relativos a estándares o ingestas recomendadas, que son el marco para cualquier propuesta alimentaria (Roset, 1992).

Algunas personas no obtienen en su alimentación todos los nutrimentos que necesitan y para complementarla recurren al uso de suplementos alimenticios, que son productos a base de hierbas, extractos vegetales, alimentos tradicionales, deshidratados o concentrados de frutas, adicionados o no con vitaminas y minerales, que se puedan presentar en forma farmacéutica y cuya finalidad de uso es incrementar la ingesta dietética total, complementarla o suplir alguno de sus componentes, de acuerdo al Artículo 215, Fracción V, de la Ley General de Salud, Secretaría de Salud (SS, 1997-2006; COFEPRIS, 2010).

Recientemente la presión por controlar el peso corporal con fines de salud o estéticos ha llevado al uso y abuso de suplementos alimenticios como alternativa para bajar de peso y aumentar la masa muscular, muchos de ellos se encuentran formulados con cromo, como es el picolinato de cromo (PicCr). Este compuesto tuvo un gran auge como suplemento alimenticio en la década de los 80s (Evans y Johnson, 1980; Evans, 1996). En 1999 en Estados Unidos de América la venta de PicCr generó un promedio de 500 millones de dólares en tiendas convencionales (supermercados, farmacias y comerciantes masivos) y 10.7 millones de dólares en tiendas de alimentos naturales (Mirasol, 2000).

5. Picolinato de cromo

El picolinato de cromo (PicCr) es un complejo formado por un ión de cromo trivalente [Cr (III)] y tres moléculas de ácido picolínico (AcPic) (Fig. 6) y tiene un peso molecular de 418.30 g/mol (Berner y col., 2004).



Figura 6. Estructura química del picolinato de cromo (Tomada de <http://2.bp.blogspot.com/8rm7PoUWYtBA/CQ1nZrZ5poM/s1600/cromo2.jpg>).

- **Cromo**

El cromo es un mineral que se encuentra en diferentes estados de oxidación, de los cuales el cromo trivalente Cr (III) y el cromo hexavalente Cr (VI) son los más estables (Alvarado y col, 2002; Vincent y Stallings, 2007).

El Cr (III) se encuentra de manera natural en muchos vegetales frescos, frutas, levadura, granos y carne, por esto la ingesta de alimentos es la principal fuente de obtención de este ion (Albert, 1997) (Tabla 1). Las guías dietéticas indican que la ingesta diaria de cromo es de 25 µg (mujer) a 35 µg (hombre) (Vincent, 2004). El Cr (III) es un mineral esencial en el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos, ya que potencia la acción de la insulina en las células sensibles a esta (Vincent, 2001; Alvarado y col., 2002).

Tabla 1. Proporción de Cr (III) en algunos alimentos (Tomada y modificada de Gómez y Magaña, 2003; Havel, 2004).

Fuente	Tamaño de porción	Contenido de CrIII (µg)
Margarina	1 porción	0.02-0.1
Leche entera	1 taza	0.1
Mantequilla	1 porción	0.1-0.3
Huevos	1 pieza	<0.5
Leche desnatada	1 taza	< 0.5
Zanahorias	1 pieza	0.5
Apio	1 tallo	0.5
Naranja	1 pieza	0.5
Pechuga de pollo	85 g	0.5
Queso americano	30 g	0.6
Pescado	85 g	0.6-0.9
Vino tinto	100 ml	0.6-8.5
Pan de trigo entero	1 rebanada	0.8-1.0
Tomate	1 pieza	0.9

Harina de avena	1 taza	0.9-1.2
Pavo	85 g	0.9-1.7
Brócoli	½ taza	0.9-11.0
Plátano	1 pieza	1.0
Champagne	85 ml	1.0-3.3
Arroz blanco	1 taza	1.2
Hojuelas de maíz	1 taza	1.8
Carne de res	85 g	2
Jugo de naranja	1 taza	2.2
Judías verdes	1 taza	2.2
Rosquilla	1 pieza	2.6
Levadura de cerveza	30 g	3.3
Galletas de chocolate	1 pieza	0.85
Té y café	1 taza	8.0

El Cr (III) se absorbe a lo largo del intestino delgado, especialmente en el yeyuno. Se excreta principalmente por el riñón y en menor cantidad por sudor, heces y cabello (Gropper y col., 2009).

Yamamoto y colaboradores (1988) describieron la existencia de un oligopéptido que tiene la capacidad de unirse al Cr (III), al que llamaron cromodulina. Vincent (2000) propone el mecanismo por el cual las células efectúan la captación de la glucosa: la insulina es liberada rápidamente a la circulación, en respuesta al aumento de las concentraciones de glucosa en sangre (Fig. 7a). Al unirse la insulina a su receptor, promueve la movilización de las vesículas con el receptor a transferrina, lo que permite la entrada de iones de Cr (III) del torrente sanguíneo al interior de la célula (Fig. 7b). Cuando el Cr (III) es liberado en el citoplasma, cuatro iones se unen a la apocromodulina y forman la cromodulina (Fig. 7c). La cromodulina se une a la parte interna del receptor de insulina (Fig. 7d). El complejo insulina-receptor-cromodulina activa la región tirosina cinasa en la subunidad β del receptor originando un sistema de auto amplificación de la señal de insulina, lo que permite un aumento en la captación de la glucosa.

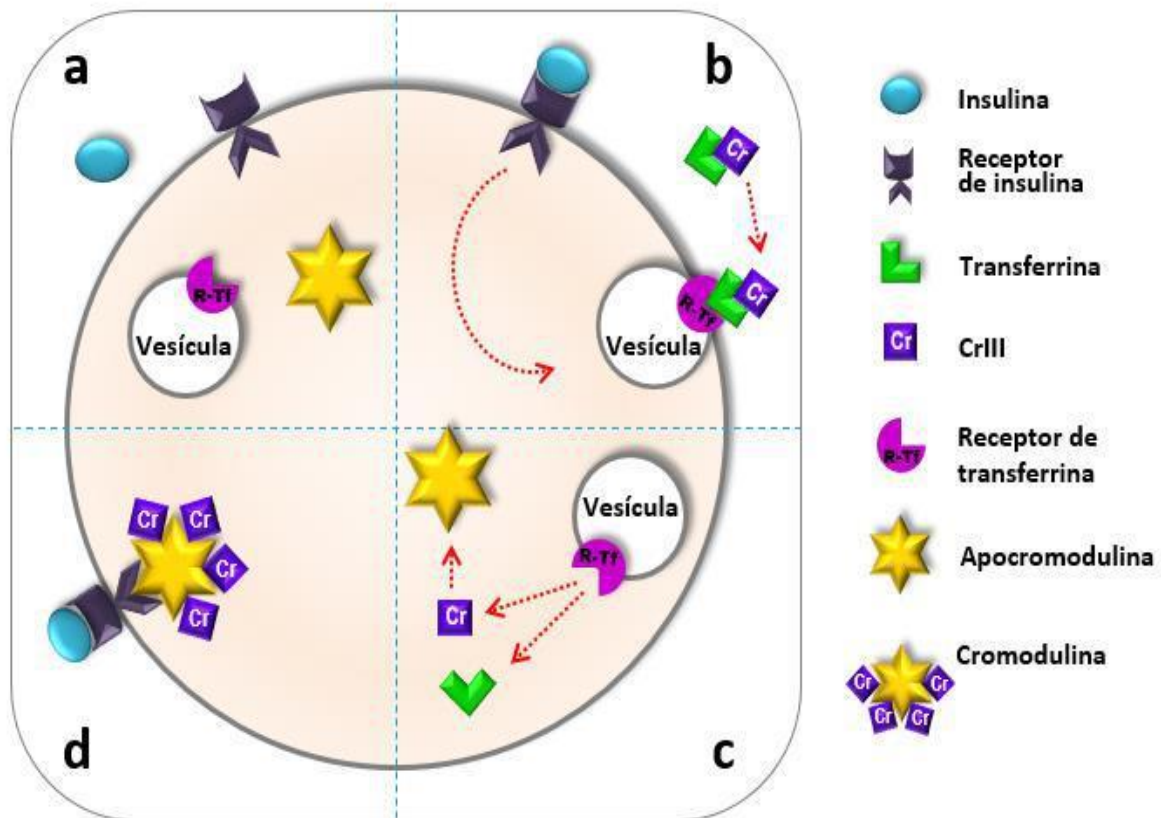


Figura 7. Esquema que muestra el mecanismo propuesto para el ingreso de Cr (III) presente en la sangre, al interior de la célula y la formación de cromodulina (Tomado y modificado de Vincent, 2000; Chavira, 2017).

- **Ácido picolínico**

El ácido picolínico (AcPic), también conocido como ácido piridina 2-carboxílico, es un derivado del metabolismo del aminoácido L-triptófano por la vía de la quinurenina (Evans y Johnson, 1980; Grant y col., 2009). La característica física más investigada del AcPic es su propiedad como agente quelante de metales pesados como Fe, Zn, Cd, Cu, Mg, Mn, Mb y Cr (Fernández-Pol y col., 1977, Evans y Johnson, 1980; Grant y col., 2009).

El AcPic ha sido detectado en una gran variedad de fluidos biológicos como el plasma sanguíneo ($0.299\pm 0.034 \mu\text{M}$) y el líquido cefalorraquídeo ($0.017\pm 0.005 \mu\text{M}$), así como en órganos como el cerebro ($0.10\text{-}0.15 \mu\text{M}$) (Evans y Johnson, 1980; Grant y col., 2009).

Por la eficacia de sus propiedades de quelación en los complejos AcPic-ion metálico se utiliza ampliamente como un medio de introducción de metales bioactivos en los sistemas biológicos (Grant y col., 2009). La formulación del PicCr incrementa la biodisponibilidad del Cr (III) obtenido de la dieta (2-5% vs 0.5-2% respectivamente) (Berner y col., 2004; Havel, 2004; González y col., 2006).

El PicCr se comercializa como suplemento alimenticio y se promociona como constructor muscular y agente de pérdida de peso. Es un compuesto de venta libre en el mercado y por internet bajo la leyenda "Este producto no es un medicamento. El consumo de este producto es responsabilidad de quien lo recomienda y de quien lo usa". Sus presentaciones van de $200 \mu\text{g}$ a $1,800 \mu\text{g}$ /tableta. En las últimas dos décadas se ha estimado que más de diez millones de personas han tomado algún suplemento que contiene PicCr (Anderson, 1998; Komorowski y Cefalú, 2001; González y col., 2006; Castell y col., 2016) (Fig. 8).



