



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

**“EVALUACIÓN DE INDICADORES DE LA MADURACIÓN ESPERMÁTICA
EPIDIDIMARIA DE LA RATA WISTAR EXPUESTA A CADMIO”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN ANIMAL**

PRESENTA

BIÓL. JOEL HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ.

CODIRECTORAS

DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA.

DRA. ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR.

ASESORA

DRA. EDITH ARENAS RÍOS.

Ciudad de México, 22 de noviembre del 2016.

COMITÉ TUTORIAL

Codirectora

Dra. Marcela Arteaga Silva.

Profesora-Investigadora. Titular "C" T.C.
Laboratorio de Neuroendocrinología Reproductiva (S-338).
Área de Biología Conductual y Reproductiva.
Departamento en Biología de la Reproducción.
DCBS. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
Arteaga1967@hotmail.com

Codirectora

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor.

Investigadora en Ciencias Médicas.
Laboratorio de Biología de la Reproducción.
Instituto Nacional de Pediatría.
rmviguera@yahoo.com.mx

Asesora

Dra. Edith Arenas Ríos.

Profesora-Investigadora. Titular "C" T.C.
Laboratorio de Reproducción Animal Asistida (S-234).
Área de Reproducción Animal Asistida.
Departamento de Biología de la Reproducción.
DCBS. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
editharenas2000@yahoo.com.mx

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Dra. Edith Arenas Ríos.

Laboratorio de Reproducción Animal Asistida (S-234).
Área de Reproducción Animal Asistida.
Departamento de Biología de la Reproducción.
DCBS. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
editharenas2000@yahoo.com.mx

Dr. Sergio Montes López.

Investigador del Laboratorio de Neuroquímica,
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Dr. Manuel Velasco Suarez".
montesergio@yahoo.com

Dra. Ofelia Limón Morales.

Facultad de Química.
Universidad Nacional Autónoma de México.
ofelia.limon@yahoo.com

Dr. Francisco Javier Jiménez Trejo.

Investigador del Laboratorio de Biología de la Reproducción,
Instituto Nacional de Pediatría.
trejofj@hotmail.com

La Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Registro de la MBRA ante CONACYT: 003797.

El alumno Joel Hernández Rodríguez recibió apoyo del CONACyT, mediante el otorgamiento de una beca económica durante todo el tiempo de duración de los estudios en el posgrado. Número de registro CVU: 622536.

Extiendo un cordial y grato agradecimiento a la Universidad Autónoma Metropolitana y a las instancias que proporcionaron el apoyo para la realización del presente proyecto.

MIEMBROS DEL JURADO

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes aprobaron la tesis titulada: **“EVALUACIÓN DE INDICADORES DE LA MADURACIÓN ESPERMÁTICA EPIDIDIMARIA DE LA RATA WISTAR EXPUESTA A CADMIO”** con fecha de examen el día 22 de noviembre de 2016.



Presidente

Dra. Edith Arenas Ríos.

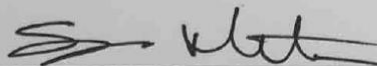
Laboratorio de Reproducción Animal Asistida (S-234).

Área de Reproducción Animal Asistida.

Departamento de Biología de la Reproducción.

DCBS. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

editharenas2000@yahoo.com.mx



Secretario

Dr. Sergio Montes López.

Investigador del Laboratorio de Neuroquímica,

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco Suarez”.

montesergio@yahoo.com



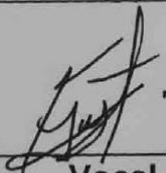
Vocal

Dra. Ofelia Limón Morales.

Facultad de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México.

ofelia.limon@yahoo.com



Vocal

Dr. Francisco Javier Jiménez Trejo.

Investigador del Laboratorio de Biología de la Reproducción,

Instituto Nacional de Pediatría.

trejofj@hotmail.com

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación lo dedico con gran cariño y aprecio a mis Papás: **Guadalupe y Eugenio**, por su gran valor como personas, quienes en todo momento y ocasión han creído en Mí, depositando su confianza en todo lo que he decidido realizar y en lo que aun espero cumplir, además de que han sido la base para que Yo pueda salir adelante, pues siempre he recibido de ellos dignos ejemplos de compromiso y superación, los cuales me permiten hoy poder alcanzar y cumplir una nueva meta. El apoyo e impulso de mis Papás me ha sido de gran ayuda y fortaleza en los momentos de gran dificultad durante mis estudios, y así mismo han sido motivo de orgullo en cada uno de los logros y éxitos alcanzados en mi etapa profesional.

Dedico también esta tesis a mis hermanas: **Ale, Lupita y Maru** y a todos mis sobrinos, por todo el tiempo que me han acompañado y guiado, y los invaluable momentos que hemos podido compartir, sé que parte de este trabajo y crecimiento académico se ha podido cumplir mediante la inspiración que me han brindado y por su interés de que me supere día con día, para tener triunfos en la vida.

Mis palabras no bastaran para agradecerles su cooperación, comprensión y sus consejos en los momentos difíciles, deseo este trabajo sea un motivo de superación en Ustedes. Reciban muchas bendiciones.

AGRADECIMIENTOS

El recibir más de lo deseado, ha enriquecido a mi alma y al sentimiento de gratitud, que se fortalece con el apoyo de quienes me rodean en toda circunstancia. Por eso quiero agradecer a todas las personas que de manera directa e indirecta han colaborado con la realización y buen término del presente trabajo.

Dra. Marcela Arteaga Silva, es gracias a Usted a quien debo realmente todo este aprendizaje, crecimiento y cumplimiento de logros, que he podido realizar y completar en los diversos aspectos de mi vida académica y profesional, espero que algún día pueda recompensarle todo el tiempo y las aportaciones que me ha brindado para mejorar este trabajo y los otros más que se han derivado de esta investigación. Para Mí ha sido invaluable toda la confianza, apoyo y motivación que Usted me ha brindado desde el momento que comienzo este proyecto, y a lo largo de más de 6 años de conocernos. Realmente admiro la actitud que tiene en todo momento, pues es muy agradable trabajar a su lado, debido a que es muy positiva y propositiva, lo que a su vez ha permitido establecer y formar a su lado a una gran familia académica que poco a poco ha ido creciendo en integrantes, y así mismo en el número de logros y éxitos alcanzados, deseo que Usted y toda su familia reciban muchas bendiciones, que siempre permanezcan unidos, llenos de salud y de mucha felicidad.

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor, sin duda alguna su gran experiencia y señalamientos han sido oportunos para mi mejor desarrollo y aprovechamiento dentro de esta formación profesional y en el campo de la ciencia, agradezco cada una de sus observaciones, porque cuando he recurrido a Usted con alguna duda, siempre me ha brindado sus conocimientos y sugerencias, así como parte del espacio de su laboratorio, que en diversas ocasiones he llegado a necesitar, le extiendo mi agradecimiento y buenos deseos a su familia y compañeros de laboratorio.

Dra. Edith Arenas Ríos, agradezco la confianza al proyecto y por su participación en lograr darle una estructura y enfoque en toda ocasión que fue requerida, así mismo he

de decir que estoy muy agradecido con Usted, pues pese a que no nos conocíamos del todo al iniciar esta investigación, realmente me he sentido desde el comienzo lleno de confianza y apoyo a su lado, para poder realizar el trabajo, aunado al hecho de que me ha brindado en toda ocasión las facilidades para poder utilizar sus materiales, equipos y espacio, pero aún más quiero agradecerle la fortaleza que me brinda en cada ocasión que nos reunimos. Con gran afecto espero siempre este bien, llena de salud y felicidad, y de igual manera deseo sea el caso en su familia.

Dr. Sergio Montes López, estoy muy agradecido por permitirme trabajar dentro de su laboratorio, y por las facilidades que me otorgo en cada experimento realizado, como parte básica de este trabajo. Es muy valiosa para Mí toda la disponibilidad que tuvo para trabajar por gran tiempo en cada análisis, y la confianza de permitirme usar su equipo y de igual forma los materiales que se requirieron, espero que en la vida tenga muchas satisfacciones y se lo colme de grandes dichas.

M.V.Z. María Del Rocío González Vieira, responsable del bioterio, de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa. Le agradezco la ayuda en el cuidado y atención a mis sujetos de investigación, sin su participación y la del demás personal que labora a su lado, los resultados que obtuvimos no se hubieran logrado a tiempo y ser satisfactorios como lo son para Mí.

Dra. Edith Cortés Barberena, agradezco su apoyo y confianza al permitirme hacer uso y manejo de su citómetro de flujo, y por su disponibilidad en todo momento para lograr realizar cada una de mis evaluaciones, gracias por su amabilidad y atención.

Dr. Cristián Togno-Peirce, le agradezco toda la ayuda y atención brindada para que Yo pudiera realizar el procesamiento y análisis de mis resultados, tanto de citometría como todos los análisis estadísticos que integran este trabajo, sin su cooperación y facilidades brindadas, este trabajo no se hubiera logrado de la misma forma que hoy que presenta, espero tenga muchos éxitos en su carrera profesional y que los pueda disfrutar ampliamente al lado de su familia.

Gran parte del agrado que tengo con este trabajo, se lo debo a la **Dra. Ofelia Limón Morales**, quien desinteresadamente ha dado parte de su tiempo en revisarlo por varias ocasiones, haciéndome señalamientos importantes para lograr fortalecerlo y estructurarlo de la mejor manera posible, haciéndolo más claro y completo, muchas gracias por su ayuda y atenciones proporcionadas.

Me gustaría seguir siendo específico con cada una de las siguientes personas, pero creo nunca lograré terminar de agradecer todos los momentos compartidos, las nuevas experiencias y vivencias que he tenido al lado de **Sonia Guadalupe Pérez Aguirre, Pablo López de Jesús, Karina Hernández Santiago, MBRA. Tábata Nelva Mendoza Mendoza, Dra. Tania Molina Jiménez, Dra. Ana Laura López López, Dra. Malinalli Brianza Padilla**, valiosas personas con quienes he podido tener gratas experiencias, y formar recuerdos que serán por siempre muy valiosos, junto con la presencia de los demás miembros que han formado parte del laboratorio **S-338**, especialmente mi agradecimiento para una gran investigadora la **Dra. Herlinda Bonilla Jaime**, quien me ha auxiliado también en todos mis procesos de crecimiento, y ha sido de gran ayuda para que pueda en un futuro seguir avanzando este camino de preparación y superación.

A los compañeros del laboratorio **S-234: Fabiola, Ileri, Lorena, Blanca, Ernesto**, les agradezco su ayuda, y espero seguir manteniendo esta cálida comunicación y relación de trabajo por largo tiempo.

Agradezco mucho la ayuda, atención y conocimientos compartidos por todos mis maestros en las clases de posgrado, a mis compañeros de generación, al **Dr. Pablo Damián Matzumura** y al **Dr. Miguel Ángel León Galván**, por su guía y asesoría a toda hora y en cualquier momento, y a la Universidad en general por cada ayuda otorgada.

A todos ¡Mil gracias!

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
I. INTRODUCCIÓN.....	6
II. ANTECEDENTES.....	8
II.1. Efectos del cadmio sobre la fertilidad masculina.....	9
II.1.1. Efectos del cadmio sobre el eje hipotálamo hipófisis gónada.....	10
II.1.2. Efectos del cadmio sobre la espermatogénesis.....	12
II.1.3. Efecto del cadmio sobre la calidad espermática.....	13
II.2. Epidídimo y maduración espermática.....	13
II.2.1. Estructura del epidídimo.....	14
II.2.2. Tipos celulares en el epidídimo.....	15
II.2.2.1. Células principales.....	16
II.2.2.2. Células basales.....	18
II.2.2.3. Células apicales.....	19
II.2.2.4. Células estrechas.....	19

II.2.2.5. Células claras.....	20
II.2.2.6. Células Halo.....	21
II.2.3. Función del epidídimo.....	22
II.2.3.1. Cambios para la maduración del espermatozoide en el epidídimo.....	23
II.2.3.1.1 Cambios bioquímicos.....	25
II.2.3.1.2. Cambios morfológicos.....	34
II.2.3.1.3. Cambios fisiológicos.....	34
II.2.4. Regulación hormonal del epidídimo.....	36
II.3. Parámetros de calidad espermática.....	37
II.3.1. Vitalidad espermática.....	39
II.3.2. Concentración espermática.....	39
II.4. Efectos conocidos del cadmio sobre la función epididimaria.....	40
III. JUSTIFICACIÓN.....	42
IV. OBJETIVO GENERAL.....	43
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
VI. HIPÓTESIS.....	43
VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	44

VII.1. Cuantificación de cadmio en sangre.....	46
VII.2. Cuantificación de cadmio en epidídimo.....	46
VII.3. Cuantificación de testosterona en suero.....	47
VII.4. Determinación espermática.....	48
VII.5. Evaluación de la distribución y presencia de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa en membrana plasmática de espermatozoides.....	49
VII.6. Fosforilación en residuos de tirosina de proteínas de los espermatozoides.....	49
VII.7. Compactación del DNA de espermatozoides por azul de anilina.....	50
VII.8. Integridad del DNA de espermatozoides por naranja de acridina.....	51
VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	52
IX. RESULTADOS.....	53
IX.1. Cuantificación de cadmio en sangre y epidídimo.....	53
IX.2. Cuantificación de testosterona en suero.....	54
IX.3. Concentración y vitalidad espermática.....	54
IX.4. Evaluación de la distribución y presencia de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa en membrana de espermatozoides.....	56

IX.5. Fosforilación en residuos de tirosina de proteínas de los espermatozoides.....	.66
IX.6. Compactación del DNA de espermatozoides con azul de anilina.....	.69
IX.7. Integridad del DNA de espermatozoides con naranja de acridina.....	.70
X. DISCUSIÓN.....	.73
XI. CONCLUSIONES.....	.84
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	.85

ABREVIATURAS

°C, grados Celsius

μL, microlitros

17β-HSD, 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa

3β-HSD, 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa

AA, azul de anilina

ACTH, hormona adrenocorticotrópica

AMP, Adenosín monofosfato

AMPc, adenosinmonofosfato cíclico

ASF, factor estabilizador del acrosoma

ATP, Adenosín trifosfato

BSA, albumina sérica bovina

CAT, catalasa

Cd, cadmio

Cd-Alb, unión de cadmio a albumina

CdCl₂, cloruro de cadmio

Cd-MT, unión de cadmio a metalotioneina

Con A, *Canavalia ensiformis* aglutinina (Concanavalina A)

cpm, cuentas por minuto

CHOs, carbohidratos

DHT, 5α-dihidrotestosterona (dihidrotestosterona)

