

Original

## Repercusiones del picolinato de cromo en el metabolismo proteico en función de la edad

M. J. González Muñoz, I. Meseguer, M. C. Martínez Para, M. V. Aguilar y A. Bernao

*Dpto. de Nutrición, Bromatología y Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares. Madrid. España.*

### Resumen

**Antecedentes:** Comercializado como suplemento dietético, el picolinato de cromo ha sido promocionado como constructor muscular y como un agente de pérdida de peso, al incrementar el músculo esquelético por su acción sobre la insulina.

**Objetivo:** En este estudio se ha evaluado el efecto que, la suplementación de la dieta de ratas en distintas etapas de crecimiento (infantil y puberal), con 500 µg Cr/día en forma de picolinato de cromo (12 días), tiene sobre su crecimiento y utilización proteica.

**Resultados y discusión:** Los resultados obtenidos indican que el picolinato de cromo no ejerce un efecto significativo sobre el crecimiento, ingesta de alimento, aprovechamiento de alimento y utilización de nutrientes, especialmente proteínas, en ninguno de los estadios de desarrollo estudiados. Asimismo, se ha comprobado la escasa repercusión de la suplementación de este compuesto sobre la masa corporal que, en cualquier caso, sería atribuible a su capacidad para disminuir el catabolismo proteico, más que a una activación de la acción de la insulina.

**Conclusiones:** Dado que la utilización del picolinato de cromo podría comprometer el correcto funcionamiento renal y sus efectos beneficiosos no son evidentes, su consumo debería realizarse con mucha precaución.

(*Nutr Hosp.* 2006;21:709-714)

Palabras clave: *Picolinato de cromo. Masa muscular. Crecimiento.*

### REPERCUSSIONS OF CHROMIUM PICOLINATE IN THE PROTEIN METABOLISM BASED ON THE AGE

#### Abstract

**Antecedents:** Commercialized like dietetic supplement, chromium picolinate has been promoted to favour the increase of muscle mass and the loss of weight, due to its' effect on the action of insulin.

**Objective:** To evaluate the effect of supplementation of the diet with chromium (500 µg/kg) in the form of chromium picolinate (CrPic) (12 days) on growth and protein turnover in rats at different growth stages (infantile and puberal).

**Results and discussion:** No significant effect of CrPic on bodyweight gain, feed intake and feed conversion rate was observed at any of the stages of development studied. CrPic seems to increase the muscle mass, either by stimulating protein anabolism due to the involution of the insulin by chromium, or by reducing protein catabolism.

**Conclusions:** Since the use of chromium picolinate could jeopardize the correct renal function and its' beneficial effects are not evident, it should always be consumed with caution.

(*Nutr Hosp.* 2006;21:709-714)

Key words: *Chromium picolinate. Muscular mass. Growth.*

---

**Correspondencia:** Dra. M.<sup>a</sup> José González Muñoz.  
Dpto. de Nutrición, Bromatología y Toxicología.  
Facultad de Farmacia.  
Universidad de Alcalá.  
Ctra. Madrid-Barcelona, km. 33,6.  
28871 Alcalá de Henares. Madrid.  
E-mail: mariajose.gonzalez@uah.es

Recibido: 23-V-2005.  
Aceptado: 31-XI-2005.

## Introducción

En los últimos años, los efectos de la suplementación con picolinato de cromo (Pic-Cr) sobre la composición corporal, ha suscitado una fuerte polémica entre los distintos investigadores.

Unos atribuyen a este compuesto efectos beneficiosos, derivados de la alteración de la tasa de internalización de la insulina<sup>1</sup> y mejora, por tanto, de la acción de la enzima, que se traduce en un incremento en la masa magra y una disminución de la masa grasa y el peso corporal<sup>2</sup>.

Sin embargo, otros estudios han revelado que los posibles efectos beneficiosos del Pic-Cr son mínimos o nulos<sup>3,4</sup>, e incluso se han detectado posibles repercusiones negativas como consecuencia de la acumulación de cromo en distintos órganos como hígado y riñón<sup>5</sup>, sugiriéndose la posibilidad de mutagénesis y carcinogénesis<sup>6</sup>.

Ante tal controversia, en este trabajo se pretende conocer la repercusión que la administración subcrónica de una dosis de esta forma biológicamente activa de cromo tiene sobre el crecimiento y utilización proteica de animales en las principales etapas de desarrollo, como son la edad infantil y la edad puberal.