Figura 8. Diversas presentaciones de PicCr ofrecidas por internet y de venta libre en México con dosis de: 200, 500, 1000 y $1800 \mu\text{g}$ (Tomado y modificado de: https://www.google.com/search?ei=zTWYXOyLD8TktQWir5SIDQ&q=picolinato+de+cromo+&oeq=picolinato+de+cromo+&gs_l=im. EhKg-pD9JRE).

Sin embargo, se ha revelado que los posibles efectos benéficos del PicCr son mínimos o nulos, e incluso se han detectado posibles repercusiones negativas como consecuencia de la acumulación de Cr (III) en distintos órganos (Marcus y Coulston, 1990; Cerulli y col., 1998; González y col., 2006).

6. Efectos del picolinato de cromo

- **En humanos**

Walter y colaboradores (1997) describen un caso de fallo renal crónico en una paciente de 43 años que ingirió 600 µg de PicCr diariamente por 6 semanas con la finalidad de reducir de peso. Después de los análisis se confirma el diagnóstico de nefrotoxicidad inducida por Cr (III).

Otro caso clínico referido en la literatura por abuso en el consumo de PicCr, es el de una mujer de 33 años que consumió diariamente de 1,200 a 2,400 µg de PicCr por cuatro o cinco meses para mejorar la pérdida de peso. Los análisis mostraron que la paciente tenía concentraciones de cromo en el plasma de dos a tres veces más el valor normal, además de presentar pérdida de peso, anemia, trombocitopenia, hemólisis, disfunción hepática e insuficiencia renal entre otras (Cerulli y col., 1998).

En un estudio realizado en luchadores universitarios, se evaluaron los efectos del consumo diario de 200 µg de PicCr por 14 semanas y se registró la composición corporal y las concentraciones de insulina y glucosa en suero, antes y después del período de suplementación y entrenamiento. Los resultados mostraron que la masa corporal magra, la masa grasa y el porcentaje de grasa corporal, así como las concentraciones de insulina y glucosa en los luchadores sometidos a la ingesta de PicCr fueron similares a los grupos control y tratados con placebo con lo que los autores sugieren que la ingesta de PicCr acoplada al entrenamiento físico no mejora las variables estudiadas más allá de las observadas con el entrenamiento por sí solo (Walker y col., 1998).

A nivel reproductivo se mostró, en varones adultos jóvenes, que la ingesta de 200 µg

de PicCr por 21 días disminuyó progresivamente la movilidad y viabilidad espermática; también decreció el porcentaje de espermatozoides con morfología normal. Con base en estos resultados los autores mencionan que el consumo de PicCr representa un riesgo para la calidad espermática (Cuapio y col., 2009).

- **En diversos modelos biológicos**

Stearns y colaboradores (1995) mostraron en cultivo de células de ovario de hámster chino, que la adición de concentraciones crecientes de PicCr (0.05-1 mM) al medio de cultivo incrementa el porcentaje de aberraciones cromosómicas, por lo que los autores lo clasifican como agente clastogénico.

Los posibles efectos nocivos *in vivo* del PicCr se examinaron utilizando *Drosophila melanogaster*. Se anexaron al medio de cultivo diversas concentraciones de PicCr y se encontró que reduce la tasa de éxito de pupación y eclosión y detiene el desarrollo de las pupas de manera dosis-dependiente. También induce la aparición de mutaciones letales ligadas al cromosoma X e incrementa el porcentaje de hembras estériles (Hepburn y col., 2003b).

Con base en los resultados obtenidos en el cultivo de linfocitos de sangre periférica de humano, el PicCr se ha clasificado como citotóxico, ya que disminuye la viabilidad celular, promueve la apoptosis e incrementa el daño oxidante. Además, produce genotoxicidad, ya que decrece la síntesis de ADN y aumenta la fragmentación del mismo (Jana y col., 2009).

En el cultivo de células de la granulosa de mujer, la adición de PicCr aumentó la secreción de progesterona independientemente de la concentración. El tratamiento con 30 ng/ml de PicCr incrementó la secreción de 17 β -estradiol y la dosis de 300 ng/ml no la modificó, por lo que se describe al PicCr como un disruptor endócrino con comportamiento hormético (Ortega, 2011).

También se han estudiado los efectos fetotóxicos del PicCr utilizando ratones preñados a los cuales se les anexaron 200 mg de PicCr/kg de alimento del día 6 al 17 de gestación. El

análisis de la descendencia mostró que la ingesta materna de PicCr provocó anormalidades esqueléticas en los fetos (Bailey y col., 2006). En otro estudio se evaluaron los fetos de hembras sometidas a la ingesta de PicCr antes de la gestación y se observó incremento en la frecuencia de anormalidades esqueléticas en cabeza, extremidades, cola y esternones (Chávez, 2013).

En el ratón hembra, la administración diaria de PicCr disminuyó la respuesta ovulatoria espontánea e inducida por gonadotropinas exógenas, así como la tasa de fertilidad (Chávez, 2013; Espinosa, 2016; Marín, 2017). En ratones macho adultos, la ingesta de PicCr en la dosis equivalente a la recomendada para consumo humano (uso) y diez veces más (abuso) por un ciclo espermático, disminuyó los parámetros seminales en función del tiempo de tratamiento (Chavira, 2017).

Planteamiento del problema

El PicCr es un suplemento alimenticio que se promociona como constructor muscular, al aumentar la masa magra y reducir la grasa corporal, cualidad que ha incrementado su consumo principalmente por adultos jóvenes que buscan un beneficio estético.

Sin embargo, existen estudios que muestran que el PicCr tiene efectos adversos sobre el individuo que lo consume. En estudios *in vitro* e *in vivo*, con diversos sistemas biológicos, se ha mostrado que tiene efectos clastogénicos, mutagénicos y fetotóxicos, entre otros.

En estudios previos de nuestro laboratorio mostramos en ratones macho adultos, que la ingesta diaria de diversas concentraciones PicCr por un ciclo espermático modifica los parámetros seminales. Por ello se decidió realizar el estudio histológico de los testículos de estos ratones y evaluar la proporción de células de la línea germinal en sus diferentes estadios.

Hipótesis

Si la ingesta de PicCr afecta la concentración espermática del ratón, misma que depende del adecuado desarrollo de la espermatogénesis, entonces el análisis histológico de los testículos de estos animales mostrará cambios en la proporción de células de la línea germinal.

Objetivo general

Analizar los efectos del PicCr administrado por un ciclo espermático (35 días) en la dosis recomendada para consumo humano y diez veces más, sobre la proporción de células en los diferentes estadios de la espermatogénesis.

Objetivos particulares

- Realizar el análisis morfométrico de los túbulos seminíferos de los animales tratados con PicCr.
- Cuantificar cada uno de los tipos celulares de la línea germinal presentes en los túbulos seminíferos de animales tratados con PicCr.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron ratones macho adultos (2.5 meses de edad) de la cepa CD1, procedentes del bioterio de la FES-Zaragoza, UNAM, que se mantuvieron bajo condiciones controladas de confinamiento, con fotoperiodo de 14 h de luz y 10 h de obscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), humedad relativa del 42%, temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y libre acceso al agua y al alimento.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Administración oral de PicCr

La concentración se determinó a partir de la dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{día}$ que es la recomendada para consumo humano (peso corporal aproximado de 65 kg) (National Research Council, 1989), lo que corresponde a 0.12 $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ para un ratón adulto (peso corporal aproximado de 40 g). Con la finalidad de emular el abuso de dicho suplemento se administró 1.2 μg de PicCr/ratón/día, lo que corresponde a 10 veces más la dosis recomendada para consumo humano.

Se utilizó el PicCr disponible comercialmente para consumo humano (General Nutrition Center [GNC]) en presentación de tabletas de aproximadamente 550 mg (40,000 $\mu\text{g}/100$ g). Las tabletas se pulverizaron en un mortero y se suspendieron en aceite de maíz como vehículo (Vh).

El tratamiento se administró por vía oral con la ayuda de un combitubo (eppendorf) (Brinkmann Instruments, Ltd. Canadá) de 2.5 ml acoplado a un repipeteador (eppendorf). La aplicación del compuesto se realizó diariamente entre las 10:00 y 11:00 h.

Grupos experimentales

Al terminar el tratamiento los animales fueron sacrificados por decapitación y se utilizaron los testículos Izquierdos de tres machos de cada uno de los siguientes grupos experimentales.

- **Testigo:** animales que no se sometieron a tratamiento alguno.
- **Vehículo:** animales que se sometieron a la ingesta diaria de aceite de maíz por 35 días y se sacrificaron al término del tratamiento.
- **0.12 µg de PicCr:** animales que se sometieron a la ingesta diaria del suplemento por 35 días y se sacrificaron al término del tratamiento.
- **1.2 µg de PicCr:** animales que se sometieron a la ingesta diaria del suplemento por 35 días y se sacrificaron al término del tratamiento.

Procesamiento histológico

Fijación

Los testículos se fijaron en solución de paraformaldehído (PFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) al 4% por 3 h. El PFA funciona formando enlaces transversales en las proteínas y manteniendo la estructura de la célula y la morfología del tejido.

Deshidratación

Al término de la fijación, los testículos se deshidrataron gradualmente en alcohol etílico (80, 90 y 100%) (JT Baker, Phillisburg, NJ) y finalmente en cloroformo (JT Baker). Los testículos se mantuvieron 120 min en cada solución y finalmente fueron colocados en paraplant (McCormick Scientific, St. Louis, MO).

Técnica de inclusión en paraplant

Los tejidos fijados adquieren cierta consistencia y dureza, pero no la suficiente para que se obtengan secciones delgadas. Estas secciones se consiguen cuando los tejidos se infiltran con sustancias denominadas “de inclusión” y adquieren tal dureza que, sometidos al filo de una navaja, se obtienen cortes delgados y transparentes (Montalvo, 2010). El paraplant aporta una excelente matriz para obtener cortes histológicos suficientemente finos que permiten

observarlos al microscopio. Después del cloroformo los testículos se colocaron en vasos de precipitado con paraplast fundido (punto de fusión 56°C). Los órganos permanecieron en la estufa de inclusión por 120 min. Posteriormente se colocaron en moldes etiquetados conteniendo paraplast y se dejaron solidificar a temperatura ambiente.