DNA, ácido desoxirribonucleico

DS, desviación estándar

E₂, 17β-estradiol

ERAs, elementos de respuesta a andrógenos clásicos

EROs, especies reactivas de oxígeno

FITC, isotiocianato de fluoresceína

FSH, hormona folículo estimulante

GABA, ácido gamma aminobutírico

GAPDH, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GC, gota citoplasmática
GH, hormona del crecimiento
GPx, glutatión peroxidasa
Hg, mercurio
HHG, eje hipotálamo-hipófisis-gónada
IgG_{2b}, anticuerpo Inmunoglobulina G
INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IP, vía intraperitoneal
Kg, kilogramo
L, litro
LH, hormona luteinizante
LPO, lipoperoxidación
m, metro
mg, miligramo
mL, mililitros
NA, naranja de acridina
ng, nanogramo
nm, nanómetros
OMS, organización mundial de la salud
P, fosforilación de proteínas en residuos de tirosina
P1, patrón de fluorescencia 1 (fluorescencia en todo el espermatozoide)
P2, patrón de fluorescencia 2 (fluorescencia en el flagelo del espermatozoide)
P3, patrón de fluorescencia 3 (fluorescencia en la cabeza del espermatozoide)
P4, patrón de fluorescencia 4 (fluorescencia en la cabeza y pieza principal del flagelo del espermatozoide)
P5, patrón de fluorescencia 5 (espermatozoides sin fluorescencia)
Pb, plomo
PBS, solución de buffer fosfatos
pH, potencial hidrógeno

Py20, anticuerpo anti-fosfoproteína tirosina

RA, receptor para andrógenos

RIA, radio inmuno análisis

SCV, vesículas pequeñas recubiertas

-SH, grupos tiol

SOD, superóxidodismutasa

Ss, sujetos

S-S, uniones disulfuro (puentes disulfuro)

SSV, vesículas secretoras de superficie lisa

SUV, vesículas pequeñas descubiertas

T, testosterona

TSH, tirotropina

UEA, *Ulex europaeus* aglutinina

WGA, *Triticum vulgare* aglutinina

Zn²⁺, zinc

µg, microgramo

µm, micrómetros

RESUMEN

La infertilidad en varones es una problemática que ha incrementado, principalmente por alteraciones patológicas. Sin embargo, 34 a 40 % de los casos, se deben a causas de infertilidad idiopática, relacionadas con la exposición a agentes tóxicos en el ambiente como el cadmio (Cd), un metal pesado derivado de las actividades antropogénicas. El Cd está ligado con una disminución en los parámetros de calidad espermática en eyaculados de humanos y roedores, aunque a la fecha no está descrito si estos efectos se asocian con una alteración en la funcionalidad del epidídimo, en el que los espermatozoides maduran, mediante una serie ordenada de cambios fisiológicos, morfológicos y bioquímicos, que les brindan las características del potencial fertilizante, dentro de ellos se puede mencionar: cambios en la glicosilación de la membrana plasmática, que involucra carbohidratos como: N-acetilglucosamina, ácido siálico, manosa y fucosa, importantes para el reconocimiento e interacción entre gametos, y posterior fertilización del ovocito, así como la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas de espermatozoides, que es la base molecular para la adquisición de la movilidad espermática, aunado al mantenimiento de la integridad y compactación del DNA espermático. Por lo que el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del Cd sobre indicadores de la maduración espermática epididimaria en la rata Wistar. Encontramos que el Cd en una dosis de 0.25 mg/Kg de CdCl₂ por vía IP, del día 01 a 56 de vida, causa una disminución de los parámetros de determinación espermática (concentración y vitalidad), y afecta a la maduración espermática de la rata Wistar, pues se observó modificaciones en la distribución y composición de los carbohidratos N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa, incrementó la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas, y disminuyeron los porcentajes de compactación e integridad del DNA en los espermatozoides de las tres regiones del epidídimo de sujetos con exposición a este metal. De tal forma, que la fertilidad en el macho puede verse afectada por el Cd, y así contribuir con la infertilidad de etiología idiopática y ser la causa de la disminución en la concepción de la pareja.

ABSTRACT

Infertility in males is a problem that has increased, mainly due to pathological alterations. However, 34-40% of cases are due to idiopathic infertility, related to exposure to toxic agents in the environment such as cadmium (Cd), a heavy metal derived from anthropogenic activities. Cd is linked to a decrease in sperm quality parameters in ejaculates of humans and rodents, although up to date it is not described if these effects are associated with an alteration in the functionality of the epididymis, in which spermatozoa mature, by means of an orderly series of physiological, morphological and biochemical changes that provide the characteristics of the fertilizing potential. These include: changes in plasma membrane glycosylation, involving carbohydrates such as N-acetylglucosamine, sialic acid, mannose and fucose, important for the recognition and interaction between gametes, and subsequent fertilization of the oocyte, as well as the phosphorylation of tyrosine residues in sperm proteins, which is the molecular basis for the acquisition of sperm motility, together with maintenance of integrity and compaction Of sperm DNA. Thus, the objective of this work was to analyze the effect of Cd on indicators of epididymal sperm maturation in the Wistar rat. We found that the Cd at a dose of 0.25 mg/kg of CdCl₂ by IP, from day 01 to 56 of life, caused a decrease in sperm determination parameters (concentration and vitality), and affects the sperm maturation of the rat Wistar, as it was observed changes in the distribution and composition of N-acetylglucosamine and/or sialic acid, mannose and fucose, increased phosphorylation of tyrosine residues in proteins, and percentages of DNA compaction and integrity decreased in spermatozoa of the three regions of the epididymis of subjects with exposure to this metal. Hence, fertility in the male can be affected by Cd, and therefore contribute to the infertility of idiopathic etiology and be the cause of the decline in conception of the couple.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad en todo el mundo se presentan casos de infertilidad, constituyendo un problema de salud que afecta a las parejas. En México, datos del INEGI refieren que la infertilidad afecta a cerca de 1.5 millones de parejas, es decir una de cada seis parejas padecen problemas de concepción (Instituto Nacional de Estadística y Geografía-Temas estadísticos, 2016).

La infertilidad, en humanos, está definida como la imposibilidad de lograr un embarazo clínico luego de un año de relaciones sexuales regulares sin el uso de algún método anticonceptivo (WHO, 2010). La organización mundial de la salud (OMS) ha reportado que, aproximadamente el 15 % de las parejas tienen problemas de fertilidad y al no lograr un embarazo en el plazo de un año requieren de asistencia médica (WHO, 2010). El 30 % de los problemas de fertilidad se debe a factores asociados con la mujer, otro 30 % a factores asociados con el varón y el 40 % restante a múltiples causas sin definir, que incluyen a los dos miembros de la pareja, por lo cual se ha considerado que el hombre está involucrado en el 50 % de los problemas de infertilidad de la pareja (Cui *et al.*, 2016).

La infertilidad masculina puede ser provocada por una gran variedad de condiciones, sin embargo; casi siempre se relaciona con alteraciones cuantitativas o cualitativas de los parámetros seminales como la concentración, la movilidad y la viabilidad de los espermatozoides (Palma y Vinay, 2014).

Actualmente, varias de las causas en la infertilidad masculina se asocian a patologías que pueden identificarse e incluso ser tratadas, como el hipogonadismo hipogonadotrópico y el varicocele; otras como las malformaciones congénitas genitales y la atrofia testicular se logran diagnosticar, pero no cuentan con un tratamiento específico. Sin embargo, aún se desconoce las causas de aproximadamente el 34 al 40 % de los casos de infertilidad masculina, razón por la

cual se les denomina infertilidad con etiología desconocida (Povey y Stocks, 2010; Arrotéia *et al.*, 2012).

En la última década, la infertilidad masculina ha recibido la atención de diversas investigaciones, pues se sugiere que la salud reproductiva, tanto de humanos como de animales, ha sufrido efectos adversos como resultado de la exposición a agentes químicos que se encuentran en el ambiente (Povey y Stocks, 2010), los cuales pueden interactuar con el sistema endócrino y provocar alteraciones, en la producción de espermatozoides y en las estructuras del aparato reproductor relacionadas con la capacidad fertilizante de los espermatozoides como la próstata, las vesículas seminales y el epidídimo, afectando así la capacidad reproductiva del macho (Anway *et al.*, 2005; Wong y Cheng, 2011).

Dentro de los agentes ambientales asociados con la pérdida de fertilidad en el hombre, destacan los metales pesados como el plomo (Pb), el mercurio (Hg) y el cadmio (Cd), entre otros (Wijesekara *et al.*, 2015). Los cuales pueden presentarse de manera fortuita y por el resultado de las actividades antropogénicas.

Con respecto al Cd, se sabe que puede interactuar con el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) y ejercer efectos no deseables en los tres niveles, trayendo como consecuencia una disminución en la concentración de testosterona (T); y por ende, en la espermatogénesis (Järup y Akesson, 2009; Lafuente, 2013). Sin embargo, se sabe poco acerca de los efectos del Cd en la función del epidídimo y los procesos de maduración espermática que suceden en los espermatozoides para lograr la capacidad fertilizante (Robaire y Hinton, 2015).

A la fecha, la mayoría de las investigaciones que estudian los efectos del Cd sobre los espermatozoides, son realizadas en muestras de eyaculado, sin embargo; se desconoce si existen afectaciones de este metal en algún proceso bioquímico y/o morfológico, que dé lugar a una deficiencia fisiológica que no permita el éxito reproductivo del macho. Es por ello, que es necesario seguir indagando más acerca

de los efectos del Cd en el epidídimo, pues es, en este órgano, donde se lleva a cabo la maduración espermática.

II. ANTECEDENTES

El Cd es uno de los agentes tóxicos con mayor presencia en el ambiente, pues es utilizado ampliamente para proteger contra la corrosión de metales como el hierro y el acero, además de que se utiliza como sulfito de Cd y selenito de Cd en la fabricación de pinturas utilizadas para colorear cerámicas y plásticos. También es utilizado en la fabricación de baterías de hidróxido de níquel-Cd para la industria automotriz y en la agricultura forma parte de fertilizantes fosforados y de pesticidas (Cichy, Jaroszek y Pasezek, 2014).

El Cd y sus compuestos, son vertidos a las aguas a través de los relaves mineros y desagües de las industrias, depositándose en los ríos y lagos, de igual manera en sistemas acuáticos marinos, en los que se ha reportado concentraciones de Cd que están por debajo de los 5 ng/L, a un promedio de 40 ng/L en las aguas superficiales no contaminadas, mientras que en las zonas costeras se han registrado hasta 250 ng/L (Pavlaki *et al.*, 2016), como consecuencia de los aportes fluviales y del impacto humano directo, el Cd se encuentra libre en el ambiente, tanto en el suelo como en las aguas de riego, por lo que entra en contacto con los alimentos de origen vegetal, en los que se puede tener concentraciones que no suelen superar los 200 mg/kg, de peso fresco; mientras que en el caso de carnes y pescados, el Cd se encuentra presente en concentraciones de hasta 50 mg/kg (Delfino *et al.*, 2003).

El hecho que se encuentren reportadas cantidades tan altas de Cd en estos alimentos se debe a que el Cd tiene la característica de bioacumularse; es decir el Cd se almacena en los tejidos, debido a que no participa en reacciones metabólicas esenciales para las formas de vida y porque carece de mecanismos de excreciones, es decir que el Cd no puede salir del organismo (Delfino *et al.*, 2003; Tbeileh *et al.*, 2007; Saeed, 2013). Adicionalmente, el Cd puede ser ingerido a través de los artículos

de cerámica utilizados en la cocina, especialmente cuando son usados para contener sustancias ácidas como los jugos cítricos y el vinagre, produciendo solubilización con el vidriado de dichos artículos, extrayéndose cantidades de Cd que contaminan los alimentos y bebidas. Otro factor importante de exposición al Cd suele presentarse con el humo del tabaco, tanto para personas fumadoras como para fumadores pasivos (Ashraf, 2012).

De acuerdo con la NOM-009-SSA1-1993 y la *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR, 2012) las cantidades permitidas de Cd a las que un ser humano puede exponerse van desde 0.25 a 0.50 ppm (correspondientes a 0.25 y 0.5 mg de Cd por litro de agua), sin embargo; la población en general está expuesta a Cd a través de diferentes vías como el agua potable, los alimentos y el aire, este último en zonas no industriales puede llegar a presentar una concentración de Cd de 0.1 a 6 ng/m³. Más aun, se puede llegar a tener una exposición ocupacional al Cd en diversas áreas de trabajo, tal es el caso de las industrias mineras, automotriz y textil (Siu *et al.*, 2009), en donde se sabe que el Cd puede estar en el aire en concentraciones que pueden ir desde los 9.1 a 26.7 µg/m³, lo que favorece que posteriormente se deposite una mayor cantidad en el suelo, en donde puede permanecer hasta por 300 años, y un 90% continúa sin transformarse (Ramírez, 2002).

II.1. Efectos del cadmio sobre la fertilidad masculina

Se ha reportado que el Cd puede alterar la fertilidad masculina de humanos y de diferentes especies de animales (Benoff, Jacob y Hurley, 2000; Zhang y Lui, 2014), afectando al eje de regulación neuroendocrino HHG (Lafuente, 2013), además de influir sobre la calidad espermática (Pizent, Tariba y Živković, 2012), por lo que a su vez, se ha realizado la búsqueda y explicación de las alteraciones inducidas por el Cd en las estructuras que regulan a los procesos de maduración espermática, y así poder entender los efectos adversos del Cd en la infertilidad.

II.1.1. Efectos del cadmio sobre el eje hipotálamo hipófisis gónada

Se ha demostrado que la exposición a Cd puede afectar seriamente la salud reproductiva, causando infertilidad tanto en hembras como en machos de diferentes especies (Benoff *et al.*, 2009; Byrne *et al.*, 2009; Siu *et al.*, 2009; Mouritsen *et al.*, 2010). Así mismo, la exposición a Cd está asociada con cambios en la actividad del sistema endocrino (Esquifino *et al.*, 2001), pues se sabe que el Cd se bioacumula en el eje HHG en sus tres niveles, provocando diferentes efectos indeseables. En el hipotálamo se han encontrado diferentes alteraciones (Jiménez-Ortega *et al.*, 2012), pues el Cd es capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica (Murphy, 1997) y bioacularse (Lafuente, 2013). Así, se ha reportado que disminuye las concentraciones de la norepinefrina, serotonina y dopamina en diferentes áreas del hipotalámicas, además de modificar las concentraciones del ácido gamma aminobutírico (GABA), taurina, glutamato y aspartato (Esquifino *et al.*, 2001; Lafuente *et al.*, 2001), de igual manera el Cd induce cambios en la expresión de los genes reloj Per 1 y Per 2 en el hipotálamo de ratas (Cano *et al.*, 2007).