## Materiales y métodos

### *Animales y protocolo experimental*

El protocolo usado ha sido autorizado por la Comisión Española de la Comisión Internacional de Ciencia y Tecnología y por una Comisión Interna de la Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá.

Se ha utilizado dos lotes de ratas Wistar macho, procedentes del Centro de Investigación Animal de la Universidad de Alcalá (n = 40). El primer lote corresponde a ratas recién destetadas, con un peso inicial aproximado de 30-35 g. El segundo lote se trata de ratas en edad puberal, con pesos iniciales de aproximadamente 100 g. Los animales de ambos lotes han sido divididos aleatoriamente, en dos grupos (n = 10), administrándoles al primero diariamente, durante 12 días, cromo en una concentración de 500 µg Cr/día en forma de picolinato, mediante una sonda esofágica. El segundo grupo corresponde al control, al cual se le administró agua destilada (miliQ).

Las ratas se han ubicado en jaulas metabólicas individuales, en condiciones de temperatura y humedad constantes (21° ± 1° C y 55% ± 10%, respectivamente) y un ciclo diario de doce horas de luz y doce de oscuridad. Durante todo el experimento, los animales tuvieron libre acceso al alimento y al agua.

El picolinato de cromo ha sido sintetizado siguiendo el método descrito por Evans y Bowman<sup>2</sup>. Completado el periodo experimental, los animales han sido sacrificados mediante punción de la aorta descendente, previa anestesia con éter dietílico. Posteriormente se han extraído las carcasas por el procedimiento del

desuello, previa evisceración, tras eliminación de la cabeza y las extremidades y cola. El hígado y el músculo gastrocnemio, una vez extraídos, se procesaron para la determinación de la catepsina A.

### *Determinaciones analíticas*

La evaluación del nitrógeno presente en orina, heces y carcasa se ha llevado a cabo mediante el método de Kjeldahl<sup>7</sup>. Las condiciones de preparación de la muestra han sido diferentes en función del tipo y naturaleza de la misma. Las carcasas de los animales han sido pesadas y sometidas a un proceso previo de maceración con 250 ml de ácido sulfúrico durante dos semanas, a temperatura ambiente, en un matraz Kjeldahl de 500 ml.

Para la determinación de la proteína plasmática total se ha utilizado el método de Bradford<sup>8</sup>. La evaluación de la urea se ha efectuado siguiendo el método de Berthetot<sup>9</sup> y la creatinina mediante el método de Siedel y cols.<sup>10</sup>

La actividad de la catepsina A en hígado y músculo gastrocnemius ha sido evaluada mediante una determinación colorimétrica con ninhidrina, de la tirosina liberada por la enzima, utilizando como sustrato N-carboxibenzoxi-L-glutamyl-L-tirosina (N-CBZ-Glu-Tyr)<sup>11</sup>.

### *Determinación de los Índices Biológicos*

Los diferentes *índices basados en el crecimiento corporal* han sido calculados usando las siguientes ecuaciones:

- *Velocidad de Crecimiento Relativa (VCR)*:  $100 \times [\text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)}] / \text{peso inicial}$ .
- *Índice de Transformación (IT)*:  $\text{Alimento ingerido (g)} / \text{Incremento de peso (g)}$ .
- *Coficiente de Eficacia Proteica (CEP)*:  $\text{Incremento peso (g)} / \text{Proteína consumida (g)}$ .

Las fórmulas matemáticas empleadas para calcular los *índices nutritivos proteicos* han sido las siguientes:

- *Balance de Nitrógeno (BN)*:  $BN = N_{\text{ingerido}} - [(N_f - N_{\text{ef}} + N_u - N_{\text{ue}})]$ , siendo  $N_f = N$  total fecal;  $N_{\text{ef}} = N$  endógeno fecal;  $N_u = N$  urinario total y  $N_{\text{ue}} = N$  urinario endógeno.
- *Valor biológico verdadero (VBV)*:  $VBV = N_{\text{retenido}} / N_{\text{absorbido}}$
- *Coficiente de digestibilidad verdadera (CDV)*:  $CDV = (N_{\text{absorbido}} / N_{\text{ingerido}}) \times 100$ .
- *Coficiente de Utilización Proteica Neta (CUPN)*:  $CUPN = CDV \times VBV$ .