Cortes en microtomo

El bloque de paraplast con el órgano incluido se extrajo del molde y se fijó en el portabloque del microtomo (Ecoshell 202A). Se realizaron cortes seriados de 10 µm de grosor. Se seleccionó un corte de cada 50 hasta muestrear todo el testículo (Fig. 9A). Los cortes se montaron en portaobjetos previamente etiquetados, desengrasados y con una capa de albúmina (Fig. 9B). Para evitar el desprendimiento de los cortes, las laminillas se colocaron en una cámara de tinción impregnada con formol al 10% dentro de una estufa a 37 °C por un tiempo mínimo de 48 h.

Tinción con hematoxilina y eosina

Antes de la tinción, se eliminó el exceso de paraplast de las laminillas. Se colocaron 25 min en xilol (JT Baker), se enjuagaron en alcohol etílico al 96% (JT Baker), se sumergieron 5 min en agua destilada y se colocaron 2 min en hematoxilina (Hycel de México, Naucalpan Edo. de México). Se realizaron dos cambios de 5 min en agua corriente ya que las sales del agua permiten obtener el viraje a violeta, se tiñeron con eosina (Hycel de México, Naucalpan Edo. Mex.) durante 90 segundos y se enjuagaron con alcohol etílico al 90% (JT Baker). Se colocaron 5 min en carbol-xilol para aclarar, posteriormente se pasaron a xilol por 5 min. Por último se realizó el montaje permanente colocando entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y un cubreobjetos.

Análisis histológico

Por cada corte se analizaron un total de diez túbulos seminíferos ubicados dentro del campo visual del microscopio, que se eligieron en parejas en dirección de las manecillas del reloj a las 3, 6, 9 y 12 h, para finalmente elegir el último par ubicado al centro del mismo (Fig. 9C). El diámetro tubular promedio se obtuvo con la ayuda de un ocular micrométrico para medir el diámetro vertical (D1) y el perpendicular a este (D2) (Fig. 9D). Se realizó la evaluación de un total de 100 túbulos por animal.

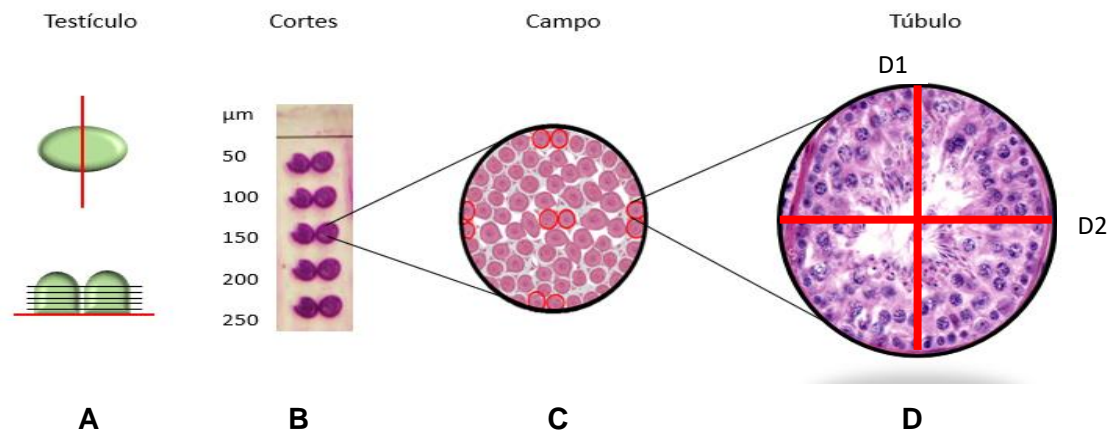


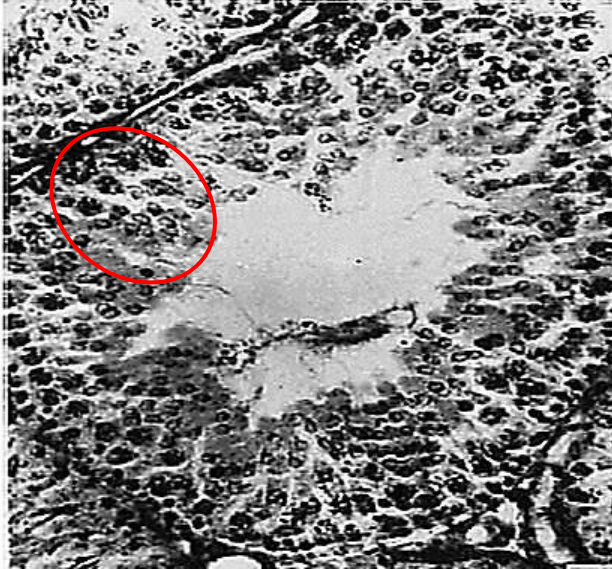
Figura 9. Esquema de análisis morfométrico en testículos de ratón, que muestra la forma de evaluación de los túbulos seminíferos.

Todos los datos obtenidos fueron conjuntados en una base de datos con el siguiente orden: en cada túbulo se realizó la cuantificación de todos los tipos celulares presentes, espermatogonias, espermatocitos I, espermatocitos II y espermátidas.

Evaluación de los estadios

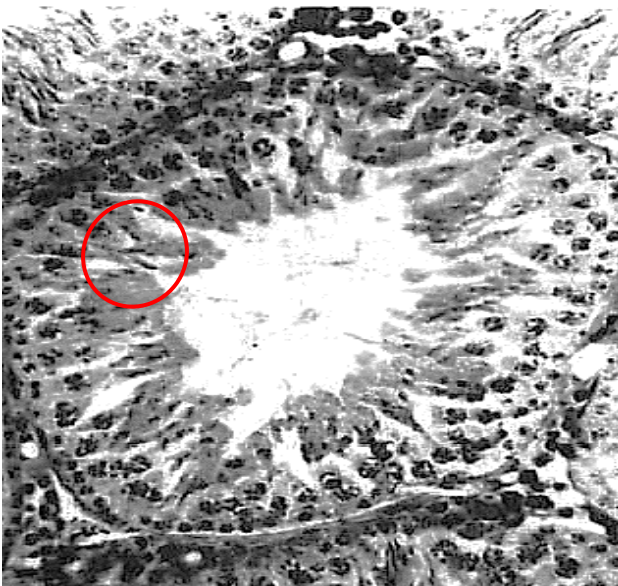
Para la evaluación de los estadios presentes en los túbulos se utilizaron las imágenes y criterios de Rossenrunge y Giesel (1950), donde se establecen 8 estadios de crecimiento y desarrollo. Todas las figuras, son cortes transversales del túbulo seminífero, teñidos con hematoxilina.

Estadio 1:



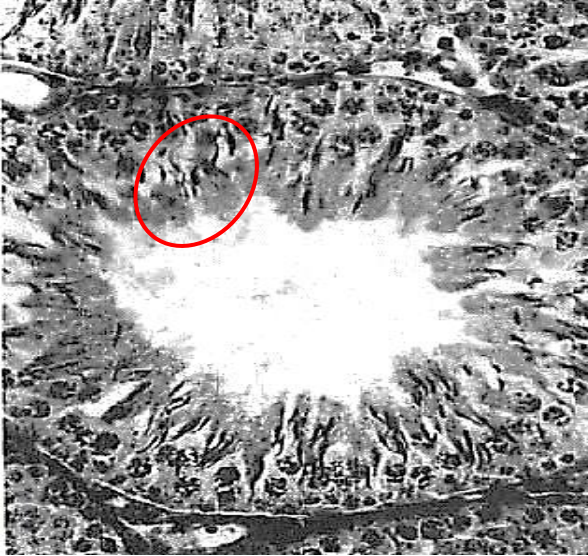
- Inicio del ciclo. Se observan espermatogonias, espermatocitos I y espermatocitos II.

Estadio 2:



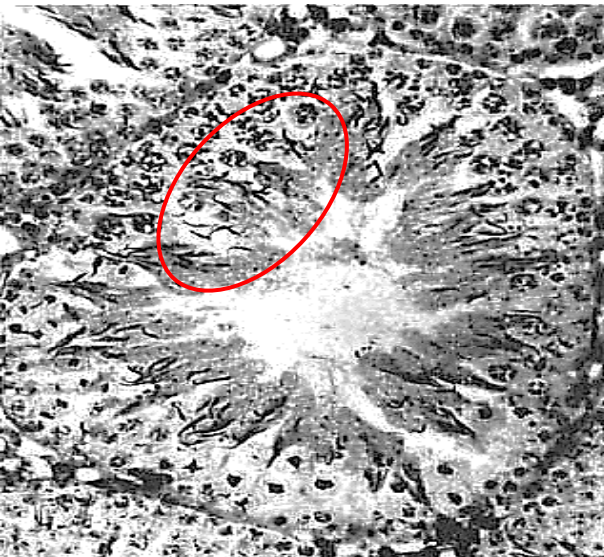
- Están presentes células del estadio anterior y unas cuantas espermátidas diferenciándose.

Estadio 3:



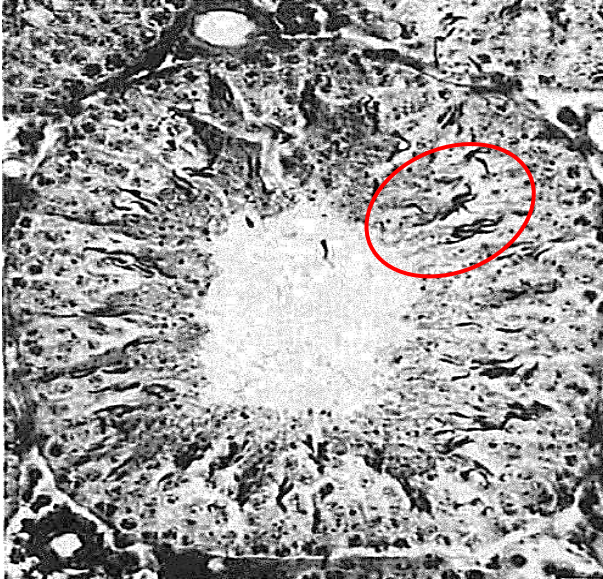
- Comienzo de la primera división de los espermatocitos. Las espermátidas se muestran alargadas en la periferia de la luz del túbulo seminífero.