En cuanto a la hipófisis, se ha reportado que es un órgano blanco muy sensible al Cd, por lo cual tiene efectos endocrinos en células gonadotropas, como ya ha sido demostrado en ratas y primates (Jiménez-Ortega *et al.*, 2012; Lafuente, 2013). También, se ha observado que la exposición ocupacional a Cd reduce la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH) en trabajadores varones urbanos (Ciarrocca *et al.*, 2013). El Cd directamente puede inhibir la liberación de hormonas hipofisarias (Poliandri *et al.*, 2006), así lo ha demostrado el estudio reportado por Esquifino y cols. (1999), en donde los patrones de secreción de prolactina cambian, después de una administración crónica del metal por vía subcutánea a ratas macho púberes (de los 30 a los 60 días de vida) y adultas (de los 60 a los 90 días de vida), en una dosis de 0.5 y de 1 mg/Kg de peso respectivamente. De igual forma, hay cambios diferenciales en las concentraciones plasmáticas de hormona adrenocorticotropica (ACTH), de tirotropina (TSH) y de hormona del crecimiento (GH), aunado a que hay una disminución en las

concentraciones de FSH y una alteración en la frecuencia del pulso y la vida media de la LH en ratas machos púberes y adultas (Lafuente *et al.*, 1999), lo que se relaciona con una disminución de T en plasma. Además, se sabe que la administración de Cd induce estrés oxidativo y lipoperoxidación (LPO) en la hipófisis anterior (Poliandri *et al.*, 2006).

Existe evidencia que el Cd altera la función testicular (Lafuente *et al.*, 2000; Hachfi y Sakly, 2010; Mendiola *et al.*, 2011), sus efectos tóxicos sobre el testículo generan bajas concentraciones de T en plasma (Lafuente *et al.*, 2000). Además, se ha reportado que la administración de Cd a ratones, en una dosis de 4 mg/kg de peso corporal durante 6 días induce, en el testículo una disminución importante de la actividad de las enzimas esteroidogénicas testiculares como la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD), enzimas clave para la biosíntesis de T. Como consecuencia se presenta una reducción en la concentración de T en plasma, una disminución en el recuento de espermatozoides testiculares, así como, pérdida en la movilidad espermática, aumento de la concentración intracelular de especies reactivas de oxígeno (EROs), una mayor LPO, incremento de la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (DNA) y la disminución en la concentración de enzimas antioxidantes (Manna, Sinha y Sil, 2008).

Del mismo modo, de acuerdo con Gunnarsson, Nordberg y Selstam (2007) el Cd afecta el desarrollo de los testículos y altera la síntesis de andrógenos, así como la producción de gametos. También, se sabe que el Cd causa un aumento en la expresión de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en el testículo, que puede ser una consecuencia de la disminución en la concentración de T inducida por este metal (Wang *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2013; Ohtani *et al.*, 2013).

Además, la disminución en la concentración de T causada por la intoxicación con Cd, no sólo afecta la función testicular, sino que también disminuye el peso de otros órganos dependientes de andrógenos como el epidídimo (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2016).

II.1.2. Efectos del cadmio sobre la espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso extraordinariamente complejo, pero bien controlado, en el que una serie de divisiones mitóticas y meióticas combinadas con la espermiogénesis, dan lugar a los espermatozoides maduros. Esto a partir de las espermatogonias y de un microambiente regulado por las células de Sertoli y las de Leydig. Además de la participación de factores parácrinos como: las citosinas y los factores de crecimiento que regulan los mecanismos de división y renovación celular, y de la interleucina 1 que es capaz de modular las funciones de las células de Sertoli.

De forma particular, se ha demostrado que el Cd afecta a las células de Sertoli, tanto en su morfología como en el número de células presentes en el testículo, como consecuencia de la pérdida de adhesión de las células de Sertoli con las células germinales, interrumpiéndose las uniones estrechas (Siu *et al.*, 2009), por lo cual se ha identificado al Cd como una sustancia tóxica hacia las células de Sertoli.

También, se sabe que la T producida por las células de Leydig, propicia la producción y desarrollo de los gametos masculinos en los túbulos seminíferos (Jenardhanan, Panneerselvam y Mathur, 2016; Neto *et al.*, 2016). En este contexto, se ha reportado, que el Cd en ratones y ratas reduce el peso de los testículos (Manna, Sinha y Sil, 2008), y afecta a diferentes etapas de la espermatogénesis, de tal forma que promueve el retraso de la mitosis en la fase G2, por lo que se inhibe la espermiación, induciendo además la apoptosis en células germinales (Jenardhanan, Panneerselvam y Mathur, 2016), y así mismo afecta al equilibrio hormonal del testículo, por lo cual los principales efectos del Cd en la espermatogénesis, se ven observados en una disminución del conteo de los espermatozoides y en un aumento del porcentaje de anomalías morfológicas (Asadi *et al.*, 2013; Adamkovicova *et al.*, 2016).

II.1.3. Efecto del cadmio sobre la calidad espermática

Otras de las alteraciones reproductivas causadas por el Cd se ven reflejadas directamente sobre los espermatozoides, afectando su concentración y movilidad. Además, de que se ha reportado que la concentración de Cd en la sangre de pacientes con infertilidad es inversamente proporcional a la concentración de espermatozoides en el eyaculado, lo mismo ocurre con el porcentaje de espermatozoides móviles (Benoff *et al.*, 2009). Así, se ha sugerido que la concentración de Cd en el semen podría contribuir a la infertilidad masculina mediante la reducción de la calidad espermática (Pant *et al.*, 2003). De hecho, la exposición a Cd causa efectos dañinos en los espermatozoides, observándose un incremento de la fragmentación del DNA, una reacción acrosomal prematura y disminución de la movilidad (Oliveira *et al.*, 2009).

II.2. Epidídimo y maduración espermática

La producción continúa de gametos masculinos en los mamíferos depende del inicio de la proliferación de espermatogonias y su diferenciación a espermatozoides, en el epitelio testicular. Sin embargo, posteriormente en etapas post-gonadales establecidas cuando los espermatozoides recorren las diferentes regiones del epidídimo, la composición del medio ambiente epidídimal cambia secuencialmente a lo largo de este órgano, permitiendo así la maduración espermática (Dacheux y Dacheux, 2014). Donde los espermatozoides obtienen la capacidad fertilizante (Dacheux *et al.*, 2009), término que se refiere a que los espermatozoides adquieren el potencial de moverse progresivamente, además de que adquieren la capacidad de reconocer y unirse a la zona pelúcida, para fertilizar y fecundar a un ovocito. Para que esto se logre, es necesario que ocurran cambios en las propiedades fisiológicas de la membrana del espermatozoide (Tulsiani, 2006; Robaire y Hinton, 2015).

Así, diversos estudios han indicado que estos cambios, ocurren durante el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo (Sostaric *et al.*, 2008). Dentro de los cambios estructurales que se requieren, se incluyen cambios en la presencia de las

glicoproteínas y esteroides de la membrana plasmática, así como la unión nuclear de protaminas y la fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas. Además, de los cambios en la composición de los fosfolípidos de la membrana, que incluyen una selectiva y progresiva pérdida de los mismos, al paso de los espermatozoides por el epidídimo, dando como resultado un aumento en el colesterol, lo que permite una estabilización en la membrana de los espermatozoides maduros; los cuales se almacenan en la cola del epidídimo.

Es importante considerar, que los cambios que ocurren en la membrana durante la maduración epididimaria no se limitan a la cabeza del espermatozoide, pues la absorción e integración de varias glicoproteínas han sido observadas en la membrana plasmática de la cola del mismo espermatozoide (Belleannée *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2015).

En este sentido, se ha propuesto, que la función del epidídimo es principalmente regulada por andrógenos (Ribeiro *et al.*, 2015), por lo que estos procesos pueden verse seriamente afectados por la exposición a tóxicos como los metales pesados, dentro de ellos el Cd.

II.2.1. Estructura del epidídimo

El epidídimo es un órgano estructurado por un tubo largo que varía en longitud dependiendo de la especie, puede medir de 1 a 80 metros (m), siendo de 1 m en el ratón, 3 m en la rata, 6 m en el humano (Hinton *et al.*, 2011) y hasta 80 m en el caballo (Arenas-Ríos *et al.*, 2012). El epidídimo comienza en los conductos eferentes, los cuales son los puentes de comunicación con el testículo y termina en el conducto deferente. Para su estudio, el epidídimo generalmente se divide en cuatro regiones anatómicas: el segmento inicial, la cabeza (*caput* o región cefálica), el cuerpo (*corpus* o región media) y la cola (*cauda* o región caudal) (Robaire y Hinton, 2015) (figura 1).

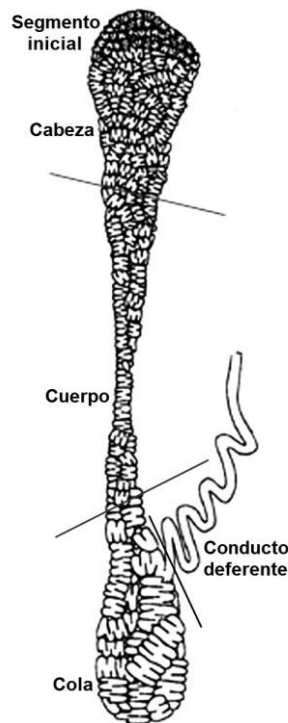


Figura 1. Organización esquemática del epidídimo de rata. Las cuatro regiones del epidídimo: cabeza, cuerpo y cola, son representadas, así como el segmento inicial. Las líneas indican el sitio donde las diferentes regiones son divididas. Adaptado de: Guo *et al.*, 2007.

Esta regionalización, radica en los cambios de los diferentes tipos celulares encontrados en el epitelio del epidídimo por región. El tránsito de los espermatozoides por este órgano, para alcanzar la madurez, puede tomar de 6 días en el humano, y en la rata entre 8 a 11 días (Robaire y Hinton, 2015). Gran parte de esta variabilidad se debe al tiempo necesario para atravesar la cola. En la mayoría de las especies, el recorrido por la cabeza y el cuerpo, toma aproximadamente 1-3 días en cada uno. Entre el segmento inicial y la cola, el epitelio disminuye de altura y la luz se hace más amplia y cada vez más llena de espermatozoides (Marengo, 2008).

II.2.2. Tipos celulares en el epidídimo

El epitelio del epidídimo está constituido por varios tipos celulares que recubren al túbulo, los cuales son: las células principales, las células apicales, las células estrechas, las células claras, las células basales y las células halo. Algunas de estas células se encuentran a lo largo de todo el conducto como las células principales,

mientras que otras se encuentran exclusivamente en regiones específicas como las células estrechas (Shum *et al.*, 2009; Robaire y Hinton, 2015) (figura 2).

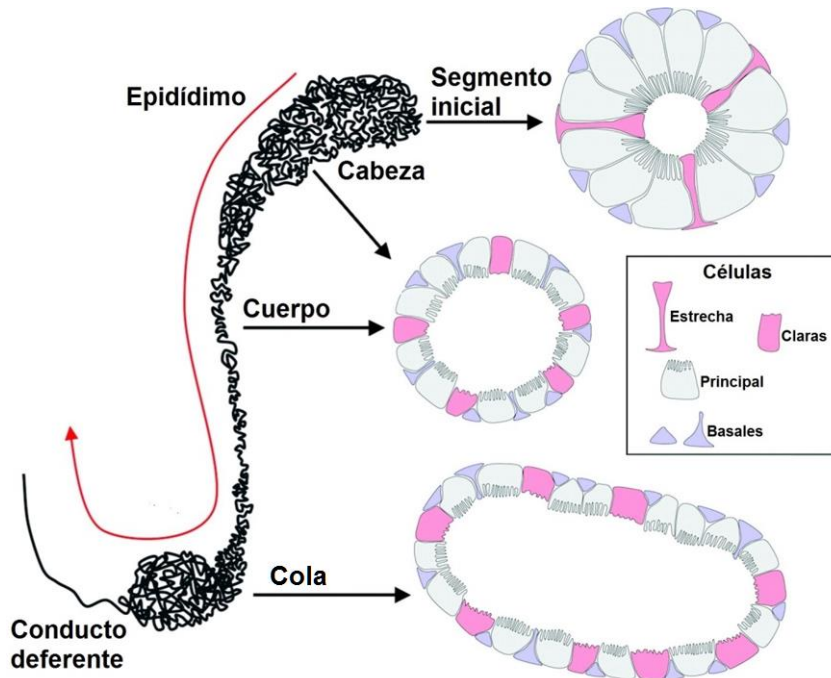


Figura 2. Esquema del epidídimo con sus diferentes regiones y la composición celular de cada una de ellas. El epitelio del epidídimo está compuesto por varios tipos celulares, incluyendo células estrechas, claras, principales y basales. Adaptado de: Shum *et al.*, 2009.

II.2.2.1. Células principales

Estas células aparecen a lo largo de todo el epidídimo, con diferencias estructurales en cada región, son el tipo celular más abundante y ampliamente estudiado que se encuentra en el epitelio epididimario y tienen como característica una maquinaria secretora y endocítica altamente desarrollada, además de que sus núcleos basales están alineados (figuras 3 y 4). Se ha observado que la formación de uniones estrechas entre las células principales contiguas, forma a la barrera hemato-epididimaria que permite conservar el microambiente del lumen para el mantenimiento de los espermatozoides.