### *Análisis estadísticos de los resultados*

Los resultados obtenidos, expresados como media ± DS, han sido procesados mediante el paquete esta-

dístico “Statgraphics”, con el que se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial.

## Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas I-IV.

La velocidad relativa de crecimiento representa la ganancia de peso del animal respecto a su peso inicial, permitiendo comparar el crecimiento de diferentes lotes de animales de forma más objetiva que mediante

las curvas de crecimiento, ya que, rara vez, éstas son perfectamente lineales.

Los animales controles en edad puberal presentan VCR superiores a los animales en edad infantil, si bien las diferencias no son estadísticamente significativas (tabla I). Hay que tener en cuenta que durante la adolescencia se producen cambios, sobre todo a nivel hormonal, que hacen que ésta sea la etapa de desarrollo más importante de la vida<sup>12</sup>.

El tratamiento con Pic-Cr ha originado una disminución de la VCR de los dos lotes estudiados, alcan-

**Tabla I**  
*Influencia de 500 µg/g Cr/día (picolinato de cromo) en el crecimiento de ratas en edad infantil y puberal. Índices de crecimiento*

	<i>Edad Infantil</i>		<i>Edad puberal</i>	
	<i>Control</i>	<i>Pic-Cr</i>	<i>Control</i>	<i>Pic-Cr</i>
VRC	102,3 ± 10,8	100,9 ± 15,8	111,6 ± 9,5	69,4 ± 9,8*
IT	1,28 ± 0,12	1,27 ± 0,09	0,92 ± 0,16	1,03 ± 0,08
CEP	5,57 ± 0,55	5,56 ± 0,42	7,94 ± 1,39	6,89 ± 0,53

\* Diferencias estadísticamente significativas p < 0,05 respecto al control.

Pic-Cr: picolinato de cromo.

**Tabla II**  
*Influencia de 500 µg/g Cr/día (picolinato de cromo) en el crecimiento de ratas en edad infantil y puberal. Índices nutritivos proteicos*

	<i>Edad Infantil</i>		<i>Edad puberal</i>	
	<i>Control</i>	<i>Pic-Cr</i>	<i>Control</i>	<i>Pic-Cr</i>
N ingerido	1,15 ± 0,05	1,07 ± 0,03	1,29 ± 0,20	1,28 ± 0,13
BN	0,438 ± 0,04	0,476 ± 0,06	0,476 ± 0,09	0,530 ± 0,17
CDV	84,11 ± 3,15	81,20 ± 6,76	84,42 ± 1,96	81,69 ± 1,41
VBV	46,16 ± 4,68	38,69 ± 6,81	37,16 ± 6,52	49,19 ± 9,84
CUPN	3.874 ± 272	3.173 ± 787	3.143 ± 623	4.010 ± 1.002
% Proteína carcasa	8,97 ± 1,60	5,95 ± 1,89*	17,77 ± 0,57	15,94 ± 3,94

\* Diferencias estadísticamente significativas p < 0,01 respecto al control.

Pic-Cr: picolinato de cromo.

**Tabla III**  
*Influencia de 500 µg/g Cr/día (picolinato de cromo) en el crecimiento de ratas en edad infantil y puberal. Parámetros bioquímicos*

	<i>Edad Infantil</i>		<i>Edad puberal</i>	
	<i>Control</i>	<i>Pic-Cr</i>	<i>Control</i>	<i>Pic-Cr</i>
Proteínas plasmáticas (µg/ml)	0,725 ± 0,01	0,733 ± 0,02	0,843 ± 0,04	0,839 ± 0,03
Urea plasmática (mg/dl)	82,37 ± 10,5	86,61 ± 9,31	44,03 ± 2,97	48,59 ± 6,66
Urea en orina (g/dl)	1,69 ± 0,80	0,91 ± 0,63*	3,63 ± 0,99	1,46 ± 0,30*
Creatinina plasmática (mg/dl)	2,12 ± 1,34	2,43 ± 0,32	1,44 ± 1,56	1,32 ± 0,33
Creatinina en orina (mg/dl)	20,50 ± 5,58	16,95 ± 3,25	7,32 ± 2,74	6,65 ± 5,44

\* Diferencias estadísticamente significativas p < 0,01 respecto al control.