Estadio 4:



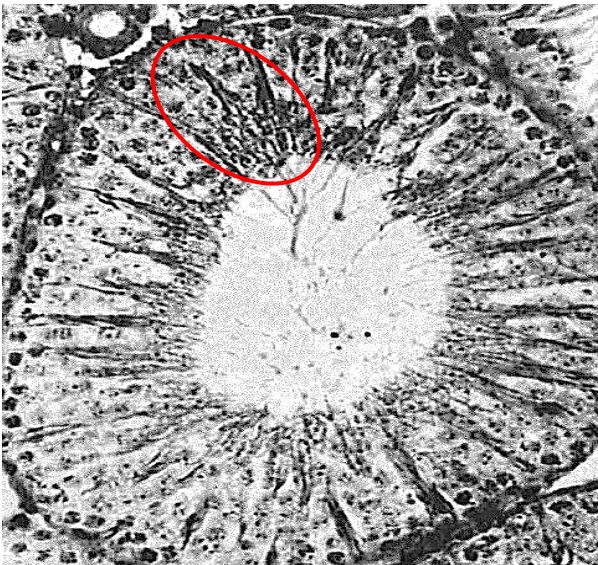
- Final de la segunda división de los espermatocitos. Las espermátidas alargadas se concentran en grupos

Estadio 5:



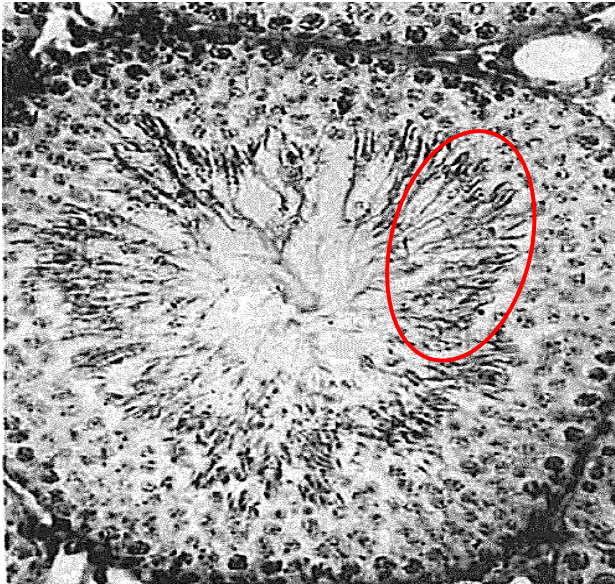
- Final de la segunda división. Las espermatidas comienzan a acomodarse a lo largo de la célula de Sertoli.

Estadio 6:



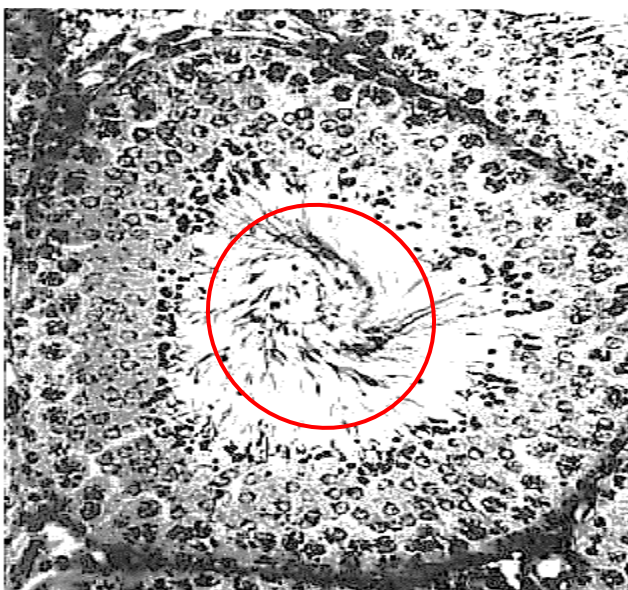
- Las espermatidas ya se han acomodado a lo largo de la célula de Sertoli, ubicándose desde la membrana basal hasta la luz del túbulo seminífero. Comienzo de su movimiento hacia la luz.

Estadio 7:



- Los espermatozoides se acomodan en la luz del túbulo seminífero.

Estadio 8:



- Los flagelos de los espermatozoides forman un vórtice al centro de la luz del túbulo. Termina un ciclo del epitelio seminífero.

Análisis estadístico

El diámetro de los túbulos seminíferos se expresó como la media \pm e.e.m. y se sometió a un análisis de varianza multifactorial (ANDEVA) seguido de la prueba de Tukey. El número de células de la línea germinal se graficó como mediana \pm rango inter cuartil y se comparó entre tratamientos por la prueba de Kruskal Wallis. Para evaluar el porcentaje de células de la línea germinal por estadio se utilizó la prueba de Chi^2 . Se consideraron como diferencias significativas aquellas en las que la probabilidad fue menor o igual a 0.05. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el Software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software INC. USA, 2018).

RESULTADOS

Efectos de la ingesta diaria de PicCr por 35 días sobre el diámetro tubular.

El diámetro tubular promedio de los testículos de animales sometidos a la ingesta de PicCr por un ciclo espermático no mostró diferencias entre los tratamientos (Fig. 10).

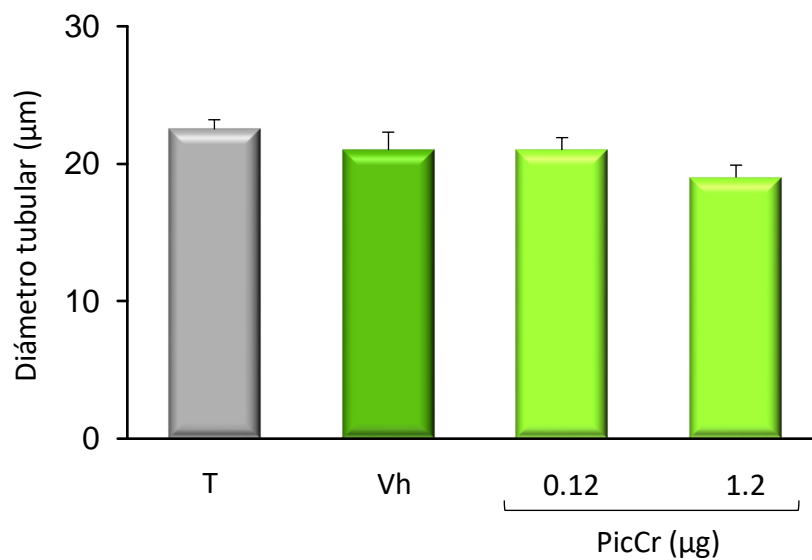


Figura 10. Media \pm e.e.m. del diámetro de los túbulos seminíferos de los testículos de ratones adultos testigo (T) o sometidos a la ingesta de vehículo (Vh) o picolinato de cromo [PicCr (0.12 y 1.2 µg)] por 35 días.

Efectos de la ingesta diaria de PicCr por 35 días sobre el número de células de la línea germinal en el testículo de ratón.

El número de células de la línea germinal entre los grupos experimentales no mostró diferencias (Fig. 11).

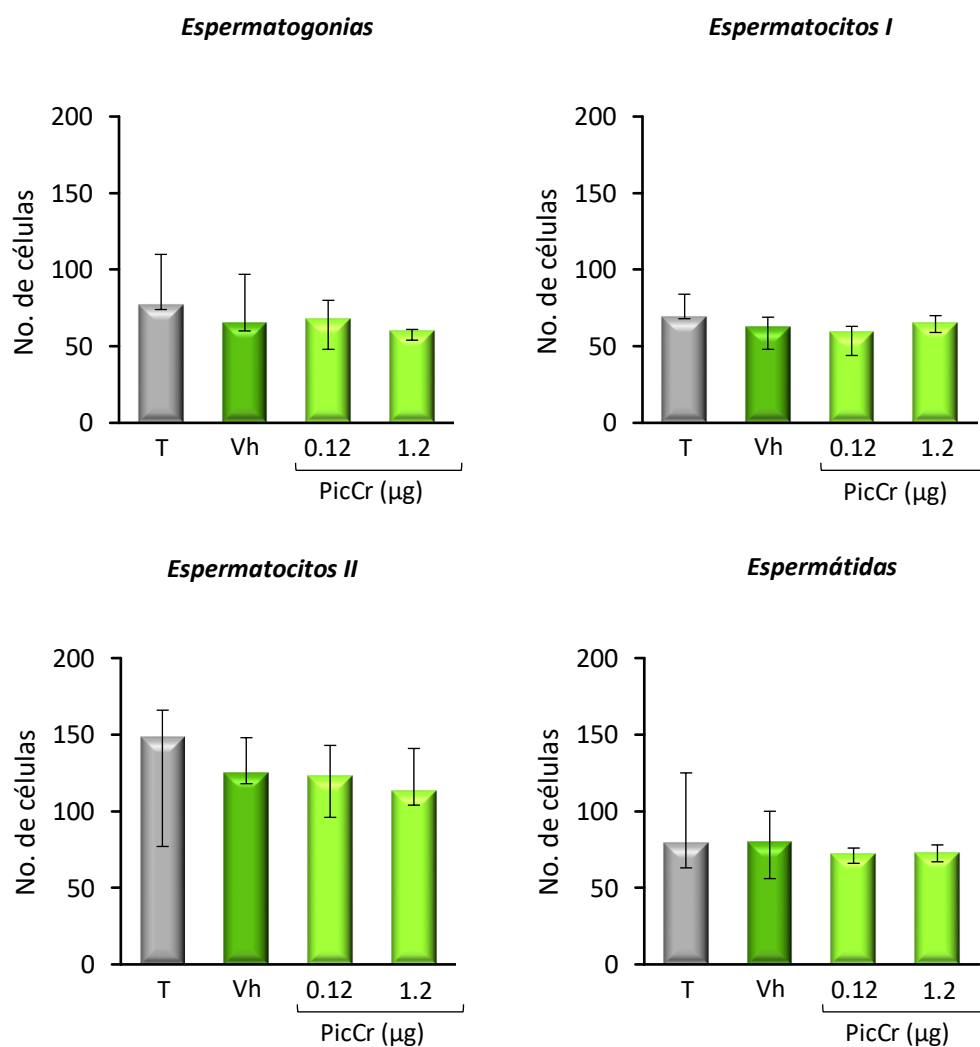


Figura 11. Número de espermatogonias, espermatocitos I, espermatocitos II y espermátidas (mediana \pm rango inter cuartil) de ratones adultos testigo (T) o sometidos a la ingesta de vehículo (Vh) o picolinato de cromo [PicCr (0.12 y 1.2 µg)] por 35 días.

Efectos de la ingesta diaria de PicCr por 35 días sobre el porcentaje de espermatogonias en el testículo de ratón.