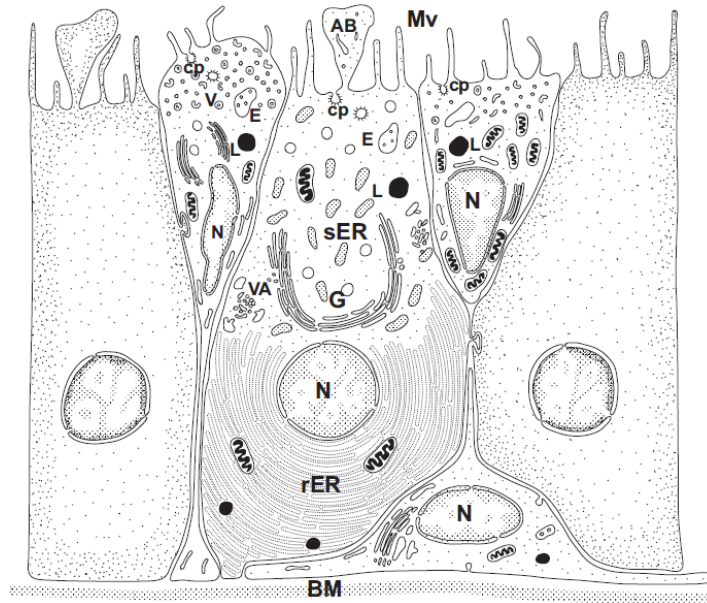


Figura 3. Representación esquemática de células encontradas en el epitelio del epidídimo. La célula estrecha está representada a la izquierda, la célula principal es de apariencia columnar, todos sus organelos componen un aparato endocítico, con numerosas cisternas paralelas de retículo endoplásmico rugoso (rER) localizadas basalmente, aunque algunas pueden esporádicamente estar dispersas en la región apical y supranuclear de la célula (sER), el aparato de Golgi (G) es altamente complejo. Las células principales muestran ampollas de citoplasma que emanan hacia la superficie apical de la superficie celular, referidas como ampollas apicales (AB), y pequeños agregados de vesículas tubulares (VA). La célula basal se encuentra a lo largo de la membrana basal (BM), y envía un delgado proceso hacia el lumen. Núcleo (N), microvellosidades (Mv), vesículas apicales en forma de copa (v), pozos recubiertos (cp), endosomas (E), lisosomas (L). Reproducido de: Robaire y Hinton, 2015.

Dependiendo del segmento, las células principales comprenderán el 80 % en el segmento inicial, al 65 % de la población total de las células epiteliales en la cola del epidídimo, son células columnares que presentan estereocilios prominentes que se extienden hacia la luz. Ultra estructuralmente, la región supranuclear de este tipo de células contiene grandes pilas de sáculos de Golgi, mitocondrias, cuerpos multivesiculares y elementos membranosos, mientras que la región infranuclear está densamente constituida por retículo endoplásmico rugoso (Arrotéia *et al.*, 2012).

Estas células son responsables de la mayor parte de las proteínas que se sintetizan dentro del epidídimo, las cuales pueden ser retenidas por las mismas células, o bien ser activamente secretadas en el compartimento luminal del epidídimo, controlando las concentraciones de proteínas, por lo que desempeñan un papel activo en la

endocitosis de proteínas, ya que su aparato de Golgi consta de varios sáculos apilados, del cual se secretan, tanto las vesículas secretoras de superficie lisa (SSV de 150-300 nm) como a las vesículas pequeñas recubiertas (SCV 60-70 nm) o a las vesículas pequeñas descubiertas (SUV 60-70 nm). Las SSV se destinan a la superficie celular apical con la que se fusionan, entregan su contenido en el lumen del epidídimo de una manera regulada, mediante un proceso denominado secreción merócrina, mientras que las SCV son dirigidas del aparato de Golgi a cuerpos multivesiculares, en donde liberan su contenido lisosomal, aunque algunas pueden ser destinadas para la superficie celular, algunas de las SUV, pueden ser derivados de Golgi y también pueden participar en la secreción merócrina, al fusionarse con la superficie apical de la célula (Robaire y Hinton, 2015).

II.2.2.2. Células basales

En todas las especies estudiadas hasta la fecha, se han encontrado presente este tipo celular a lo largo de todo el epitelio del túbulo epididimario. Las células basales constituyen un 15 a 20 % del total de células presentes a lo largo del epitelio del epidídimo, tienen muy poco citoplasma, y se caracterizan por encontrarse adheridas a la membrana basal, además de no tener acceso directo a la luz del lumen del túbulo (figuras 3 y 4). Para algunos procesos, este tipo celular se comunica con el lumen, mediante la formación de extensiones de citoplasma; las células basales no actúan como células madre para reponer a las células principales, y de la misma forma, no se dividen en los adultos (Robaire y Hinton, 2015). Las células basales contienen lo que parecen ser gránulos de secreción y dentro de algunas de sus funciones se ha sugerido que las células basales pueden tener un papel dentro del proceso del sistema inmune epitelial, debido a su capacidad para responder con macrófagos ante la presencia de auto-antígenos de los espermatozoides en el lumen (Arrotéia et al., 2012; Robaire y Hinton, 2015), y en la regulación de electrolitos, así como encargarse también de la acidificación del pH del lumen, proceso relacionado con el almacenamiento, establecimiento de la fertilidad y la calidad espermática (Shum et al., 2009).

II.2.2.3. Células apicales

Estas células integran cerca del 10 % del total de la población epitelial en el segmento inicial y zona intermedia del epidídimo, pero solo forma aproximadamente un 1 % de la población celular en la cola del epidídimo, aunque se han visto ocasionalmente variaciones entre los segmentos de ratas de edad avanzada. Son células que están claramente definidas por la gran cantidad de mitocondrias presentes en el citoplasma apical y por pocas microvellosidades en el borde del lumen, además de un núcleo que se encuentra en la mitad superior del citoplasma de la célula, el cual es esférico y no tienen contacto con la membrana basal (figura 3). Se diferencian claramente de las células estrechas y principales adyacentes en función de su perfil de expresión de proteínas. Cuentan con la capacidad de endocitar sustancias desde el lumen, debido a que contienen una gran cantidad de enzimas proteolíticas, y están relacionadas con la quiescencia de espermatozoides y la regulación del pH en el lumen, a través de la producción de enzimas de la familia de la anhidrasa carbónica (Arrotéia *et al.*, 2012; Robaire y Hinton, 2015).

II.2.2.4. Células estrechas

En la rata y el ratón adulto, las células estrechas son alargadas y delgadas, las cuales suelen ser relativamente bajas en número (Shum *et al.*, 2009), sólo aparecen en el epitelio del segmento inicial y zona intermedia, su población incrementa del 3% en el segmento inicial, al 6% de la población epitelial total en el cuerpo, suelen ser más estrechas que las células principales; se adelgazan y envían una proyección delgada de citoplasma, que puede llegar a la membrana basal, para poderse llevar a cabo un intercambio de moléculas. Se caracterizan por poseer numerosas vesículas apicales en forma de copa, las cuales participan en la endocitosis y en la secreción de iones H⁺ hacia el interior del lumen, además de tener varias mitocondrias y un pequeño núcleo aplanado, que se sitúa en la mitad superior del citoplasma de la célula (figura 3).

Las células estrechas son distintas de las células apicales en su apariencia morfológica, distribución relativa y en la expresión y secreción de diferentes proteínas, se ha sugerido que estas células están implicadas en el proceso de transporte intracelular entre la luz y las células epiteliales, en la degradación de proteínas y de carbohidratos específicos, dentro de sus lisosomas y en la protección de los espermatozoides ante un entorno cambiante perjudicial; incluso difieren ampliamente de sus células principales vecinas, y muestran una expresión de proteínas región específica, tales como la glutatión S-transferasa y enzimas lisosomales (Arrotéia *et al.*, 2012; Robaire y Hinton, 2015).

II.2.2.5. Células claras

Son células grandes, involucradas en la endocitosis del citoplasma residual, así como del contenido líquido del epidídimo, en conjunto con las células halo, constituyen poco menos del 5% del total de la población celular epitelial, y se encuentran equitativamente distribuidas a través de la cabeza, el cuerpo y la cola del epidídimo, son distintivas por su región apical que contiene pequeñas vesículas apicales, endosomas, cuerpos multivesiculares y lisosomas, junto con algunas microvellosidades, todos involucrados en la endocitosis (figura 4), así como por una región basal que contiene al núcleo y una cantidad variable de gotas de lípidos. La actividad endocítica de estas células es mucho mayor que en las células principales, y es una característica que se presenta mayormente en la cola del epidídimo. Estas células se encargan de endocitar diferentes proteínas y los contenidos de las gotas citoplasmáticas liberadas por los espermatozoides en su tránsito a través del lumen del conducto epididimario (Arrotéia *et al.*, 2012; Robaire y Hinton, 2015). En conjunto con las células estrechas, las células claras participan en la acidificación del fluido luminal, manteniendo el pH ácido del líquido del epidídimo; tarea esencial para mantener quiescentes a los espermatozoides y así prevenir la iniciación prematura de la reacción acrosomal (Shum *et al.*, 2009).

II.2.2.6. Células Halo

Son pequeñas células con un borde estrecho de citoplasma claro, están presentes en todo el epitelio del epidídimo (figura 4), se localizan en la base del epitelio, aunque no tocan la membrana basal, y contienen un número variable de gránulos nucleares densos (Arrotéia *et al.*, 2012). Han sido descritas incluso como linfocitos o monocitos, debido a que es difícil distinguir entre este tipo de células mediante microscopia de luz, por su similitud en tamaño y morfología nuclear. Las células halo participan dentro del sistema inmune como auxiliares de linfocitos B, linfocitos T, linfocitos T citotóxicos y monocitos. Con la edad, hay un aumento región-específico en el número de cada uno de estos tipos de células inmunes, así como la aparición ocasional de células eosinófilas. En el epitelio de la rata, el número de linfocitos T citotóxicos es equivalente al número de células halo, lo que sugiere que las células halo son, en condiciones normales, el tipo de célula inmune primaria en el epidídimo (Robaire y Hinton, 2015).

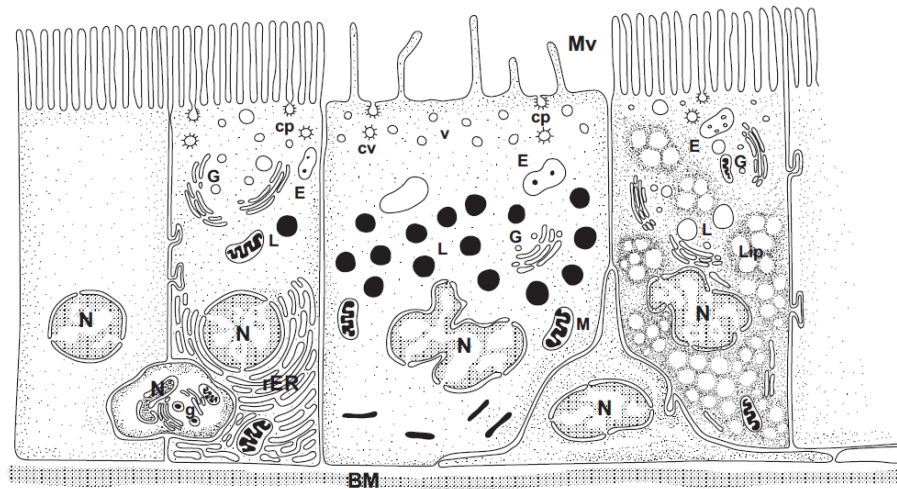


Figura 4. Representación esquemática de una célula principal de la cabeza del epidídimo (izquierda), y una célula principal del cuerpo del epidídimo (derecha), con una célula clara en medio, también se representan una célula halo y una célula basal. Las células principales de ambas regiones contienen pozos recubiertos (cp), endosomas (E), lisosomas (L) y un elaborado aparato de Golgi (G). El retículo endoplásmico rugoso (rER) ocupa la región basal de la célula principal en la cabeza del epidídimo, mientras que numerosas gotas de lípidos (lip) ocupan el citoplasma de la célula principal de la región del cuerpo del epidídimo. Las células claras muestran pocas microvellosidades (Mv) y numerosos pozos recubiertos (cp), pequeñas vesículas apicales (v), endosomas (E) y lisosomas (L), todos involucrados en la endocitosis. La célula halo, esta insertada entre la célula principal adyacente, es localizada basalmente, y contiene un pequeños núcleos granulares densos (g), mientras que la célula basal se estrecha a si misma a lo largo de la membrana basal (BM). Núcleos (N). Reproducido de: Robaire y Hinton, 2015.

II.2.3. Función del epidídimo

Cuando los espermatozoides abandonan el testículo no han adquirido aún la capacidad fertilizante, para que esto se logre es necesario que los espermatozoides pasen por el conducto epididimario, justo a este proceso es al que referimos como maduración espermática epididimaria. Así, una serie de diversos cambios, que se producen en los espermatozoides forman parte de la maduración espermática, considerándose que es en las dos primeras regiones del epidídimo donde ocurre la maduración espermática, culminando antes de su paso por la región de la cola (Rodríguez-Tobón, 2011). La maduración espermática requiere de una diversidad de modificaciones que favorecen a los espermatozoides que recorren el túbulo del epidídimo, dichos procesos dependen de un microambiente especializado en el lumen tubular, el cual es proporcionado por los diferentes tipos celulares que conforman al epidídimo asociado a una serie de eventos bioquímicos, que pueden de manera organizada, modificar al espermatozoide a través del túbulo epididimario. Los cambios que ocurren en los espermatozoides son inducidos por la presencia de sustancias secretadas por el propio epidídimo, o bien por la eliminación de otras sustancias que son absorbidas por diferentes tipos celulares presentes en el epitelio del epidídimo. Las células epiteliales localizadas al borde del lumen tubular, se sabe que son dependientes de andrógenos y que secretan ciertas proteínas que interactúan con el espermatozoide como parte del proceso de maduración, favoreciendo la formación de espermatozoides completamente funcionales (Rodríguez-Tobón, 2011).

Otro de los aspectos importantes dentro de la maduración epididimaria es la pérdida de la gota citoplasmática (GC), la cual puede permanecer en la espermátida elongada después de la liberación del epitelio germinal, pues generalmente la mayoría del citoplasma de la espermátida es fagocitado como "cuerpo residual" por la célula de Sertoli (Cooper, 2011). Este evento se ha relacionado con los cambios en las proteínas del citoesqueleto y con cambios continuos en la fuerza iónica dentro de la GC (Cooper, 2011).

Un estudio morfológico en espermatozoides obtenidos del eyaculado humano, ha demostrado que existen dos tipos de citoplasma en las células espermáticas: uno que representa el citoplasma remanente, el cual está normalmente unido a cualquier parte del flagelo del espermatozoide y la "verdadera" GC, que se presentan de manera más estable unida a la región del cuello del espermatozoide. Mientras que en los espermatozoides del epidídimo de ratón la GC se sitúa en la pieza media del flagelo (Cooper, 2005), esta diferencia en la morfología y la posición de las GC entre espermatozoides humanos y de ratón refleja las diferencias entre especies (Xu *et al.*, 2003). Sin embargo, en la rata la GC se pierde durante la espermiación, es decir cuando se desprende la espermátida elongada del epitelio seminífero (O'Donnell *et al.*, 2011), aunque es posible que en regiones del epidídimo se observe aun, como consecuencia de alguna alteración que ocurrió durante la espermiación y se mantenga la GC.