Pic-Cr: picolinato de cromo.

actuar secuestrando el cinc, favoreciendo así su eliminación por orina.

Los índices que indican el aprovechamiento del alimento (IT y CEP) han resultado similares en los grupos controles y tratados de ambos lotes. Sin embargo, puede apreciarse que los animales que crecen menos, presentan un IT ligeramente superior, indicativo de un peor aprovechamiento del alimento para el crecimiento, así como un CEP superior, indicando un menor aprovechamiento del nitrógeno ingerido.

Respecto a los índices bioquímicos, los niveles de urea urinaria en todos los grupos tratados han sido significativamente ( $p < 0,01$ ) inferiores a los controles. Esto parece indicar una reducción del catabolismo proteico producida por el Pic-Cr y que, consecuentemente, ocasionaría una disminución de los niveles de creatinina, y especialmente, de urea.

El descenso en los niveles de urea excretada, podría también ser indicativo de una alteración en la actividad renal originada por el Pic-Cr. De acuerdo con MacKenzie y cols.<sup>22</sup>, concentraciones elevadas de cromo dan lugar a alteraciones de la actividad renal debidas a la nefrotoxicidad de este metal. Un estudio llevado a cabo por Cerulli y cols., sobre la toxicidad del Pic-Cr concluye que suplementos de este compuesto de cromo, puede causar serios daños renales cuando es ingerido en exceso<sup>23</sup>. Así, Walter y cols.<sup>24</sup> aportan un caso de fallo renal crónico en una paciente que había ingerido 600  $\mu\text{g}$  de Pic-Cr diariamente durante 6 semanas. Los datos de la autopsia confirmaron el diagnóstico de nefrotoxicidad inducida por cromo, al presentar una nefritis intersticial típica de la exposición a metales pesados. En el mismo sentido, Bagchi y cols.<sup>25</sup> atribuyen la toxicidad renal del Pic-Cr al ácido picolínico.

Este posible daño renal podría ser responsable de la disminución, no significativa, de los niveles de creatinina excretados tras la suplementación con Pic-Cr, especialmente en los animales más pequeños, aunque este efecto podría estar relacionado con la activación de la insulina por el cromo. La diabetes incrementa la excreción de creatinina en orina<sup>26</sup>, por lo que la activación de la insulina podría causar el efecto opuesto.

Estos resultados contrastan con los aportados por Page y cols.<sup>27</sup> y Bunting y cols.<sup>28</sup>, quienes no han encontrado diferencias significativas en la excreción de estos metabolitos tras la administración de Pic-Cr en cerdos y terneras, respectivamente. Esta aparente contradicción puede atribuirse al hecho de que las dosis de Pic-Cr administrado por estos autores fueron muy diferentes a la utilizada en nuestro estudio (100 y 200  $\mu\text{g}$  Cr/día).

Los niveles de proteína sérica no resultaron alterados por la suplementación de Pic-Cr, de acuerdo a resultados obtenidos por otros autores<sup>29</sup>.

El Pic-Cr parece causar una reducción en el catabolismo proteico, como sugiere la disminución, no significativa, de la actividad de la catepsina A hepática y muscular en ambos lotes. Estos efectos, sin embargo, no se traducen en un incremento de peso o niveles de

proteínas corporales totales, por lo que cualquier posible efecto anabólico del cromo debido a la acción de la insulina parece ser marginal<sup>30</sup>.

La catepsina A es una carboxipeptidasa lisosomal sérica cuyo significado fisiológico y patológico no está perfectamente definido<sup>31</sup>. *In vitro*, esta enzima es capaz de hidrolizar e inactivar péptidos bioactivos, tales como la angiotensina I y la insulina<sup>31</sup>. Por tanto, una reducción en la actividad de la catepsina A podría implicar un incremento en la acción de la insulina. Es sabido que la insulina retarda la ruptura o catabolismo de las proteínas corporales.

En un estudio llevado a cabo por Marzo y cols.<sup>32</sup> se estableció la relación de catepsina A y crecimiento. Estos autores estudiaron la actividad proteolítica en pájaros alimentados con ácido tánico, observando que estos animales mostraban una reducción significativa ( $p < 0,01$ ) en la tasa de crecimiento, eficacia proteica y peso de hígado, junto con un incremento significativo ( $p < 0,01$ ) en la actividad de la catepsina A hepática. Por tanto, una actividad de catepsina incrementada podría estar asociada con un balance de crecimiento negativo. Así, el efecto del Pic-Cr sobre la actividad muscular y hepática de catepsina A, podría ser indicativo de un potencial efecto positivo sobre el crecimiento, aunque este hecho no ha sido constatado en el presente estudio.