El porcentaje de espermatogonias fue similar entre el grupo testigo y el grupo tratado con vehículo, independientemente del estadio. Sin embargo en los grupos tratados con 0.12 μg de PicCr el porcentaje de espermatogonias disminuyó en los estadios 5 y 6. Efecto similar se observó en los estadios 4 y 5 en los animales que recibieron 1.2 μg de PicCr (Fig. 12).

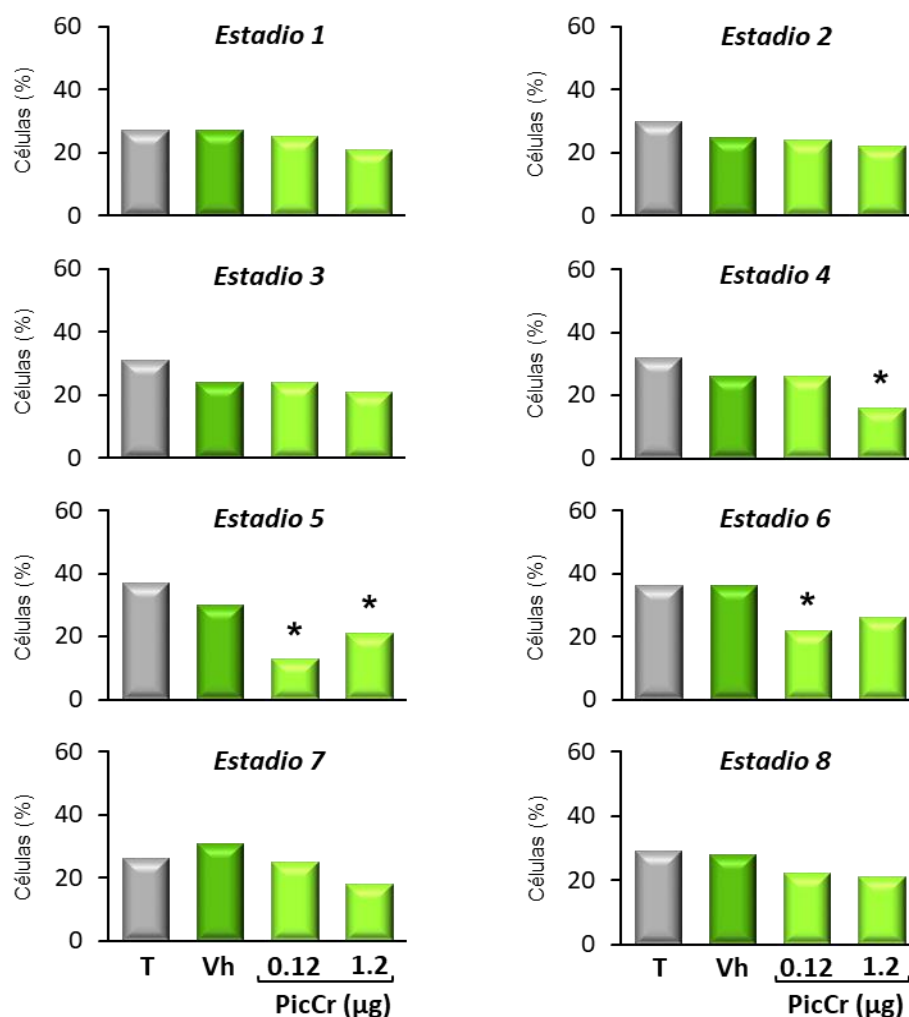


Figura 12. Porcentaje de espermatogonias de ratones adultos testigo (T) o sometidos a la ingesta de vehículo (Vh) o Picolinato de Cromo [PicCr (0. 12 y 1.2 μg)] por 35 días. * $p < 0.05$ vs Testigo (Prueba de Chi^2).

Efectos de la ingesta diaria de PicCr por 35 días sobre la proporción de espermatoцитos I en el testículo de ratón.

En el caso de los espermatoцитos I, solo el grupo tratado con 0.12 μg de PicCr presentó disminución en el estadio 5 (Fig. 13).

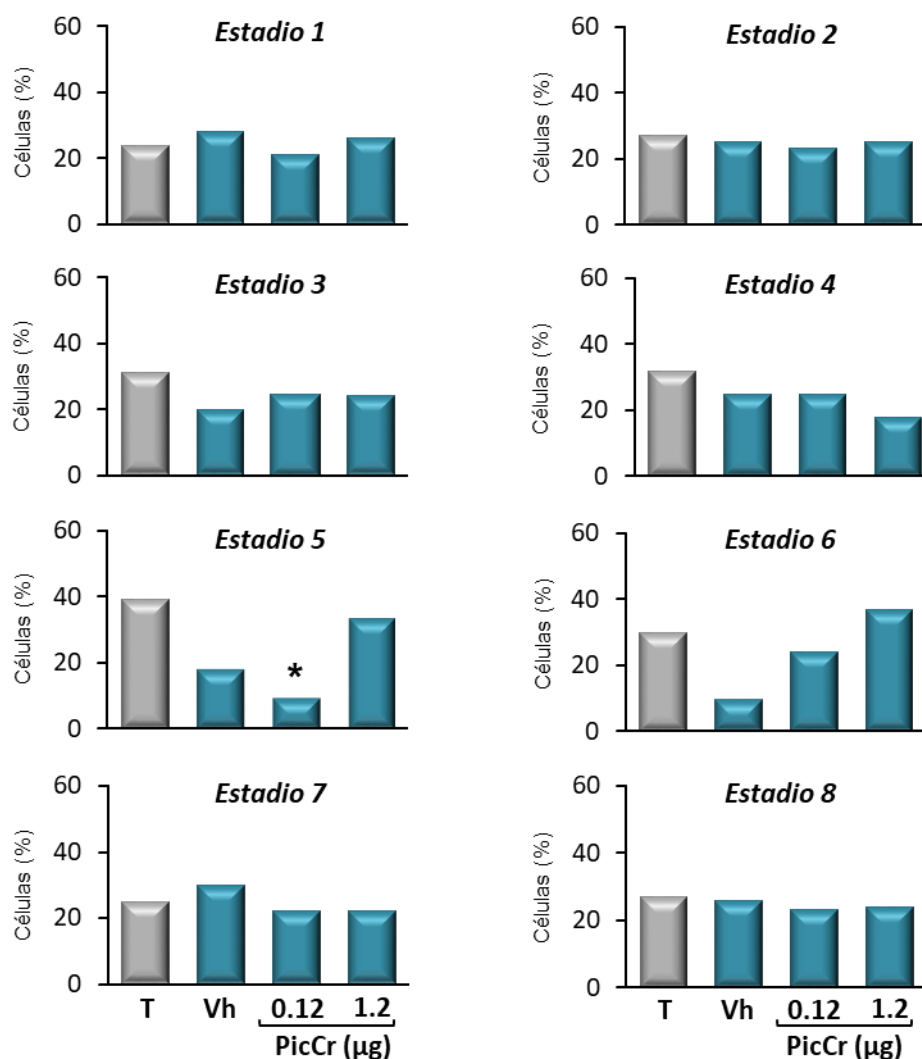


Figura 13. Porcentaje de espermatoцитos I de ratones adultos testigo (T) o sometidos a la ingesta de vehículo (Vh) o picolinato de cromo [PicCr (0.12 y 1.2 μg)] por 35 días. * $p < 0.05$ vs Testigo (Prueba de Chi^2).

Efectos de la ingesta diaria de PicCr por 35 días sobre la proporción de espermatocitos II en el testículo de ratón.

Los espermatocitos II, disminuyeron en el grupo con 0.12 μg de PicCr en el estadio 5 y el grupo tratado con 1.2 μg de PicCr presentó en el estadio 6 el doble de espermatocitos II que el grupo testigo (Fig. 14).

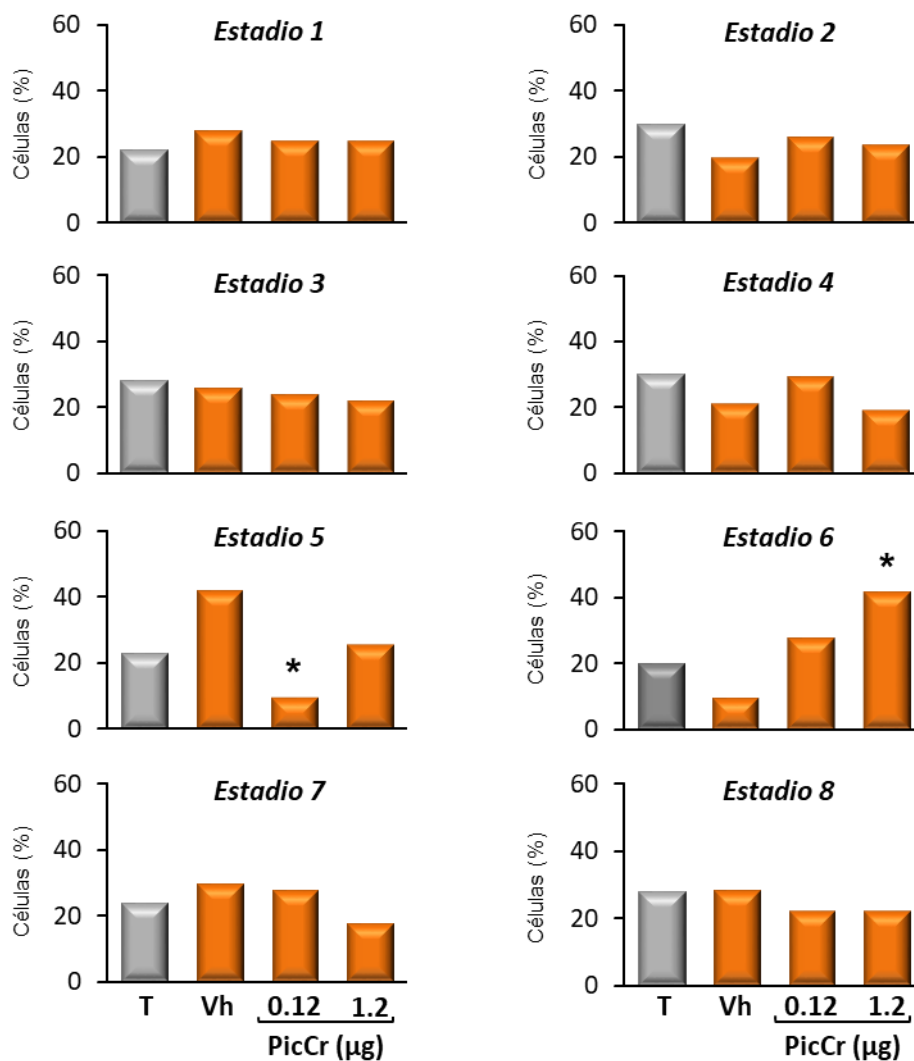


Figura 14. Porcentaje de espermatocitos II de ratones adultos testigo (T) o sometidos a la ingesta de vehículo (Vh) o picolinato de cromo [PicCr (0.12 y 1.2 μg)] por 35 días. * $p < 0.05$ vs Testigo (Prueba de χ^2).