Los cambios antes citados, que presenta el espermatozoide durante todo el recorrido por el epidídimo, dependerán de las modificaciones pos-traduccionales que se producen después de la síntesis proteica. Estas ocurren en los residuos de aminoácidos que las constituyen y pueden ser de dos tipos: adición de grupos funcionales, o enlaces con otras proteínas. Entre los que se incluye a la fosforilación de los residuos de tirosinas, lo que produce una activación de las proteínas. Se ha propuesto, que esta activación es lo que se relaciona con la adquisición de la capacidad fertilizante (Filtz, Vogel y Leid, 2014).

II.2.3.1. Cambios para la maduración del espermatozoide en el epidídimo

Los primeros investigadores plantearon la hipótesis de que la maduración es una propiedad inherente de los espermatozoides y que depende sólo de la cantidad adecuada de tiempo. Ahora se sabe que los espermatozoides deben interactuar con una diversidad de sustancias propias de las diferentes regiones del epidídimo, para adquirir la fertilidad y éxito reproductivo tras el apareamiento natural. Esto, se logra mediante varios mecanismos que modifican las proteínas en la membrana plasmática

del espermatozoide, conforme estas células se desplazan por el túbulo epididimario. Durante el tránsito por el epidídimo, los espermatozoides deben someterse a los siguientes procesos:

- 1.- Mantener la concentración para hacer posible un eyaculado de tamaño práctico, en: conductos eferentes, segmento inicial.
- 2.- Adquirir la maduración funcional, en: la cabeza, el cuerpo y también en la cola proximal, en algunas especies.
- 3.- Ser almacenados en un estado de reposo hasta la eyaculación, en la cola del epidídimo.
- 4.- La eliminación de los espermatozoides con alteraciones.
- 5.- Todas las regiones del epidídimo también deben proporcionar la aireación, alimentación, eliminación de residuos y la protección física-bioquímica para el espermatozoide.

El epidídimo además de tener la función de almacenamiento, se encarga de la maduración espermática (Damm y Cooper, 2010), un proceso que es complejo y secuencial, aunque la totalidad de modificaciones que experimentan los espermatozoides es desconocida y puede diferir entre especies, por lo cual, aún se estudia extensamente, no obstante, si es conocido que el alcance de este proceso de maduración implica una serie de modificaciones post-testiculares en el espermatozoide de mamíferos (Palomo-Peiró, 1995), que facilitaran o darán lugar a cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos, que conllevan al desarrollo progresivo de la capacidad fertilizante en estas células, los cuales ocurren entre las diferentes regiones: cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, dentro de ellos se puede mencionar a los siguientes:

II.2.3.1.1 Cambios bioquímicos

El epidídimo de los mamíferos es de gran relevancia, debido a que proporciona el ambiente intraluminal específico para que ocurran modificaciones bioquímicas necesarias para producir espermatozoides funcionalmente maduros. La membrana plasmática que contiene al espermatozoide, es un componente vital durante los eventos tempranos en la fertilización, tras someterse a amplios cambios bioquímicos que permiten una distribución espacial en los componentes del glicocalix, denominado de esta manera por la gran cantidad de proteínas que se encuentran glicosiladas (Rodríguez-Tobón, 2016).

La glicosilación es una de las modificaciones post-transcripcionales presentes en las proteínas de la superficie del espermatozoide, ocurre en las glicoproteínas (que son estructuralmente macromoléculas complejas compuestas de una cadena principal peptídica a la que una o más cadenas de glicanos se unen covalentemente) en la superficie del espermatozoide, esto se sabe, debido a que la porción de carbohidratos de las proteínas cada vez está mejor reconocido, incluyendo múltiples modificaciones bioquímicas intracelulares y extracelulares, que ocurren en el espermatozoide que se desplaza de la región de la cabeza a la región de la cola del epidídimo, y a pesar de que ciertos detalles de estas modificaciones aún no están claros, existen evidencias de que en la superficie del espermatozoide, los glicoconjugados son modificados durante el paso por el epidídimo, debido a que dos conjuntos de enzimas que modifican glicoproteínas: (1) glicohidrolasas, una clase de enzimas hidrolíticas que separan residuos de azúcar de glicoconjugados existentes, y (2) glicosiltransferasas, una clase de enzimas sintéticas que añaden residuos de azúcar a un azúcar donante (azúcar de nucleótido), están presentes en altas concentraciones en el fluido luminal del epidídimo que rodea a los espermatozoides, y modifican a los glicoconjugados de la superficie del espermatozoide (Tulsiani, 2006).

La importancia de los cambios en la superficie celular del espermatozoide durante el proceso de maduración ha sido bien documentada, lo que ha permitido relacionar la

adquisición de la capacidad fertilizante del espermatozoide, con algunas de dichas modificaciones, estos cambios son imprescindibles para que ocurran otros después de que la célula espermática sea depositada en el tracto reproductor femenino y se lleven a cabo los procesos de capacitación y reacción acrosomal (Toshimori, 1998; Tulsiani, 2006; Chandra *et al.*, 2008; Toyonaga, Kaihara y Tsutsui, 2011).

Debido a que el epidídimo es un órgano que tiene una alta actividad de absorción y secreción, y que la osmolaridad y composición química del fluido secretado varía de un segmento a otro, la membrana plasmática del espermatozoide, expuesto directamente al fluido epididimario, se modifica constantemente a medida que la célula espermática pasa a través de las distintas regiones del órgano.

El desarrollo de técnicas encaminadas a la detección, liberación, separación y análisis de los oligosacáridos presentes en glicoproteínas y glicolípidos ha permitido el desarrollo de modelos para estudiar las bases moleculares de la interacción carbohidrato-proteína. Estas porciones glicánicas pueden ser reconocidas específicamente por lectinas, término que define en la actualidad a una amplia gama de proteínas de origen vegetal y animal, capaces de unirse en forma específica a los residuos de carbohidratos de los glicoconjugados por su afinidad específica con los azúcares, formando uniones muy similares a las de las enzimas con sus sustratos y los anticuerpos con sus respectivos antígenos (Micucci y Camps, 1987), aunque las lectinas no poseen actividad enzimática y no son producto de una respuesta inmune (Hernández-Cruz *et al.*, 2005).

Debido a sus propiedades específicas, las lectinas vegetales se han utilizado como herramientas en la bioquímica, biología celular, inmunología, genética y biomedicina con propósitos analíticos y preparativos, así como para el diagnóstico y terapia en el cáncer (Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005; Hernández-Cruz *et al.*, 2005). Las lectinas vegetales suelen clasificarse de varias maneras, por ejemplo: la especificidad hacia el monosacárido que inhibe su actividad hemaglutinante (Tabla 1) y hacia las estructuras oligosacáridicas que reconocen, clasificándolas en lectinas que reconocen

N-glicanos, que son oligosacáridos unidos a un residuo de asparagina en las proteínas mediante una N-acetil-glucosamina y lectinas que reconocen a los O-glicanos, que son oligosacáridos unidos a un residuo de serina o treonina en las proteínas mediante una N-acetilgalactosamina.

Tabla1. Lectinas vegetales utilizadas para el estudio de glicoproteínas.

Monosacárido	Lectina	Abreviatura
Manosa	<i>Canavalia ensiformis</i>	ConA
	<i>Ricinus communis</i>	RCA
β -galactosa	<i>Glycine max</i>	SBA
N-acetil- α -D-galactosamina	<i>Arachis hypogaea</i>	PNA
	<i>Amaranthus leucocarpus</i>	ALL
N-acetilglucosamina	<i>Triticum vulgare</i>	WGA
Ácido siálico		
	<i>Ulex europaeus</i>	UEA
Fucosa	<i>Lotus tetragonolobus</i>	LTA
α -N-acetilneuramínico	<i>Limulus polyphemus</i>	LPA

Especificidad de lectinas vegetales hacia el monosacárido que inhibe su actividad hemaglutinante y hacia los oligosacáridos que reconocen (adaptado de: Hernández-Cruz *et al.*, 2005).

Además, se sabe que el contenido de glicoconjugados en los espermatozoides, es un buen indicador de la maduración que los espermatozoides deben presentar a través del recorrido que realizan por el epidídimo (Tajiri *et al.*, 2012). En acontecimientos posteriores, como la fertilización, los glicoconjugados son una forma altamente compleja, que participa en el reconocimiento célula a célula, en la unión del espermatozoide a la zona pelúcida, en la reacción acrosomal y en la fusión espermatozoide-ovocito (Cardona-Maya y Cadavid, 2005). Así, se ha reportado que lectinas como: *Canavalia ensiformis* aglutinina (Concanavalina A, Con A), que se une a residuos de manosa, un carbohidrato que participa en la unión del espermatozoide con la zona pelúcida durante el proceso de fertilización, además de que está presente de manera permanente en la membrana de los espermatozoides (Aliabadi *et al.*, 2013). *Triticum vulgare* aglutinina (WGA), la cual detecta residuos de N-acetilglucosamina y/o de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) y ácido N-glicolil (Neu5Gc), que

son las dos principales formas de residuos encontradas en glicanos de mamíferos), ambos carbohidratos importantes en los espermatozoides, pues N-acetilglucosamina requiere estar presente por estar considerado que tiene participación en la interacción entre gametos, además que se ha reportado puede inducir la reacción acrosomal en espermatozoides a través de mecanismos similares a los descritos en la inducción de esta reacción por la zona pelúcida, y estar correlacionado con la fertilización *in vitro* (Cardona-Maya y Cadavid, 2005; Tulsiani y Abou-Haila, 2012), mientras que el ácido siálico se ha relacionado con un incremento en la carga negativa total de la superficie del espermatozoide durante el tránsito epididimal, para el caso de la rata, se ha descrito por varios investigadores, que es en la cabeza de los espermatozoides donde se tienen más altos valores de uniones de ácido siálico a la membrana, y conforme avanzan a través del túbulo epididimario, disminuye a valores más bajos las uniones en la cola del espermatozoide, por lo que es posible que la unión de ácido siálico a la membrana pueda ser relevante y estar relacionada a la maduración espermática en la rata (Hall y Killian, 1987) y con la posterior unión del espermatozoide al ovocito.

Ulex europaeus aglutinina (UEA) que reconoce residuos de fucosa, cuya adecuada presencia tienen también relación con la unión especie-específica del espermatozoide con el ovocito, mediante la unión de este carbohidrato a proteínas de la zona pelúcida (Tulsiani y Abou-Haila, 2012), pero además se ha demostrado que la fucosa presente en el espermatozoide y en el plasma seminal tiene la capacidad de formar una reserva de espermatozoides en el oviducto, cuando está se une a proteínas del epitelio celular del oviducto, involucradas en el reconocimiento de fucosa (Ignatz *et al.*, 2001), sin embargo, en el estudio realizado por Hall y Killian (1987), encontraron que la presencia de fucosa en membrana de espermatozoides de rata, que transitan por el epidídimo, disminuye 3 veces en la región de la cola al hacer una comparación con la región de la cabeza.

Los cambios que ocurren durante el proceso de maduración espermática en la presencia de los carbohidratos de membrana incluyen a otras moléculas como: D-galactosa, que disminuye a medida que la célula progresa a lo largo del epidídimo,

mientras que los niveles de N-acetilgalactosamina, por el contrario, son superiores en la membrana de los espermatozoides de la cola que en los de la cabeza del epidídimo. Otros residuos de carbohidratos, como la α -D-glucosa y manosa se presentan en mayor proporción en las membranas de los espermatozoides de la cabeza y de la cola pero, en muy baja cantidad en las de las células del cuerpo epididimario. En relación con el contenido de manosa en la membrana plasmática, los cambios que se presentan en el epidídimo, pueden ser un buen indicador de maduración en los espermatozoides (Belmonte, romano y Sosa, 2002).

Dentro de los cambios bioquímicos que se presentan en los lípidos de la membrana, estos se van modificando, en la medida que los espermatozoides progresan por el conducto epididimario durante el proceso de maduración, así como también hay cambios en las propiedades físicas y químicas, se considera que algunos de estos cambios en la presencia y contenido de lípidos podría causar diferencias en la susceptibilidad al choque térmico, en la fluidez de membrana o cambios en la permeabilidad de esta, como sería de esperar, tras la pérdida de fosfolípidos y/o incremento de los ácidos grasos poliinsaturados (Palomo-Peiró, 1995; Rodríguez-Tobón, 2016).

Las modificaciones en la composición lipídica de la membrana, están relacionadas con la estabilización de la misma para el almacenamiento epididimario y el transporte de los espermatozoides a través de los tractos reproductores masculino y femenino, y con la adquisición de la capacidad fertilizante de los gametos. Los cambios en el modelo de distribución de glicoproteínas dentro de la membrana plasmática del espermatozoide, durante el tránsito epididimario, parecen reflejar o inducir cambios tanto en las proteínas como en los lípidos, como se evidencia en un aumento en la relación esterol-fosfolípidos, una disminución en la cantidad relativa de fosfolípidos y cambios en los ácidos grasos predominantes en los mismos. Por otro lado, los lípidos de la membrana plasmática también experimentan cambios en su composición en la porción de la membrana que está en relación directa con el proceso de capacitación y reacción acrosomal, en función de la región epididimaria de procedencia de los

espermatozoides, el contenido de esteroides libres, como el colesterol y el demosterol, en la porción anterior de la membrana plasmática, disminuye de forma significativa durante el tránsito epididimario, por otra parte se observa un aumento de casi el doble de la relación molar colesterol-fosfolípidos en la membrana, a medida de que los espermatozoides avanzan de la cabeza a la cola del epidídimo.

El hecho que, en el epidídimo, particularmente en el cuerpo, haya una elevada actividad de síntesis de colesterol, puede sugerir que sea una de las moléculas lipídicas integradas en la membrana plasmática durante la maduración (Keber, Rozman y Horvat, 2013; Rodríguez-Tobón, 2016). De hecho, a pesar de que el contenido lipídico total de los espermatozoides decrece durante la maduración epididimaria, se ha demostrado que la relación molar de colesterol-fosfolípidos aumenta en la membrana plasmática periacrosomal aislada durante el tránsito, debido al efecto estabilizador del colesterol sobre la membrana, lo que resulta en un aumento de la relación colesterol-fosfolípidos y en una menor fluidez de la misma, para prevenir la capacitación y reacción acrosomal prematura (Keber, Rozman y Horvat, 2013; Whitfield *et al.*, 2015).