## Conclusión

La suplementación en la dieta de ratas en periodos claves de crecimiento (infantil y juvenil), parece no ejercer un efecto significativo sobre el crecimiento, ingesta de alimento, aprovechamiento de alimento y utilización de nutrientes, especialmente de proteínas.

El efecto del picolinato de cromo sobre la masa corporal, además de no ser significativo, sería totalmente marginal y atribuible, más que a su acción sobre la activación de la insulina, a su capacidad para disminuir el catabolismo proteico.

El picolinato de cromo parece ejercer menor influencia en animales con un crecimiento mayor, al poseer mayor grado de madurez que los infantiles. Por otra parte, el grupo de edad puberal ha alcanzado su óptimo crecimiento y, a su vez, reciben una gran influencia hormonal, factores éstos que pueden limitar el efecto de cualquier factor que afecte al crecimiento, como pueda ser el Pic-Cr.

El consumo de este compuesto, además, podría comprometer el buen funcionamiento renal, por lo que debería realizarse con mucha precaución.

## Referencias

1. Evans GM, Bowman TD: Chromium picolinate increase membrana fluidity and rate of insulin internalization. *J Inorg Biochem*, 1992; 46 (4): 243-250.
2. Coleman E: The chromium picolinate weight loss scam. [<http://cyberwarped.com/gcahf/contrib/coleman/chromium.html>], 1997.

**Tabla IV**  
*Actividad de la catepsina A hepática muscular en animales controles y tratados con picolinato de cromo (nkat/g)*

	<i>Edad Infantil</i>		<i>Edad puberal</i>	
	<i>Control</i>	<i>Pic-Cr</i>	<i>Control</i>	<i>Pic-Cr</i>
Hígado (nkat/g)	134,26 ± 34,01	115,68 ± 45,65	130,70 ± 41,74	106,80 ± 15,92
Músculo (nkat/g)	78,91 ± 35,19	44,92 ± 15,93*	96,96 ± 21,98	85,25 ± 13,12

\* Diferencias estadísticamente significativas  $p < 0,01$  respecto al control.  
Pic-Cr: picolinato de cromo.

zando significación ( $p < 0,05$ ) en los animales en edad puberal. Este hecho podría sugerir una ralentización en el crecimiento ejercida por este compuesto cromado.

Los valores de IT y el CEP indican que es el grupo de animales puberales el que aprovecha mejor el alimento para el crecimiento, ya que presentan IT menores y CEP superiores en relación a los animales más pequeños. La administración de  $500 \mu\text{g Cr/día}$  no ha afectado de forma significativa estos índices, en ninguno de los grupos estudiados.

Los índices nutritivos proteicos (BN, CDV, CUPN) no han experimentado variaciones significativas tras la suplementación con Pic-Cr, siendo también similares en los dos lotes estudiados (tabla II). Sin embargo, los animales en edad puberal han presentado un mayor porcentaje de proteína en la carcasa que los animales en edad infantil, lo que indicaría un mayor aprovechamiento de N para el crecimiento.

El contenido de proteínas de las carcasas de los animales en edad infantil tratados con Pic-Cr ha resultado ser significativamente inferior a los controles ( $p < 0,01$ ). Además, aunque sin alcanzar significación, el resto de los índices nutritivos proteicos se encuentran por debajo de los controles. De igual forma, la CDV y el VBV de los animales puberales tratados han sido inferiores a los controles. Estos resultados podrían indicar una menor ingestión, absorción y utilización de las proteínas en estos grupos suplementados con Pic-Cr, si bien, no se ha traducido en un efecto significativo sobre el crecimiento de los animales.

La tabla III recoge los valores obtenidos para los parámetros bioquímicos evaluados.

Los niveles de proteína sérica total han sido similares en los dos lotes, edad infantil y puberal, resultado esperable, ya que este parámetro solo varía cuando se producen grandes cambios en el metabolismo proteico, especialmente por un déficit extraordinario y prolongado de estos nutrientes.