Efectos de la ingesta diaria de PicCr por 35 días sobre la proporción de espermátidas en el testículo de ratón.

En los animales tratados con 0.12 μg de PicCr, la proporción de espermátidas en el estadio 5 fue significativamente menor a la observada en el grupo testigo y en el estadio 8 la disminución se presentó en ambas concentraciones comparada con el testigo (Fig. 15).

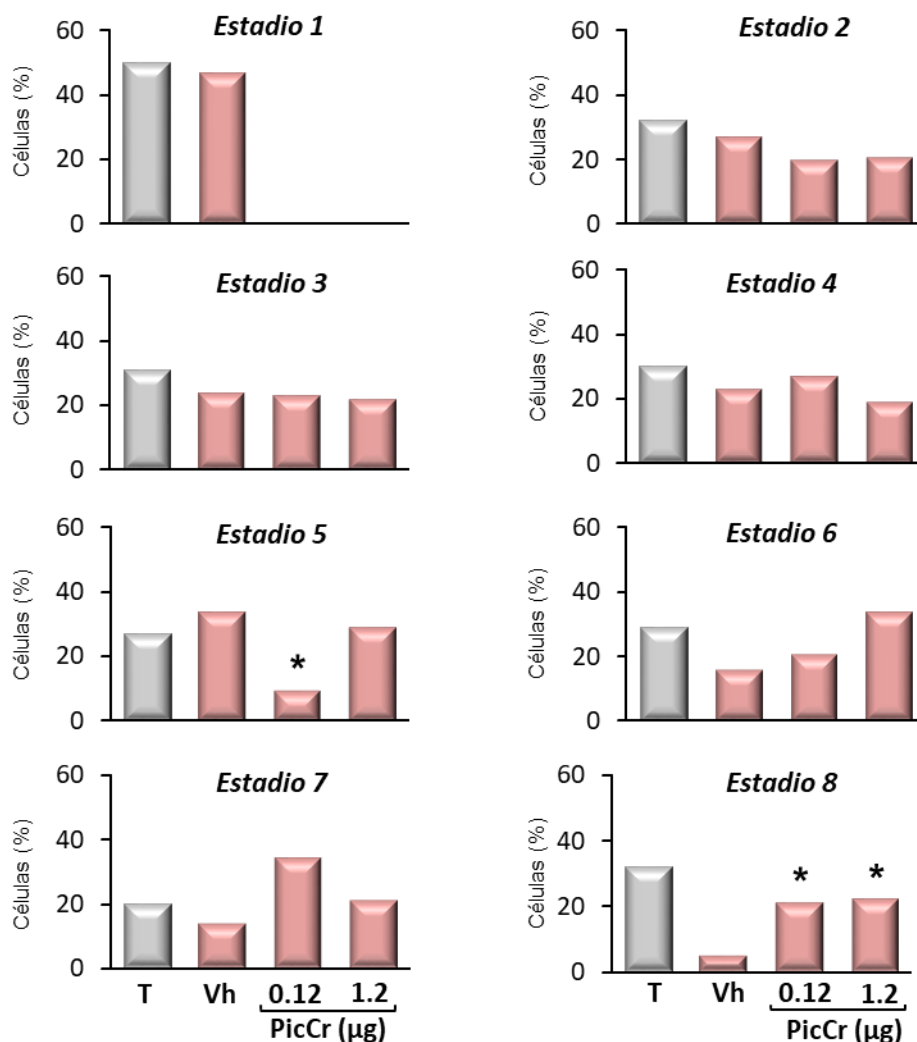


Figura 15. Porcentaje de espermátidas de ratones adultos testigo (T) o sometidos a la ingesta de vehículo (Vh) o picolinato de cromo [PicCr (0. 12 y 1.2 μg)] por 35 días. * $p < 0.05$ vs Testigo (Prueba de χ^2).

Discusión

Los resultados muestran que el número de células de los diferentes tipos celulares de la línea germinal es similar entre los grupos experimentales. El análisis por estadios revela que el tratamiento con PicCr disminuye la proporción de espermatogonias y en mayor medida la proporción de espermatocitos I, espermatocitos II y espermátidas, dependiendo de la concentración de PicCr administrada. Sólo con la concentración más alta de PicCr se presentó una mayor proporción de espermatocitos II, lo que podría ser un efecto de compensación (hormesis).

El término morfometría viene del griego μορφή "morphé", que significa "forma" o "figura", y μετρία "metría", que significa "medición", por ello cuando se efectúa un análisis morfométrico, se está realizando una evaluación cuantitativa de un concepto que abarca el tamaño y la forma (Bookstein, 1991; Toro, 2010). Flores en 2016 realizó el estudio morfométrico de los túbulos seminíferos de ratas tratadas con p-cloro anfetamina y observó disminución del área. En el presente trabajo, el diámetro promedio de los túbulos seminíferos fue similar entre los grupos experimentales, lo que nos permite sugerir que la disminución de la concentración espermática previamente descrita en ratones macho adultos tratados con PicCr (Chavira, 2017), no se refleja en el diámetro de los túbulos seminíferos.

La organización de los tipos de células que comprenden el proceso de espermatogénesis dentro del epitelio seminífero no es aleatoria, de hecho, está altamente organizada en diferentes fases de desarrollo (Kerr y col., 2006). Esta secuencia de cambios que caracteriza a la espermatogénesis se ha subdividido de manera artificial en etapas, cuyo número depende de los criterios utilizados. Cuanto más extensos son los criterios, más específicas y detalladas son las etapas que pueden identificarse (Kerr y col., 2006). La evaluación de la espermatogénesis bajo estos criterios ha permitido establecer la duración de un ciclo espermático en animales como el ratón (Oakberg, 1956), el carnero (Ortavant, 1958), el hombre (Clermont, 1963) y el mono (Müller y Skakkebaek, 1983). Existen diversas clasificaciones para la evaluación del ciclo del epitelio seminífero en el ratón. En este estudio se utilizó la clasificación propuesta por Rossenrunge y Giesel (1950) que consta de ocho estadios que muestran los cambios de las células germinales a lo largo de su maduración,

donde el estadio 1 indica el comienzo de las divisiones de las espermatogonias que inician un nuevo ciclo, ya que la generación de espermatozoides del ciclo anterior acaba de desaparecer del túbulo (estadio 8). Las espermatogonias son la base de la espermatogénesis y esenciales para la fertilidad masculina (Phillips y col., 2010). En el testículo de los roedores ocurren numerosas divisiones mitóticas secuenciales de espermatogonias A1 que producen espermatogonias de tipo A2, A3, A4 e intermedias, llegando a un promedio de 512 espermatogonias tipo B que a su vez se dividen para producir espermatocitos I. Estos últimos transitan por dos divisiones meióticas dando lugar a espermatocitos II y espermátidas que se diferencian en espermatozoides. Por lo tanto, un grupo relativamente pequeño de células madre en los testículos de roedores produce 40 millones de espermatozoides por gramo de parénquima testicular cada día (Phillips y col., 2010; Adetunji y col., 2018). Con base en lo anterior es probable que la disminución en la concentración espermática previamente observada en los animales tratados con PicCr (Chavira, 2017) sea el resultado de la reducción en la proporción de espermatogonias entre los estadios 4 a 6 (40-65%). El hecho que la proporción de espermatocitos I y II y espermátidas disminuya entre el 60 y 80% en los túbulos de los animales que consumieron PicCr, apoya esta interpretación.

El PicCr es capaz de inducir daño oxidante al ADN (Speetjens y col., 1999; Hepburn y col., 2003a) vía el incremento en las ERO, lo que culmina en apoptosis (Manygoats y col., 2002; Jana y col., 2009), la cual podría ser una posible explicación a la disminución de las células germinales por el tratamiento con PicCr. Al respecto, existen estudios que confirman la asociación entre el estrés oxidante y la infertilidad masculina (Gallardo y col., 2007; Gunes y col., 2015).

La comunicación que se establece entre las células de Leydig, las células de Sertoli, las gonadotropinas y los esteroides sexuales es crucial para mantener la espermatogénesis y la supervivencia de las células germinales (Ruwanpura y col., 2010; Méndez y col., 2014). El PicCr es un compuesto capaz de interferir con la acción hormonal normal (Ortega, 2011) y adoptar las características de un potencial disruptor endócrino (compuesto químico que interfiere con la síntesis, metabolismo o acción de las hormonas responsables de mantener la homeostasis) (Kavlock, 1996; MPCA, 2008; Mimma 2018). La testosterona ejerce sus efectos biológicos sobre la espermatogénesis vía receptores de andrógenos que se localizan en las

células de Sertoli (Silva y col., 2002). La acción de la testosterona es crítica para completar la entrada y el progreso de la meiosis (McLachlan y col., 2002a; Haywood y col., 2003). En estudios previos mostramos que la concentración de testosterona en el suero de los animales tratados con PicCr por 35 días disminuye (Chavira, 2017), lo que se acompaña de menor concentración espermática. Con estos resultados, aunados a los del presente trabajo podemos sugerir que las células de Leydig podrían ser blanco de los efectos de disruptor endócrino del PicCr, efecto que podría tener como consecuencia la desregulación del ciclo de maduración del epitelio seminífero y disminución en las células germinales.

La espermatogénesis requiere comunicación altamente coordinada entre las células de Sertoli y las células germinales. En las células de Sertoli los desmosomas son uniones célula-célula que permiten dicha comunicación (Mruck y Cheng, 2011). Su interrupción podría generar cambios en el entorno dejando a las células germinales en un ambiente fisiológico desfavorable y por consecuencia disminuyendo el desarrollo de las mismas. Para que la célula de Sertoli realice su función de “nodriza”, en la cual proporciona factores de crecimiento esenciales en el desarrollo de las células germinales (Skinner y Griswold, 1980; Schteingart, 1989), es necesario mantener la integridad de la membrana plasmática y los desmosomas. Debido a su alto contenido de fosfolípidos, la membrana plasmática es muy susceptible a la lipoperoxidación, de ahí que el tratamiento con PicCr podría estar afectándola al promover la lipoperoxidación (Hepburn y col., 2003a; Imamoglu y col., 2008), daño que comprometería el libre tránsito de los factores nutritivos.