La composición fosfolipídica de la membrana del espermatozoide epididimario, se caracteriza por un predominio de etanolamina y fosfoglicerilcolina (70-80 % de fosfolípidos de membrana). La fracción de etanolamina disminuye sustancialmente en relación a la fracción de fosfoglicerilcolina a lo largo del tránsito y de la maduración epididimaria. De igual forma se han observado cambios, entre la cabeza y la cola del epidídimo, en la distribución de fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina en la membrana plasmática de espermatozoides durante dicho proceso, así el aumento en densidad de esteroles en la membrana plasmática que cubre el acrosoma durante este tránsito, podría estabilizar la membrana e inhibir la reacción acrosomal prematura durante el transporte a través de los tractos genito-reproductores, es importante remarcar que estos cambios también ocurren en glicoproteínas específicas y otros péptidos en la membrana de la región de la cola del espermatozoide (Rodríguez-Tobón, 2016; Villaverde, Hetherington y Baker, 2016).

Entre los componentes proteicos de superficie de la membrana del espermatozoide durante el tránsito, se puede mencionar que la mayoría se caracterizan por un bajo peso molecular (rango de 14-36 KDa), y un alto nivel de glicosilación, además de que la mayoría de estas proteínas suelen ser especie-específicas, las cuales se unen a la membrana sólo durante la maduración, y desaparecen en el tracto genital femenino, sin embargo, otras se mantienen presentes en la membrana del espermatozoide durante la fecundación del ovocito (Palomo-Peiró, 1995; Rodríguez-Tobón, 2016). Una de las proteínas que tiene un papel importante en la función de capacitación y reacción acrosómica del espermatozoide de algunas especies animales, es el factor estabilizador del acrosoma (ASF), el cual es secretado por las células localizadas en el cuerpo del epidídimo y posiblemente se une a la superficie espermática en la región distal de la cola epididimaria. De forma general, en las especies animales las proteínas presentes en el fluido epididimario participan tanto en el proceso de maduración espermática (promoviendo patrones de movimiento y unión a la zona pelúcida), como en la función de almacenamiento de los espermatozoides en la cola del epidídimo (manteniendo la quiescencia de los espermatozoides, disminuyendo la movilidad espermática). Por otra parte, las distintas proteínas de la membrana plasmática presentes en los espermatozoides de cada región epididimaria en función con el proceso de maduración, pueden participar en los procesos de capacitación espermática, migración uterina del espermatozoide y en el reconocimiento, unión y fertilización del ovocito.

Otros de los cambios bioquímicos que ocurren en el espermatozoide, ligados con la maduración espermática epididimaria, es el mantenimiento de la integridad y la compactación del DNA espermático, considerados de los factores más importantes que se analizan actualmente en el estudio de la fertilidad masculina (Ortega López *et al.*, 2010).

Durante el paso de cada espermatozoide, por el epidídimo, y pese a los continuos cambios que deben tener (en su estructura y funcionalidad), se debe mantener de forma normal la integridad y el estado de compactación de la cromatina del

espermatozoide; para ello es necesario que el DNA sea resguardado en los cromosomas. La cromatina es el nombre colectivo que se le da a las cadenas largas de DNA y a las proteínas asociadas llamadas nucleoproteínas, que en el caso del espermatozoide son llamadas protaminas. Estas son proteínas pequeñas (50 aminoácidos) de localización exclusiva en la cromatina del espermatozoide maduro, esa particularidad permite que su estructura y composición sea marcadamente diferente de la cromatina de las células somáticas. Una de las características de las protaminas es que son básicas debido a su alto contenido en arginina (casi el 60%) y también son ricas en cisteína. La disposición del complejo DNA-protamina es diferente al complejo DNA-histona, es decir, en los núcleos somáticos, el DNA se enrolla alrededor de las histonas formando los nucleosomas; mientras que, en el núcleo de los espermatozoides, es la protamina quien se enrolla a lo largo de la molécula de DNA; estableciendo puentes electrostáticos intercatenarios entre los residuos de arginina (cargados positivamente) y los grupos fosfato del DNA (cargados negativamente). Una vez que se forma el complejo DNA-protamina durante la transformación de las espermatidas a espermatozoides en la espermiogénesis, y el DNA está compactado, el proceso de transcripción en el espermatozoide se vuelve inactivo. La razón de la importancia de la integridad, compactación y estabilidad de la cromatina en los espermatozoides, se debe a que las alteraciones en la estructura de la cromatina pueden reducir la fertilidad y con ello el éxito reproductivo de los varones, pues; una correcta condensación le permite al espermatozoide:

a) Adquirir una morfología hidrodinámica que le facilite el desplazamiento a través del tracto reproductor femenino.

b) Facilidad de transportar su DNA.

c) Inactivar transitoriamente al DNA y protegerlo de posibles daños (mecánicos y químicos) durante el almacenamiento en la cola del epidídimo, y en el viaje a través del complejo tracto reproductor femenino.

La compactación del DNA, se debe a la formación de enlaces covalentes y no covalentes entre los aminoácidos que forman a la protamina; los enlaces covalentes están representados por uniones disulfuro (S-S), que se crean por la oxidación de dos grupos tiol (-SH) provenientes de dos moléculas de cisteína; los enlaces no covalentes, resultan de la estabilización de los -SH por Zn^{2+} . Adicionalmente, un buen número de -SH permanecen libres y pueden ser oxidados y formar nuevas uniones S-S, lo que probablemente aumente la resistencia de la cromatina a descondensarse (Oliva, 2006; Oliva-Hernández y Marcos-González, 2010).

Hay numerosas publicaciones sobre la utilidad de diversos métodos en los cuales se analiza el estado de la cromatina espermática, sin embargo, la integridad y el estado de la cromatina no puede ser evaluada por una simple observación a través de un microscopio compuesto, por lo que se tiene que recurrir a técnicas específicas. Así, el estado de la cromatina puede ser evaluado a través de la determinación de su madurez, integridad, condensación y estabilidad. Uno de los métodos más sencillos es la tinción con naranja de acridina (NA), con al cual se comprueba el grado de desnaturalización del DNA espermático en función de su unión al colorante NA (Ortega López *et al.*, 2010). Este fluorocromo se une al DNA de manera intercalante por una unión no covalente. Para observar esta unión, es necesaria la microscopía epifluorescente y/o la citometría de flujo. En estas técnicas la intensidad de la señal fluorescente es proporcional a la unión del fluorocromo al DNA, de igual manera, en una muestra de espermatozoides, el teñido de las células con la tinción de azul de anilina (AA) permite diferenciar los espermatozoides inmaduros, aun con presencia de histonas y de los espermatozoides maduros con la presencia de protaminas. El colorante AA se combina selectivamente con las histonas, de tal manera que se observarán de color azul los núcleos de las células germinales y de los núcleos inmaduros de los espermatozoides que no han sufrido la sustitución de histonas por protaminas, quedando así, los núcleos de los espermatozoides maduros sin teñir (Oliva-Hernández y Marcos-González, 2010).

II.2.3.1.2. Cambios morfológicos

De manera similar a lo que ocurre con los cambios bioquímicos de los espermatozoides en el epidídimo, el microambiente de este órgano favorece la disminución en el tamaño del acrosoma y en el diámetro mitocondrial, así como la migración de la GC.

Se ha propuesto que todos estos cambios en el espermatozoide previenen en el eyaculado la presencia de espermatozoides con una carga genética anormal o incompleta, evita la presencia de células infértiles que pudieran limitar el éxito reproductivo de las especies (Palomo-Peiró, 1995, Rodríguez-Tobón, 2016). Además, se sabe que los principales cambios bioquímicos y morfológicos que sufren los espermatozoides, ocurren durante su tránsito epididimario y son los que conllevan a los cambios fisiológicos, que permiten culminar con un espermatozoide altamente móvil y con la completa capacidad para la fecundación, para lo cual cada región del epidídimo tiene una función específica (Dacheux *et al.*, 2005; Rodríguez-Tobón, 2016).

II.2.3.1.3. Cambios fisiológicos

La funcionalidad óptima de los espermatozoides depende tanto de los procesos que ocurren en el interior como en el exterior de estas células. La combinación adecuada de los cambios bioquímicos y de los cambios fisiológicos, favorece que en los espermatozoides puedan ocurrir procesos ligados con la capacidad fertilizante, como pueden ser: la adquisición de un marcado incremento en el vigor de la movilidad; el paso del movimiento circular a rectilíneo, la capacidad de experimentar capacitación y la capacidad para interaccionar con la zona pelúcida y finalmente llevar a cabo fertilización al ovocito.

Se resumen todos estos cambios en los espermatozoides; así como la región en donde suceden (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción general de la maduración de espermatozoides en el epidídimo.

SEGMENTO INICIAL	CABEZA	CUERPO	COLA
	<p>CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DE CARBOHIDRATOS</p> <p>CAMBIOS EN FOSFOLÍPIDOS DE MEMBRANA</p> <p>MODIFICACIÓN DEL COCIENTE FOSFOLÍPIDOS: COLESTEROL DE MEMBRANA</p> <p>AUMENTO EN LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA</p> <p>DISMINUCIÓN DE Ca²⁺ INTRACELULAR</p> <p>AUMENTO DE PUENTES DISULFURO</p> <p>SECRECIÓN DE PROTEÍNAS DE MOVILIDAD PROGRESIVA</p> <p>FOSFORILACIÓN DE RESIDUOS DE TIROSINA EN PROTEÍNAS</p> <p>SECRECIÓN DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA REACCIÓN DEL ACROSOMA</p> <p>AUMENTO DE pH INTRACELULAR</p> <p>DISMINUCIÓN EN LA RESISTENCIA AL CHOQUE EN FRÍO</p> <p>EXPRESIÓN DE MOVILIDAD DESPUÉS DE DILUCIÓN</p> <p>PRODUCCIÓN EFICIENTE DE ENERGÍA</p> <p>EXPRESIÓN DE LA CAPACIDAD FERTILIZANTE</p> <p>CAPACIDAD DE UNIRSE AL OVOCITO</p> <p>FERTILIDAD NORMAL Y TASA DE NACIMIENTO</p> <p>DISMINUCIÓN EN EL TAMAÑO DEL ACROSOMA</p> <p>TRANSLOCACIÓN DE LA GOTA CITOPLASMÁTICA</p>		
	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;"> <p>■ CAMBIOS BIOQUÍMICOS</p> <p>■ CAMBIOS FISIOLÓGICOS</p> <p>■ CAMBIOS MORFOLÓGICOS</p> </div>		
Concentración de espermatozoides	Maduración temprana de los espermatozoides	Continuación de cambios para la maduración de espermatozoides	Maduración final y almacenamiento de espermatozoides

Una visión general de la maduración espermática epididimaria, las diferentes líneas indican la localización aproximada de los múltiples cambios que se han descrito en los espermatozoides, los cuales ocurren conforme transitan por las diferentes regiones del epidídimo, para su maduración. Adaptado de Amann *et al.*, 1993 en: Marengo, 2008.

II.2.4. Regulación hormonal del epidídimo

Los andrógenos son hormonas esteroides masculinas que juegan un papel crucial en la masculinización del feto, en el desarrollo de los órganos reproductores internos y externos, así como en el desarrollo de las características sexuales secundarias masculinas. El principal andrógeno circulante es la T, que se sintetiza y secreta por las células de Leydig en los testículos. En algunas células y tejidos diana, la T se convierte en el metabolito más potente 5 α -dihidrotestosterona (DHT) por la enzima esteroide 5 α -reductasa. La T y la DHT ejercen sus acciones mediante la unión al mismo receptor para andrógenos (RA) intracelular (Robaire y Hamzeh, 2011). El RA es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares. Actúa como factor de transcripción receptor-ligando y se une como un homodímero a elementos de respuesta a hormona. Estos elementos se denominan elementos de respuesta a andrógenos clásicos (ERAs), y al menos *in vitro* estos también son reconocidos por otros receptores de esteroides.

Si bien, la función del epidídimo es dependiente de andrógenos, no solamente este tipo de hormonas esteroides participan, pues la T no suele únicamente ser 5 α -reducida en las células epiteliales a DHT, sino que también suele ser aromatizada en estas células a 17 β -estradiol (E₂) por la enzima aromatasa P450, realizando un papel en las funciones que debe desempeñar el epidídimo con los espermatozoides, es decir, que la fisiología del epidídimo está regulada por andrógenos y estrógenos, a partir de la producción y secreción de T, la cual es necesaria para regular la morfofisiología de células epiteliales, prevenir la muerte celular y regular la expresión y secreción de proteínas, lo que asegura la maduración y almacenamiento de los espermatozoides (O'Hara *et al.*, 2011; Kerkhofs *et al.*, 2012).

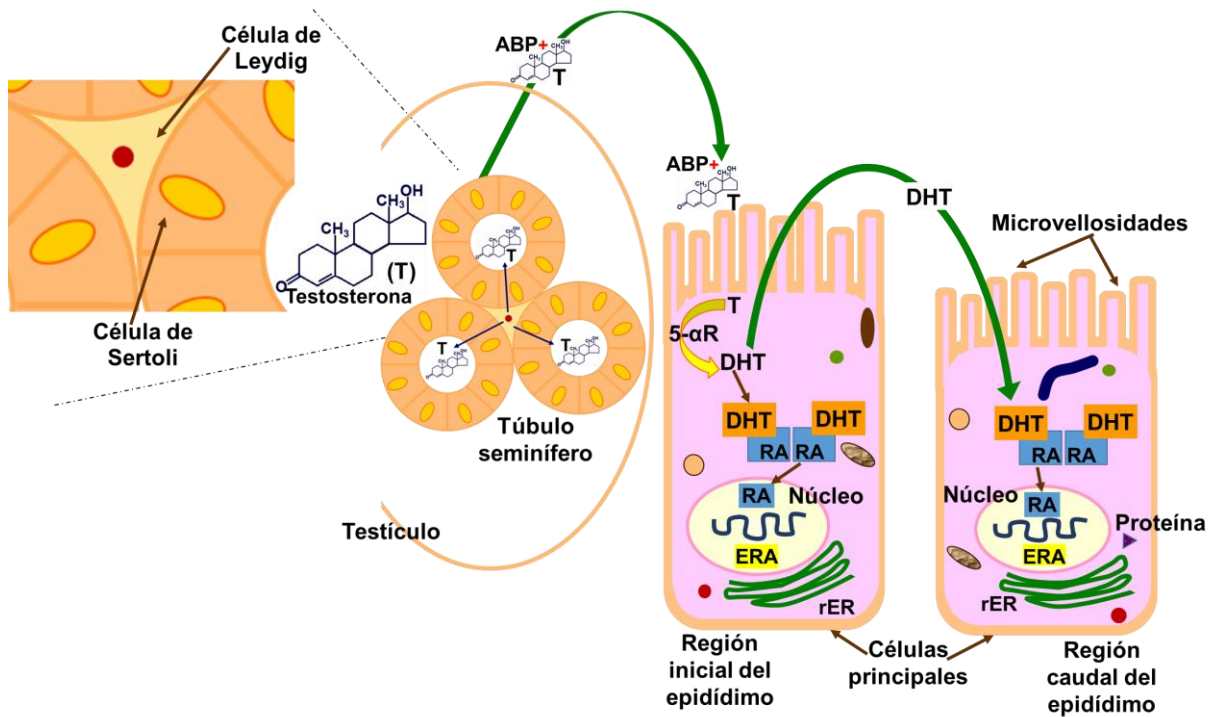


Figura 5. Regulación hormonal del epidídimo por la testosterona (T). Al epidídimo la T llega por medio de la proteína transportadora de andrógenos (ABP), y se metaboliza a 5 α -dihidrotestosterona (DHT), la DHT ejerce su acción a través del receptor para andrógenos (RA) intracelular. El RA a su vez actúa como un factor de transcripción receptor-ligando y se une como un homodímero a los elementos de respuesta para andrógenos (ERA), para que se lleve a cabo la síntesis de proteínas en el retículo endoplásmico rugoso (rER), para el mantenimiento y la función del epidídimo (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2016).