La urea plasmática es un metabolito que aumenta en situaciones de degradación proteica, por lo que los animales que crecen a una mayor velocidad, edad puberal, tendrán niveles de urea menores que los que crecen a ritmo más lento, debido a que su anabolismo se encuentra incrementado respecto a los animales más pequeños. Por otra parte, los niveles de urea uri-

naria han experimentado una disminución significativa tras la administración del Pic-Cr en los dos grupos de animales.

Considerando los niveles de actividad de catepsina encontrados (tabla IV), el lote de edad puberal, presenta unos valores de actividad de catepsina mayores en el músculo y menores en el hígado que el de edad infantil; este hecho hace suponer que hay un incremento general del metabolismo, tanto para el metabolismo anabólico, mayor crecimiento, como para el catabolismo, mayor degradación, en el grupo juvenil. El Pic-Cr produce una disminución de la actividad enzimática muscular, significativa en el grupo infantil, sin alterar la actividad enzimática hepática.

## Discusión

El crecimiento de animales en las principales etapas de crecimiento (infantil y puberal) no se ha visto afectado de forma significativa por la suplementación de Pic-Cr, a tenor de los índices de crecimiento obtenidos: no se ha observado efecto significativo sobre la ganancia de peso, ingesta de alimento, conversión de alimento o utilización de nutrientes. Asimismo, el Pic-Cr tampoco parece tener una influencia relevante sobre el uso y absorción de las proteínas ya que el CDV, VBV y CUPN han sido similares en los animales control y en los grupos tratados. Estos índices relativos al metabolismo proteico ha resultado ser similares en los dos lotes de animales estudiados. Estos hallazgos están en consonancia con los resultados observados por distintos autores, al administrar dosis de Pic-Cr, similares a las empleadas en este trabajo, a diferentes especies de animales<sup>13-20</sup>.

La VRC parece estar afectada por la administración del Pic-Cr, especialmente en el periodo adolescente, donde las diferencias llegaron a ser significativas. Las menores VCR de los grupos tratados indican una ralentización del crecimiento de los mismos, atribuible probablemente al efecto del ácido picolínico sobre el metabolismo de ciertos elementos minerales. Así, en trabajos realizados por nuestro equipo<sup>21</sup>, se observó una reducción dosis-dependiente de los niveles de cinc tras la administración de las distintas dosis de picolinato, siendo la de  $500 \mu\text{g Cr/día}$  a la que se producía una mayor disminución. El ácido picolínico podría