No podemos descartar la posibilidad de que el PicCr pudiera tener un efecto a nivel hipofisario que altere la secreción de las gonadotropinas, en cuyo caso afectaría la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, reflejándose en la consecución de la espermatogénesis.

Cuando la relación dosis-respuesta de un compuesto dado, no sigue un patrón lineal y adopta formas de U, U invertida, J y sigmoidea, se dice que tiene un comportamiento hormético. En términos biológicos, la hormesis representa la sobrecompensación de una célula u organismo para garantizar el mantenimiento de la homeostasis (Calabrese y Baldwin, 2002; Calabrese, 2004; Mattson, 2008). La curva dosis-respuesta en la ovulación de ratones tratados con PicCr mostró un comportamiento en forma de U (Chávez, 2013). Espinosa (2016)

observó el mismo comportamiento del PicCr, pero en la curva temporal (40, 60 y 80 días de tratamiento) y la respuesta ovulatoria. En el ratón macho, la concentración espermática no presentó un patrón lineal, ni en respuesta a la concentración de PicCr ni al tiempo de ingesta (Chavira, 2017). Nuestros resultados muestran incremento en la proporción de espermatozoides II en los animales tratados con PicCr, que podría interpretarse como una respuesta del epitelio germinal de alcanzar la cuota espermática normal. Cabe mencionar que 35 días después de haber suspendido la ingesta del suplemento, no se observó recuperación de los parámetros seminales a valores normales. (Chavira, 2017).

En resumen, proponemos que la ingesta de PicCr por 35 días modifica el patrón de desarrollo de la línea germinal.

Conclusiones

- ❖ La ingesta de PicCr por 35 días no modificó el diámetro tubular.
- ❖ El tratamiento con PicCr disminuyó la proporción de espermatogonias entre el 40 y 60%.
- ❖ La administración PicCr disminuyó el porcentaje de espermatocitos I, espermatocitos II y espermátidas (60-80%).
- ❖ En los animales sometidos a la ingesta de 1.2 μg de PicCr aumentó el porcentaje de espermatocitos II.

Bibliografía

- Adetunji P, Fayomi K y Orwig E. (2018). Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Research* **29**: 207–214
- Albert L. (1997). Biblioteca virtual de desarrollo sostenible y salud ambiental (BVSDE). Cromo, Capítulo 14. Organización Panamericana de la Salud. OMS. Washington, D.C.
- Alvarado A, Blanco R, Mora E. (2002). El cromo como elemento esencial en los humanos. *Rev. Costarric. Cienc. Méd.*, **231**: 55-68.
- Anderson R. (1998). Effects of chromium on body composition and weight loss. *Nutrition Reviews*, **56**: 266-270.
- Auchus RJ. (2015). Human Steroid Biosynthesis. En: *Physiology of Reproduction*. Cap. 8. Cuarta Edición. E. Knobil y J. Neill, Eds. Elsevier, San Diego, California, USA. 295-312.
- Barbieri R. (2001). Infertilidad. En: *Endocrinología de la reproducción*. 4° edición. S. Yen, R. Jafe y R. Barbieri Editores, Editorial Médica Panamericana, Argentina.
- Barret K, Barman S, Boitano S y Broos H. (2010). *Ganong, fisiología médica*, 23° edición, Mc Graw Hill, México.
- Bailey M, Boohaker J, Sawyer R, Behling J, Rasco J, Jernigan, J, Hood R y Vincent J. (2006). Exposure of pregnant mice to chromium picolinate results in skeletal defects in their offspring. *Birth Defects Research. B.* **77**: 244-246.
- Berner T, Murphy M, Slesinski J. (2004). Determining safety of chromium tripicolinate for addition to foods as nutrient supplement. *Food Chemical Toxicology*, **42**: 1029-1042.
- Boron W, Boulpaep E. (2017). *Fisiología Médica*, 3° edición. Elsevier, España, S.L.U.
- Bookstein F. (1991). *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge University Press, Cambridge. Bookstein F.L., 1996a. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. *Bull. Math. Biol.* **58**: 313–365.
- Bustos I y Díaz O. (1999). Ultrastructure of mouse teratozoospermia induced by Parathion. *Asian Journal of Andrology*. **1**: 1-2.
- Calabrese E. (2004). Hormesis: a revolution on toxicology, risk assessment and medicine *EMBO Journal*. **5**: S37-S40.

- Calabrese J y Baldwin A. (2002). Defining Hormesis. Human and Experimental toxicology **21**: 91-97.
- Casabiell X. (2006). Endocrinología. Arce y col. Eds. Universidad de Santiago de Compostela. Pp. 89-94.
- Castell L, Burke L, Stear S, Pearce J, Borchers J, Kaeding C, Rawson E, y Shaw G. (2016). British Journal of Sports Medicine reviews: A–Z of nutritional supplements: dietary supplements, sports nutrition foods and ergogenic aids for health and performance Part 6. Br. J. Sports. Med. **44**: 609–661.
- Cerulli J, Grabe D, Gauthier I, Malone M y Mcgoldrick M. (1998). Chromium picolinate toxicity. Ann Pharmacother, **32**: 428-431.
- Chávez N. (2013). Efecto de la ingesta diaria de picolinato de cromo sobre la respuesta ovulatoria, la fertilidad y el desarrollo prenatal de la progenie del ratón adulto. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Chavira S. (2017). Efectos del picolinato de cromo sobre la calidad espermática del ratón adulto. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Clermont Y. (1963). The cycle of the seminiferous epithelium in man. Am. J. Anat. **112**: 35–51.
- COFEPRIS. (2010). Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. Ley General de Salud, Artículo 215, Fracción V. Disponible en: <http://www.gob.mx/cofepris/acciones/suplementos-alimenticios-62063>.
- Córdoba A, Baily E, Zusi L, Blasco R, Mompert M y Llorca O. (2003). Fisiología dinámica, Editorial CEP, Barcelona, España.
- Cuapio P, Rosas P, Rocha F, Domínguez R y Pellicer A. (2009). Effects of chromium picolinate on seminal parameters of young adult males. 9th International Congress of Andrology. Barcelona, España. **30**:118.
- Dohle G, Diemer T, Giwercman A, Jungwirth A, Kopa Z y Krausz C. (2010). Guía clínica sobre la infertilidad masculina. Asociación Europea de Urología.
- Drake R, Vogl W y Mitchell A. (2015). Gray, Anatomía para estudiantes, 3ª edición, Elsevier, España, S.L.U.

- Espinosa I. (2016). Efectos de la ingesta crónica de picolinato de cromo en la respuesta ovulatoria espontánea de ratones hembra adultos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Evans G y Johnson J. (1980). Characterization and quantitation of a zinc-binding ligand in human milk. *Pediatric Research*, **14**: 876-880.
- Evans G. (1996). The effect of chromium picolinate on insulin controlled parameters in humans. *Int. J. Biosocial Med. Res.* **11**: 163.
- Fernández-Pol J, Bono V y Johnson G. (1977). Control of growth by picolinic acid: Differential response of normal and transformed cells. *Proceedings of the National Academic Sciences* **74**: 2889-2893.
- Flores M. (2016). Efecto de la p-Cloroanfetamina en la expresión del receptor 5-HT7 y de la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y en la estructura de la gonada de la rata macho prepúber. Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Franca L, Ogawa T, Avarbock R, Brinster R y Russell L. (1998). Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod* **59**: 1371-1377.
- Gal I, López G, Velasco M, Prieto A y Montalvo J. (2007). Bases de la fisiología. Editorial Tebar. España. Pp. 468-484.
- Gallardo J. (2007). Evaluación del sistema antioxidante del semen normal. *Revista investigación clínica*. **59**: 42- 47.
- Gartner L y Hiatt J. (2008). Texto Atlas de Histología, 3^o Edición, Mc Graw Hill, México.
- Geneser F. (2000). Histología. Editorial Médica Panamericana, 3^o edición, Madrid, España.
- Gilbert S. (2005). Biología del desarrollo, 7^o Edición, Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana.
- Gómez-Chang E, Larrea F y Martínez-Montes F. (2012). Vías De Señalización Asociadas a La Esteroidogénesis. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, **15**: 24–36.
- Gómez A y Magaña P. (2003). Papel del cromo y del cinc en el metabolismo de la insulina. *Revista Médica IMSS*. **42**: 347-52.

- González J, Meseguer I, Martínez C, Aguilar V y Bernao A. (2006). Repercusiones del picolinato de cromo en el metabolismo proteico en función de la edad. *Nutrición Hospitalaria*. **21**: 709-714.
- Grant R, Coggan S, Smythe G. (2009). The physiological action of picolinic acid in the human brain. *International Journal of Tryptophan Research*, **2**: 71-79.
- Gropper S, Smith J y Groff J. (2009). *Advanced nutrition and human metabolism*. Fifth Edition. Edit. Cengage Learnin. Canada. 605 p.p.
- Gunes S, Al-sadaan M y Agarwal A. (2015). Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reproductive BioMedicine Online* **31**: 309–319.
- Guyton A y Hall J. (2016). *Tratado de fisiología medica 15ª Edición*, Editorial Elsevier, Mexico.
- Havel J. (2004). A scientific review: The role of chromium in insulin resistance. *Nutrition*, **21**:2-14.
- Haywood M, Spaliviero J, Jimenez M, King N, Handelsman D y Allan M. (2003). Sertoli and germ cell development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle-stimulating hormone alone or in combination with testosterone. *Endocrinology* **144**: 509–517.
- Hayes F, De Cruz S, Seminara S, Beopple P y Crowley W. (2001). Differential regulation of gonadotropin secretion by testosterone in the human male: absence of negative feedback effect of testosterone. *J Clin Endocrinol Metab*; **86**: 53-61.
- Hepburn D y Vicent J. (2003a). Tissue and subcellular distribution of chromium picolinate with time after entering the bloodstream. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **94**: 86-93.
- Hepburn D, Xiao J, Bindom S, Vincent J Y O'Donnell J. (2003b). Nutritional supplement chromium picolinate causes sterility and lethal mutations in *Drosophila melanogaster*, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**: 3766–3771.
- Imamoglu N, Uyamk F, Kocaglu G, Erdem O, Cem, L y Donmez H. (2008). Effect of chromium picolinate on micronucleus frequency and morphology of lymphocytes in calves. *Biol. Trace. Elem. Res.* **125**: 133–140.
- Jalón A, Martín J, Álvarez M, García J, Fernández J, Viña L y Jalón M. (2006). Infertilidad masculina, *Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria. SEMERGEN*. **32**: 223-232.