II.3. Parámetros de calidad espermática

Una vez que los espermatozoides han adquirido la maduración espermática y han sido almacenados en la cola del epidídimo, recorrerán el conducto deferente, un tubo muscular que impulsa a los espermatozoides hacia afuera gracias a las contracciones del músculo liso. Los espermatozoides llegarán primero a la ampolla, en donde se agregan las secreciones de la vesícula seminal y posteriormente el fluido seminal será impulsado a través de los conductos eyaculatorios hacia la uretra, pasando primero por la próstata, en donde se agregan nuevos fluidos para formar el semen. Finalmente, el semen es eyaculado por el extremo de la uretra. Es en estas muestras de eyaculado en donde se analizan los parámetros de calidad espermática. De acuerdo con la OMS (WHO, 2010), y con el establecimiento del manual que sirve de guía en los laboratorios

de andrología, es posible analizar la calidad espermática, para determinar el estado y condición de fertilidad que tiene un varón. Los parámetros más comunes a tener en cuenta en una evaluación de la calidad espermática son:

- **Tiempo de licuefacción:** Tras la eyaculación el semen presenta un estado coagulado y necesita licuarse para proceder a su estudio. En condiciones normales el semen queda licuado totalmente a los 60 minutos tras la eyaculación.
- **Viscosidad:** Si la muestra es muy viscosa puede deberse a una disfunción prostática.
- **Volumen:** El volumen normal de un eyaculado transcurridos de 3 a 5 días de abstinencia es de 1.5 mL aproximadamente. Un volumen inferior se denomina hipospermia.
- **Color:** El color habitual del semen es blanco opalescente, ligeramente amarillento. En casos en donde el color se vea alterado es conveniente estudiar las posibles causas.
- **pH:** El valor debe encontrarse por encima de 7.1. Valores inferiores podrían indicar azoospermia (ausencia de espermatozoides) o procesos inflamatorios crónicos.
- **Concentración de espermatozoides:** El valor normal es de 15 millones por cada mL de eyaculado o 39 millones en la totalidad de la muestra. Si no se alcanzan esos valores hablamos de oligozoospermia.
- **Movilidad:** Se valora el porcentaje de espermatozoides móviles y el de progresivos (móviles que se desplazan). Los móviles progresivos deben superar el 32 %, de lo contrario se denomina astenozoospermia.
- **Morfología:** En un espermiograma normal debe haber igual o más del 4 % de espermatozoides normales. Si se encuentra por debajo de este valor se denomina teratozoospermia.

Dentro de los parámetros microscópicos, es importante señalar a la vitalidad y concentración espermática.

II.3.1. Vitalidad espermática

El análisis de vitalidad espermática es necesario para poder conocer el porcentaje de espermatozoides vivos en contraste con los espermatozoides muertos, ya que de acuerdo con el manual de la OMS (2010), el porcentaje de espermatozoides vivos debe superar el 58 %, si fuera inferior hablaríamos de necrozoospermia, una condición que afecta a la fertilidad del varón.

El empleo de esta prueba puede corregir y fortalecer los datos cuando se tiene una muestra con movilidad espermática reducida o cuando muchos espermatozoides están inmóviles, pues al evaluar el porcentaje de espermatozoides vivos que contiene una muestra, se puede diferenciar a los espermatozoides inmóviles muertos y a los espermatozoides vivos inmóviles (Björndahl, Söderlund, y Kvist, 2003), debido a que cuando una célula muere, se vuelve permeable y puede absorber colorantes vitales, lo que nos permite visualizarlos con un determinado color. Después de realizar la tinción de vitalidad, los espermatozoides vivos no absorben el colorante mientras que los muertos sí, es decir, que ver al microscopio se puede diferenciar entre espermatozoides teñidos y no teñidos (vivos y muertos respectivamente) (WHO, 2010).

II.3.2. Concentración espermática

Como parte de una de las pruebas básicas del análisis espermático se tiene que realizar el conteo del número de espermatozoides que hay en una muestra de semen, debido a que de forma natural durante el recorrido que realizan los espermatozoides hacia el ovocito en el interior de tracto reproductor femenino, existe un amplio número de pérdidas, por lo cual es requerido un número suficiente en la concentración inicial, y así no tener problemas con la cantidad adecuada de espermatozoides que pueden

fertilizar al ovocito. Para facilitar el conteo de espermatozoides, se emplea un instrumento llamado cámara de conteo. Bajo el microscopio, este aparato se ve como una cuadrícula perfectamente definida, y hace posible contar los espermatozoides. Una vez contados los espermatozoides, se calculan los millones de espermatozoides por mL de semen eyaculado. Según la OMS, se considera normal valores iguales o superiores a 15 millones de espermatozoides/mL de semen eyaculado.

Si estamos ante un caso de concentración menor de 15 millones/mL decimos que el hombre padece oligozoospermia u oligospermia. Cuando no se encuentra ningún espermatozoide en el semen, se llama azoospermia. En este caso se distingue entre azoospermia secretora en la que no se producen espermatozoides, y azoospermia obstructiva en la que sí se producen, pero no logran salir al exterior porque hay algún conducto de salida bloqueado.

II.4. Efectos conocidos del cadmio sobre la función epididimaria

Los estudios que reportan efectos del Cd sobre la función epididimaria se centran en los parámetros de calidad espermática en muestras de eyaculados, tanto de humanos como de roedores, en estos estudios se ha demostrado una disminución en la concentración de espermatozoides, así como, en la cantidad de espermatozoides vivos (Järup, 2003; ATSDR, 2004; Haouem *et al.*, 2008). También se sabe, que el Cd causa un alto número de anomalías morfológicas a lo largo de todo el espermatozoide, que afectan el movimiento progresivo y posteriormente el reconocimiento y fertilización del ovocito, además de que el Cd causa daño en el DNA de los espermatozoides (Taha *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013), a través de las EROs, que pueden causar LPO de las membranas, lo que se ha relacionado con azoospermia en varones infértiles (Akinloye *et al.*, 2006). Otro de los daños al DNA es la descompactación de la cromatina espermática por la pérdida de las S-S entre los residuos de cisteína que unen a las protaminas y juntos estabilizan la cromatina durante los estadios finales de la maduración espermática (Quintero-Vásquez, Bermúdez-Cruz y Castillo-Cadena, 2015). Estas alteraciones, también se han

asociado con la infertilidad. Sin embargo, en estudios con exposición de espermatozoides a CdCl_2 *in vitro*, se ha reportado que no tiene un efecto sobre la integridad de la cromatina espermática pero sí hay efecto en la fragmentación del DNA espermático (Méndez, Báez y Villamediana, 2011).

En un estudio realizado en ratas Wistar para ver el efecto del Cd en la función epididimaria por Ribeiro (2013), tras la administración en una sola dosis a diferentes concentraciones de CdCl_2 (1.1, 1.4 y 1.8 mg/kg), se observó que entre mayor es la dosis existe una menor presencia de espermatozoides en el lumen del túbulo de la región del segmento inicial, la cabeza y la cola del epidídimo. En este mismo estudio, se evaluó el diámetro del epitelio y la luz del túbulo, encontrándose un aumento en el espesor del epitelio de la cabeza del epidídimo de los animales tratados con 1.1 y 1.4 mg/kg de Cd, sugiriéndose que este efecto se debe a una incapacidad en la reabsorción del fluido luminal. Con respecto a la luz del túbulo, se observó que, en la región de la cola, de los animales tratados con 1.8 mg/kg de Cd, una mayor proporción en el diámetro de la luz y una disminución en el número de espermatozoides. Así mismo, la exposición a Cd disminuye la concentración y movilidad de los espermatozoides del epidídimo (Benoff *et al.*, 2009).

A pesar de que los estudios antes mencionados analizan los efectos del Cd sobre parámetros de calidad espermática y algunas características histológicas, falta considerar los efectos de este metal en los cambios bioquímicos propios de la maduración epididimaria, como la glicosilación de la membrana de los espermatozoides, que involucra azúcares como N-acetilglucosamina, ácido siálico, manosa y la fucosa, así mismo el efecto del Cd en los procesos relacionados con la adquisición de la movilidad espermática, como es el caso de la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas de espermatozoides.

III. JUSTIFICACIÓN

El epidídimo es un órgano en donde se lleva a cabo la maduración espermática, por lo que es necesario el paso de los espermatozoides a través de este órgano para lograr adquirir las características funcionales en la movilidad y la capacidad fertilizante. Hay evidencias que indican que la calidad de los espermatozoides en los seres humanos y otros animales ha disminuido, por lo que se podrían relacionarse con los cambios en el medio ambiente que se han presentado en los últimos años.

Es razonable suponer que, si la calidad del semen está disminuyendo en los hombres a nivel mundial, puede ser al menos en parte debido a tóxicos ambientales que ponen en peligro el proceso de maduración de los espermatozoides del epidídimo. Tal es el caso del Cd, el cual se encuentra en grandes cantidades como sub-producto de las actividades antropogénicas, y se sabe produce una disminución importante en la concentración de T y así mismo en la concentración de espermatozoides, efecto que puede modificar la maduración de dichas células durante su estancia en el epidídimo, la cual puede ser estudiada por medio de indicadores como la compactación e integridad del DNA, cambios en la presencia de carbohidratos de la membrana del espermatozoide importantes para la adhesión con el oviducto, posteriormente con el reconocimiento y unión con el ovocito, como lo son: manosa, N-acetilglucosamina, ácido siálico y fucosa, entre otros, la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas relacionadas con la movilidad y funcionalidad del espermatozoide, entre otros, y con ello verse comprometida la calidad y funcionalidad espermática, y por tanto la fertilidad masculina.

Por otro lado, los estudios en toxicología del epidídimo no sólo dilucidan las exposiciones de tóxicos ambientales que se dirigen a este órgano, sino que también fomenta una mejor comprensión de la estructura y la función normal del epidídimo.

IV. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto del Cd sobre indicadores de la maduración espermática epididimaria en la rata Wistar.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar en ratas expuestas a Cd la concentración de este metal en sangre y la acumulación en las tres regiones del epidídimo: cabeza, cuerpo y cola.
2. Evaluar la concentración de T en suero de ratas Wistar expuestas a Cd.
3. Analizar la determinación espermática en términos de vitalidad y concentración, en: cabeza, cuerpo y cola del epidídimo de ratas Wistar expuestas a Cd.
4. Determinar la distribución y presencia de los carbohidratos: N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa de los espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo de ratas Wistar expuestas a Cd.
5. Analizar el efecto del Cd en la fosforilación en residuos de tirosina de proteínas de los espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo de ratas Wistar expuestas a Cd.
6. Evaluar la compactación e integridad del DNA de espermatozoides de las tres regiones del epidídimo: cabeza, cuerpo y cola de ratas Wistar expuestas a Cd.

VI. HIPÓTESIS

El Cd afectará a los indicadores de la maduración y la determinación espermática epididimaria de la rata Wistar, por bioacumularse en las tres regiones del epidídimo.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos (Ss). Se utilizaron ratas macho recién nacidas de la cepa Wistar, que se obtuvieron del Bioterio de la UAM-Iztapalapa, los cuales se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*, bajo un ciclo de luz-obscuridad controlado (12:12). Los Ss fueron manejados de acuerdo a los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio), en conjunto con los lineamientos de la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa.

Los Ss se distribuyeron en forma aleatoria en 2 grupos:

Grupo I Control: machos recién nacidos tratados por vía intraperitoneal (IP) con 50 microlitros (μL) de solución salina.

Grupo II: machos recién nacidos a los que se les administro, vía IP, 0.25 mg/Kg de cloruro de cadmio (CdCl_2), disuelto en 50 μL de solución salina.

Ambos grupos fueron administrados desde el día 1 hasta los 56 días de vida postnatal. Cuando los Ss cumplieron 90 días de vida, se les practicó eutanasia por decapitación, y se recuperó la sangre del cuerpo en dos tubos Vacutainer, uno con EDTA- K_2 , para determinaciones hematológicas con sangre total, la cual fue empleada para la determinación de Cd en sangre, mediante un espectrofotómetro de absorción atómica, y uno más con gel separador para determinaciones en suero, cuya alícuota de sangre fue primero centrifugada para la separación de suero del paquete celular sanguíneo. El suero se empleó para determinar T por Radio Inmuno Análisis (RIA).

Disección de epidídimos. Se realizó la disección bilateral de ambos epidídimos, para ser divididos en cabeza, cuerpo y cola. De cada una de las tres regiones del epidídimo derecho, se obtuvieron aproximadamente 100 mg de tejido, los cuales fueron almacenados en tubos de polipropileno previamente tratados con ácido nítrico, para

eliminar cualquier otro contaminante, y posteriormente por espectrofotometría de absorción atómica con un horno de grafito, se determinó la acumulación de Cd en tejido. En cada epidídimo izquierdo, se cortó con cuidado el tejido adiposo, y de igual forma se dividió en las tres regiones de estudio, para obtener a los espermatozoides.