3. Lukaski HC, Bolonchuk WW, Siders WA, Milne DB: Chromium supplementation and resistance training: effects on body composition, strength and trace elements status of men. *Am J Clin Nutr*, 1996; 63: 954-965.
4. Hallmark MA, Reynolds TH, DeSouza CA, Dotson DO, Anderson RA, Rogers MA: Effects of chromium and resistive training on muscle *strength and body composition*. *Medicine and Science Sports and Exercise*, 1996; 28: 139-144.
5. Marcus R, Coulston AM: The vitamins. En: Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P (eds), pp. 1524-1527, McGraw-Hill. INC, New York, 1990.
6. Stearns DM, Wise JP Sr, Patierno Sr, Wetterhahn KE: Chromium (III) picolinate produce chromosome damage in Chinese hamsters ovary cells. *FASEB J*, 1995; 9: 1643-1648.
7. Macarulla MT, Portillo P: Utilización nutritiva de proteínas y evaluación biológica de la calidad proteica. En: Fundamentos teórico-prácticos de nutrición y dietética. McGraw-Hill Interamericana Ed, pp. 151-157, Madrid, 1998.
8. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 248-254.
9. Faucett JK, Scott JE: A rapid and precise method for the determination of urea. *J Clin Pathol*, 1960; 156-159.
10. Siedel J, Ziegenhorn J: A new high performance test kit for the determination on serum cholesterol: verification of complete cholesterol ester hydrolysis by performance thin layer chromatography. *Am Assoc Clin Chem*. 1984; 35: 8-10.
11. Obled C, Arnall M, Valin C: Variation through the day of hepatic and muscular cathepsin A, C and E activities and free amino acids of blood in rats: influence of feeding schedule. *Br J Nutr*, 1980; 44: 61-69.
12. Eckert R: Fisiología animal, mecanismos y adaptaciones. Ed Interamericana McGraw-Hill. Madrid, pp 307-311, 1994.
13. Motozono Y, Hatano K, Sugawara N, Ishibashi T: Effects of dietary chromium picolinate on growth, carcass quality and serum lipids of female broilers. *Animal Sci Tech*, 1998; 69 (7): 659-665.
14. Motozono Y, Hatano K, Sugawara N, Ishibashi T: Effects of dietary chromium picolinate and yeast chromium on the growth and carcass fat of broilers. *Anim Sci Tech*, 1998; 69 (3): 247-252.
15. Morris GS: Effects of dietary chromium supplementation on cardiac mass, metabolic enzymes, and contractile proteins. *Nutr Res*, 1995; 15 (7): 1045-1052.
16. Min JK, Kim WY, Chae BJ, Chung IS, Han IK: Effects of chromium picolinate on growth performance, carcass characteristics and serum traits in growing-finishing pigs. *Asian-australas J Anim Sci*, 1997; 10 (1): 8-14.
17. Lien TF, Wu CP, Lin BH, Wang BJ, Lu JJ, Shiao TY: Effect of different protein and limiting amino acid levels coupled with a supplement of chromium picolinate on lipid metabolism and carcass characteristics of pigs. *Anim Sci Pencaitland*, 1998; 67 (3): 601-607.
18. Mooney KM, Cromwell GL: Efficacy of chromium picolinate on performance and tissue accretion in pigs with different lean gain potential. *J Anim Sci*, 1999; 77 (5): 1188-1198.
19. Matthews JO, Southern LL, Fernández JM, Pontif JE, Bidner TD, Odgaard RL: Effect of chromium picolinate and chromium propionate on glucose and insulin kinetics of growing barrows and on growth and carcass traits of growing-finishing barrows. *J Anim Sci*, 2001; 79 (8): 2172-2178.
20. Kim SW, Han IK, Choi KJ, Kim YH, Shin IS, Chae BJ: Effects of chromium picolinate on growth performance, carcass composition and serum traits of broilers fed different dietary levels of crude protein. *Asian-australas J Anim Sci*, 1995; 8 (5): 463-470.
21. Aguilar MV, Jorge AM, Mateos CJ y cols.: Efecto del picolinato de cromo en los niveles hepáticos de algunos elementos traza. *Nutr Hosp* 1995; 10(6): 373-376.
22. MacKenzie RD, Byerrum RU, Decker CF, Hoppert CA, Langham RF: Chronic toxicity studies (II) hexivalent and trivalent Cr administered in drinking water. *Arch Biochem* 1958; 232-234.
23. Cerulli J, Grabe DW, Gauthier I, Malone M, McGoldrick MD: Chromium picolinate toxicity. *Ann Pharmacother*, 1998; 32 (4): 428-31.
24. Walter WG, Feldman NS, D'Agati VD: Chronic renal failure after ingestion of over-the-counter chromium picolinate. *Ann Intern Med* 1997; 126 (5): 410.
25. Bagchi D, Stohs SJ, Downs BW, Bagchi M, Preuss HG: Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* 2002; 180 (1): 5-22.
26. Manual Norton. Laboratorios Normon Ed. pp. 158-159. Madrid, 1985.
27. Page TG, Southern LL, Ward TL, Thompson DL Jr: Effect of chromium picolinate on growth and serum and carcass traits of growing finishing pigs. *J Anim Sci* 1993; 71: 656-662.
28. Tang L, Li-Defa Wang FL, Xing JJ, Gong LM: Effects of different sources of organic chromium on immune function in weaned pigs. *Asian-australas J Anim Sci* 2001; 14 (8): 1164-1169.
29. Buttery PJ, Dawson JM: Growth promotion in farm animals. *Proc Nutr Soc* 1990; 57: 459-466.
30. Ostrowska H: Cathepsin A-like activity in thrombin-activated human platelets substrate specificity, pH dependence, and inhibitory profile. *Thrombosis Res* 1997; 1: 393-404.
31. Matsuda K: Studies on cathepsins of rat liver lysosomes. III. Hydrolysis of peptides, and inactivation of angiotensin and bradykinin by cathepsin A. *J Biochem* 1976; 80 (4): 659-69.
32. Marzo F, Urdaneta E, Santidrian S: Liver proteolytic activity in tannic acid-fed birds. *Poult Sci* 2002; 81 (1): 92-4.