- Jana M, Rajaram A y Rajaram R. (2009). Chromium picolinate induced apoptosis of lymphocytes and the signaling mechanisms thereof. *Toxicology and Applied Pharmacology* **237**: 331–344.
- Jara A y González G. (2011). *Endocrinología*. Editorial Médica Panamericana. México. Pp.235-241.
- Jubiz W y Cruz E. (2007). Hipogonadismo masculino: Causas, genética, diagnóstico y tratamiento. *Colombia Médica* **38**: 1.
- Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Larry J y Loscalzo J. (2016). *Harrison, principios de medicina interna*, 19° edición, Mc Graw Hill.
- Kavlock J, Daston G, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray L y Kaattari S. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect.* **104**: 4: 15–740.
- Kerr J, Loveland M y O’Brayan M. (2006). Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. En: *Physiology of Reproduction*. Cap. 18. Tercera Edición. E. Knobil y J. Neill, Eds. Elsevier, San Diego, California, USA. 827-948.
- Knoblaugh S y True L. (2012). Male reproductive system. 285-308 En: *Comparative Anatomy and Histology A Mouse and Human Atlas*. Piper M, Treuting S, Dintzis Denny y Frevert C. Eds. Elsevier Inc.
- Komárek V. (2004). Anatomía general capítulo 8 en el ratón de laboratorio, editado por: Hans Hedrich, Gillian Bullock y Peter Prutz, editorial Elsevier.
- Komorowski J, Cefalu W. (2001). JCR-LA-cp rats showed improved lipid profiles in response to diets containing chromium picolinate and biotin. *Appetite*. **36**:230.
- Lee W, Mason A, Schwall R, Szonyi E y Mather J. (1989). Secretion of Activin by interstitial cells in the testis. *Science* **243**: 396-398.
- Levine H, Jørgensen N, Martino A, Mendiola J, Dan wesker D, Mindlis I, Pinotti R y Swan S. (2017). Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update*. **23**: 646–659.
- Luna F. (2013). Infertilidad en latinoamérica. En busca de un Nuevo modelo. *Revista de bioética y derecho*. **28**: 33-47.

- Maeda K, Ohkura S, Tsukamura H. (2000). Spermatogenesis and testicular functions. En: Laboratory rat. Handbook of experimental animals. OIAcademic Press. EUA. Pp. 145-176.
- Manyoats K, Yazzie M y Stearns D. (2002). Ultrastructural damage in chromium picolinate-treated cells: a TEM study. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **7**: 791-798.
- Marcus R, Coulston A. (1990). The vitamins. En: Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P, Eds., Mc- Graw-Hill. INC, New York, 1524-1527 p.p.
- Marín J. (2017). Participación del cromo y ácido picolínico en la respuesta ovulatoria del ratón hembra adulto sometido a la ingesta prolongada de picolinato de cromo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Mattson M. (2008). Hormesis definided. *Ageing Research Reviews* **7**:1-7.
- Mascarenhas M, Flaxman S, Boerma T, Vanderpoel S y Stevens G. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PloS Med.* **9**.
- McLachlan R, O'Donnell L, Meachem S, Stanton P, de Kretser D, Pratis K y Robertson D. (2002^a). Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Progress in Hormone Research* **57**:149–179.
- McLaren A. y Southee D. (1997). Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Developmental Biology.* **1**:107-113.
- Megías M, Molist P y Pombal M. (2018). Atlas de Histología Vegetal y Animal. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Universidad de Vigo, España.
- Méndez N, Ayala M, Huerta R, Guerrero O, Hernández M y Aragón M. (2014). Prepuberal male rats with high rates of germ-cells apoptosis present exacerbated rates. *Reproduction, fertility and Development.*
- Mima M, Greenwald D y Olhander S. (2018). Environmental Toxins and Male Fertility. *Current Urology Reports* **19**: 50.
- Mirasol F. (2000). Chromium picolinate market sees robust growth and high demand. *Chemical Market Reporter* **257**.

- Montalvo C. (2010). Manual De Prácticas, Biología Celular e Histología Médica, Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM.
- MPCA. Minnesota Pollution Control Agency.(2008). Endocrine Disrupting Compounds. A Report to the Minnesota Legislature.
- Mruck D y Cheng C. (2011). Desmosomes in testis. *Spermatogenesis*. **1**: 47-51.
- Müller J y Skakkebaek N. (1983). Quantification of germ cells and seminiferous tubules by stereological examination of testicles from 50 boys who suffered from sudden death. *Int. J. Androl*. **6**: 143–156.
- National Research Council. (1989). Recommended dietary allowances. The most authoritative source of information on nutrient allowances for healthy people. 10th Edition. National Research Council, Washington, 241-243 p.p.
- Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf
- Oakberg E. (1956). Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am. J. Anat*. **99**: 507–516.
- Olivera M, Ruiz T, Tarazona A y Giraldo C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. **19**: 426-436.
- OMS. (2010). Infertility. Report of a meeting on “Medical, Ethical and Social Aspects of Assisted Reproduction” held at WHO headquarters in Geneva. Vayena E, Rowwe PJ y Griffin PD. Ginebra Eds., 396 p.p.
- Ortavant R. (1958). La cycle spermatogenetique chez le Belier. Thesis, University of Paris.
- Ortega C. (2011). Efectos del Picolinato de cromo sobre la esteroidogénesis y la integridad cromosómica de las células de la granulosa en cultivo. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Phillips B, Gassei K y Orwin K. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Phil. Trans. R. Soc*. **365**: 1663–1678.

- Poirot C y Cherruau B. (2005). Infertilidad masculina. Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. **39**: 225-41.
- Prieto B y Vázquez M. (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de las Gonadotrofinas. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM, Rev Fac Med UNAM. **45**: 252-257.
- Rajkovic A, Stephanie A, Pangas, Matzuk M. (2006). Follicular Development: Mouse, Sheep and Human Models. En: Physiology of Reproduction. Cap. 10. Tercera Edición. E. Knobil y J. Neill, Eds. Elsevier, 383-474.
- Rodríguez F, Crovetto M, González A, Morant N y Santibáñez F. (2011). Consumo de suplementos nutricionales en gimnasios, perfil del consumidor y características de su uso. Rev Chil. Nutr. **38**: 157-166.
- Rosas R. (2007). Infertilidad masculina. Causas, diagnóstico y tratamiento. Ámbito farmacéutico. Divulgación sanitaria. **26**: 70-75.
- Rossenrunge E y Giesel L. (1950). Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat, Department of Anatomy, University of Louisville, School of Medicine, Louisville, Kentucky.
- Roset M. (1992). Suplementación nutricional, AFEPADI, Asociación de empresas de dietéticos y complementos Alimenticios. Capítulo 1: 16, Editorial Agrícola española, S.A.
- Rozell T. y Okrainetz J. (2009). Molecular Endocrinology. Capítulo 14: FSH: Una hormona con múltiples formas o una familia con multiples hormonas. Editor: Chredrese, P. Editorial Springer.
- Ruwanpura S, McLachlan R y Meachem S. (2010). Hormonal regulation of male germ cell development. Prince Henry's Institute of Medical Research, Clayton, Victoria 3168, Australia. REVIEW.
- Sans M. (2004). Estudio biológico de *Mus domesticus ruttii*, 1772 en una zona de polimorfismo robertsoniano. Facultad de Medicina. Departamento de Biología Animal. Barcelona. p.p. 110.
- Schteingart H. (1989). Regulación hormonal y parácrina de la célula de Sertoli, Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires.

- Silva F, Leite L y Wassermann G. (2002). Rapid signal transduction in Sertoli cells. *European Journal of Endocrinology* **147**: 425–433.
- Skinner M y Griswold M. (1980). Sertoli Cells Synthesize and Secrete Transferrin-like Protein. From the Biochemistry/Bwphysics Program, Washington State University, Pullman, Washington 991-964.
- Speetjens J, Collins R, Vincent J y Worski S. (1999). The nutrition supplement chromium (III) Tris (picolinate) cleaves DNA. *Chemical Research in Toxicology*, **12**: 283-487.
- SS. (1997-2006). Secretaría de Salud. Ley General de Salud, Artículo 215, Fracción V. Disponible en: http://www.salud.gob.mx/lgs/LEY_GENERAL_DE_SALUD.pdf.
- Stearns D, Wise J, Patierno S y Wetterhahn K. (1995). Chromium (III) picolinate produces chromosome damage in Chinese hamster ovary cells. *The FASEB Journal*. **9**: 1643-1648.
- Toro M, Manríquez G y Suazo I. (2010). Morfometría Geométrica y el Estudio de las Formas Biológicas: De la Morfología Descriptiva a la Morfología Cuantitativa. *Int. J. Morphol.* **28**: 977-990.
- Tresguerres JAF. (2010). *Fisiología Humana*. 4a Edición. McGraw-Hill Interamericana México, pp. 1041-1058.
- Underwood L, D'Ercole A, Clemmons D y Van Wyk J. (1986). Paracrine functions of somatomedins. *Clin. Endocr. Metab.* **15**: 59-77.
- Urroz C. (2000). *Elementos de Anatomía y Fisiología animal*. EUNED. Costa rica. Pp.191-195.
- Vincent J. (2000). The Biochemistry of chromium. *The Journal of Nutrition*. **130**: 715-718.
- Vincent J. (2001). The Bioinorganic Chemistry of Chromium (III). *Polyhedron*, **20**: 1-26.
- Vincent, J. (2004). Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. *Proceedings of the Nutrition Society*, **63**: 41-47.
- Vincent J y Stallings D. (2007). Introduction: A history of Chromium studies (1955-1995). In *The Nutritional Biochemistry of Chromium (III)*. Elsevier. Amsterdam. **13**: 978.
- Walker K, Bembem M, Bembem D y Knehans A. (1998). Chromium Picolinate Effects on Body Composition and Muscular Performance in Wrestlers. *Med. Sci. Sports Exerc.* **30**: 1730-1737.

- Walter W, Feldman N, D'Agati V. (1997). Chronic renal failure after ingestion of over-the-counter chromium picolinate. *Ann Inter Med.* **126**: 410.
- Yamamoto A, Wada O y Suzuki H. (1988). Purification and properties of biologically active chromium complex from bovine colostrum. *Journal of Nutrition* **118**: 39–45.