Obtención de espermatozoides. Cada región del epidídimo se colocó en un pozo individual que contenía 500 μL de solución Ringer a 36 °C para llevar a cabo la extracción de espermatozoides, la cual se logró mediante la técnica de picado y filtrado, es decir, se picó finamente cada región del epidídimo con tijeras de punta fina, haciendo múltiples cortes, cada picado de epidídimo con solución Ringer, se agitó suavemente y se esperó por un par de minutos para facilitar el desprendimiento de espermatozoides contenidos. La suspensión se filtró haciéndola pasar a través de una malla de lycra (estéril) con un diámetro de trama de 20 micrometros (μm); se enjuagó nuevamente el pozo que contenía el picado con 500 μL de solución Ringer, para filtrar el remanente de material biológico y separar el fluido con espermatozoides del tejido epididimario. Los espermatozoides obtenidos se lavaron mediante centrifugación a 500 G en dos ocasiones durante 5 minutos cada vez, en cada lavado se eliminó el sobrenadante y el botón de espermatozoides fue resuspendido con 1000 μL de solución de Ringer a 36 °C. Una vez terminados los lavados, y resuspendido nuevamente el botón de espermatozoides con 1000 μL de solución de Ringer a 36 °C, se formaron 6 alícuotas de 150 μL cada una.

Análisis en espermatozoides. Al inicio de cada estudio se realizó la determinación espermática, para ello, con cada muestra de espermatozoides lavados, obtenidos de cada una de las tres regiones del epidídimo se evaluó y determinó su calidad en términos de vitalidad y concentración espermática, de acuerdo con los criterios establecidos en el manual de la OMS (WHO, 2010). Además de valorarse la compactación e integridad del DNA y ver la presencia y distribución de los carbohidratos N-acetil glucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa, y la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas de los espermatozoides de las tres regiones del epidídimo de los Ss de ambos grupos.

VII.1. Cuantificación de cadmio en sangre

Se realizó por medio de un espectrofotómetro de absorción atómica modelo AAnalyst 600; Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA, con horno de grafito y un auto-muestreador (AS800), ajustando a una longitud de onda de 228.8 nanómetros (nm) y con una lámpara específica para Cd. Para cada análisis, se utilizó una curva de calibración construida con valores conocidos (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 $\mu\text{g/L}$), y con un estándar de control de calidad conocido para Cd (GFAA Stock mix standard, 5 $\mu\text{g/mL}$), que fue determinado al inicio y final de la corrida de las muestras, para optimizar las condiciones y validación de los resultados; la cuantificación de Cd en sangre, fue expresada en μg de Cd/mL, para lograrlo, se colocó una alícuota de 100 μL de sangre en 400 μL de una mezcla de ácidos (5 partes de ácido nítrico, 2 partes de ácido perclórico y 1 parte de ácido sulfúrico) en tubos de polipropileno, para llevarse a cabo una digestión durante 7 días, posteriormente se tomó una alícuota de la digestión, y se diluyó de la siguiente manera: a) controles, dilución 1:5 v/v (200 μL de la digestión y 800 μL de ácido de curva), y b) tratamiento CdCl_2 0.25 mg/Kg en una dilución 1:50 v/v con ácido de curva (20 μL de la digestión y 980 μL de ácido de curva), para realizar las lecturas en el espectrofotómetro de absorción atómica. Todos los datos fueron registrados y transformados de acuerdo al factor de dilución empleado.

VII.2. Cuantificación de cadmio en epidídimo

En cabeza, cuerpo y cola del epidídimo se determinó la acumulación de Cd por medio del mismo espectrofotómetro de absorción atómica descrito anteriormente. Para cada análisis, se utilizó una curva de calibración construida con valores conocidos (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 $\mu\text{g/L}$), y con un estándar de control de calidad conocido para Cd (GFAA Stock mix standard, 5 $\mu\text{g/mL}$), que fue determinado al inicio y final de la corrida de las muestras, para optimizar las condiciones y validación de los resultados; la cuantificación de Cd en tejido, se expresó en μg de Cd/g de tejido húmedo. A cada muestra de tejido en tubos de polipropileno, se le agregó una porción de x5 volúmenes de ácido nítrico, con respecto al peso de tejido, para llevarse a cabo la digestión

durante 7 días, posteriormente se tomó una alícuota de la digestión, y se diluyó de la siguiente manera: a) controles, dilución 1:20 v/v (50 µL de la digestión y 950 µL de ácido de curva), y b) tratamiento CdCl₂ 0.25 mg/Kg en una dilución 1:50 v/v con ácido de curva (20 µL de la digestión y 980 µL de ácido de curva), para realizar las lecturas en el espectrofotómetro de absorción atómica. Todos los datos fueron registrados y transformados de acuerdo al factor de dilución empleado.

VII.3. Cuantificación de testosterona en suero

La concentración de T en suero fue determinada Por medio de RIA. Para ello, de cada sujeto experimental, tras realizar eutanasia por decapitación, se obtuvo una muestra de sangre en tubos vacutainer con agentes coagulantes y gel de separación, los cuales fueron centrifugados por 15 minutos a 1500 g, para recuperar el suero de cada muestra en tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles y se conservaron a -20 °C hasta que fueron determinadas las concentraciones de T, con la utilización de un kit para la determinación de T (TKTT-1 *Testosterone Kit*, *Diagnostic Product Corporation*, CA, Estados Unidos). Las muestras de suero fueron descongeladas a temperatura ambiente, y agitadas en un vórtex individualmente para su homogenización. Posteriormente, en tubos plásticos con fondo recubierto de anticuerpos específicos anti-T, se depositaron 100 µL de suero problema, y se utilizó un tubo por cada muestra. Después, 200 µL de hormona (T) radiomarcada con yodo (¹²⁵I) se depositaron en cada tubo, además, tubos adicionales sin recubrimiento de anticuerpo fueron utilizados para la realización de la curva de calibración y a partir del estándar incluido en el kit de trabajo se prepararon diluciones de la hormona a cuantificar; estas diluciones se designaron como cuentas totales, las cuales se evaluaron por duplicado. Posteriormente, el contenido de los tubos fue homogenizado por agitación e incubado a 37 °C durante 3 h. Transcurrido ese periodo, las muestras fueron decantadas exceptuando los tubos de las cuentas totales. Los tubos de las muestras a analizar fueron secados por inversión sobre una cama de toallas secantes durante 20 min. Después, todos los tubos se colocaron en el contador de rayos gamma (Cobra II Gamma, Modelo 5005) para medir la radiactividad de cada muestra. Los resultados de

la radiactividad, expresados en cuentas por minuto (cpm) de señal radiactiva, se transformaron a concentraciones de las hormonas cuantificadas en 1 mL de muestra.

VII.4. Determinación espermática

Concentración: Para obtener el número de espermatozoides de cada una de las regiones del epidídimo, tanto de los Ss control como tratamiento de 0.25 mg/Kg de CdCl₂, se realizó una dilución 1:50 v/v en un tubo Eppendorf de la muestra de espermatozoides lavados con agua destilada (se colocaron 980 µL de agua destilada y 20 µL de la muestra de espermatozoides lavados). Posteriormente de cada lado de la cámara de Neubauer se colocó una alícuota de 10 µL de la dilución de espermatozoides-agua (dilución 1:50), y se dejó reposar 1 minuto. En un microscopio óptico se llevó a cabo el conteo de ambos lados de la cámara de la siguiente manera: se contabilizaron 5 cuadros de cada megacuadrado, en ambos lados de la cámara. La suma del total de ambos lados, se dividió entre dos, este resultado a su vez fue dividido entre el factor de conversión correspondiente. El resultado fue expresado en millones de espermatozoides por mL de muestra.

Vitalidad: Para realizar el análisis de la vitalidad espermática en los espermatozoides obtenidos de cada una de las regiones del epidídimo, tanto de los Ss control como tratamiento de 0.25 mg/Kg de CdCl₂, se colocaron 5 µL de solución de eosina-nigrosina, en un portaobjetos, y 5 µL de la muestra de espermatozoides lavados, se mezclaron y se hizo un frotis a lo largo del portaobjetos, el cual se dejó secar a una temperatura de 36.5 °C sobre una termoplatina. Después fue observado el frotis a través de un microscopio de campo claro a 40X, y se contabilizaron 100 espermatozoides. Los espermatozoides muertos se tiñeron de color rosado-morado, mientras que los vivos no presentaban tinción.

El porcentaje de vitalidad fue el número de espermatozoides vivos de la muestra.

VII.5. Evaluación de la distribución y presencia de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa en membrana plasmática de espermatozoides

Para la determinación de los carbohidratos N-acetil glucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa, se utilizaron lectinas conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC), para N-acetilglucosamina y/o ácido siálico se utilizó la lectina *Triticum vulgare* aglutinina (WGA), en el caso de manosa se utilizó la lectina *Canavalia ensiformis* aglutinina (Con A) y para fucosa se utilizó a *Ulex europaeus* aglutinina (UEA). Las lectinas se utilizaron a una dilución de 1:50 y se incubaron con las muestras de espermatozoides durante 30 minutos. Se realizaron dos lavados con solución buffer de fosfatos (PBS), y se procedió a fijarlas con paraformaldehído al 1% en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con PBS y se continuó con los análisis.

Distribución: Se tomó una alícuota de cada muestra de espermatozoides incubados con las lectinas conjugadas con FITC, para observarlos en un microscopio de epifluorescencia marca Olympus BX41, se contaron 100 espermatozoides, y se determinó el patrón y porcentaje de distribución de los carbohidratos.

Presencia: De cada una de las muestras de espermatozoides incubadas con una lectina específica para carbohidratos, se tomó una alícuota de 5×10^6 espermatozoides, que se colocó que en 500 μ L de PBS, para ser analizados en el citómetro de flujo (Becton Dickinson, *Immunocytometry System*, San José, CA, USA), y así poder determinar la intensidad de la fluorescencia (De Maistre *et al.*, 1996; Jiménez *et al.*, 2003). Se evaluaron 10000 eventos por muestra, analizando los histogramas de intensidad de fluorescencia contra el número de células marcadas (Fierro *et al.*, 1996).

VII.6. Fosforilación en residuos de tirosina de proteínas de los espermatozoides

Se tomó una alícuota de 150 μ L de espermatozoides, por cada una de las regiones del epidídimo a partir del picado-filtrado y lavado por centrifugación, tanto de los Ss control

como tratados con 0.25 mg/Kg de CdCl₂. Cada alícuota fue fijada con paraformaldehído al 1 % en PBS, pH 7.2 por 30 minutos a 4 °C.

Se permeabilizaron con saponina 0.05 % por 10 minutos a temperatura ambiente. Los sitios no específicos fueron bloqueados por incubación en 0.1 % albumina sérica bovina (BSA) y 0.1 % de Tween 20 en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La fosforilación de proteínas se identificó usando un anticuerpo monoclonal antifosfoproteína tirosina conjugado con FITC (clone PT-66-FITC, Sigma Chemical Co.), en PBS conteniendo 0.1 % BSA, por 30 minutos a temperatura ambiente. De forma paralela en otra alícuota de 150 µL de espermatozoides se utilizó un anticuerpo IgG_{2b} conjugado con FITC, como control para uniones no específicas.

Distribución: Se tomó una alícuota de cada una de las muestras de espermatozoides incubados con cada anticuerpo conjugado con FITC, para observar en un microscopio de epifluorescencia marca Olympus BX41, se contaron 100 espermatozoides, y se determinó el patrón y porcentaje de distribución de proteínas fosforiladas.

Presencia: Las muestras de espermatozoides marcados con ambos anticuerpos, se analizaron usando un citómetro de flujo (Becton Dickinson, Immunocytometry System, San José, CA, USA). Para el análisis en citometría de flujo, se tomaron alícuotas de 5x10⁶ espermatozoides evaluando 10,000 eventos por muestra.

Se analizaron los histogramas de intensidad de fluorescencia contra el número de células marcadas (Fierro *et al.*, 1996).

VII.7. Compactación del DNA de espermatozoides por azul de anilina

La descompactación del DNA nuclear se cuantificó con la técnica de tinción con el colorante AA (AA acuosa al 5 % P/V, y 5 % ácido acético glacial. pH: 3.5), los núcleos con mayor contenido de lisina fueron los que dieron positivo a esta tinción (Sellami *et*

al., 2013). Para ello, se realizaron frotis con 10 μ L de cada una de las muestras de espermatozoides, tanto del grupo control como del grupo experimental (0.25 mg/Kg de CdCl₂), con cada una de las muestras de cada región del epidídimo y por cada uno de los Ss experimentales. Se dejaron secar a temperatura ambiente por 20 minutos, para posteriormente ser fijados en metanol por 10 minutos. Se lavaron en agua destilada teniendo cuidado de no desprender los espermatozoides.

Nuevamente, se volvieron a secar a temperatura ambiente por 20 minutos posteriormente, se realizó la tinción con AA por 3 minutos. Se lavaron en agua destilada teniendo cuidado de no desprender los espermatozoides, y se secaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Se realizaron las observaciones a 1000 aumentos al microscopio de luz, contabilizando 200 células por cada muestra. Esta técnica permitió distinguir entre espermatozoides con DNA compactado (sin teñir), y espermatozoides con DNA no compactado (con tinción presente en la cabeza del espermatozoide) (Sellami *et al.*, 2013).

VII.8. Integridad del DNA de espermatozoides por naranja de acridina

La integridad del DNA de los espermatozoides fue analizada mediante la tinción de NA. Para ello, se realizó un frotis de cada una de las muestras de espermatozoides, tanto del grupo control como del grupo experimental (0.25 mg/Kg de CdCl₂) en un portaobjetos de vidrio, dejándolo secar al aire durante 20 minutos, fijando después durante toda la noche en solución de Carnoy recién preparada (ácido acético glacial: metanol (1:3) a temperatura ambiente). Luego el portaobjetos se dejó secar al aire y se hizo una tinción con solución de NA durante 5 minutos en cámara oscura. El portaobjetos se enjuago suavemente en una corriente de agua destilada, cubriendo con un cubreobjetos. Los espermatozoides se analizaron con un microscopio de epifluorescencia dentro de la primera hora posterior a la tinción. Las cabezas de los espermatozoides con DNA normal (bicatenario) se presentaron con fluorescencia verde, mientras que los que presentaron DNA desnaturalizado (monocatenario) mostraron fluorescencia naranja, amarilla o roja.

VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos del análisis de las concentraciones de Cd en sangre y en las tres regiones del epidídimo; así como las concentraciones de T en suero, además de los parámetros en los análisis de la determinación espermática, y los cambios bioquímicos en la distribución de carbohidratos, la fosforilación de los residuos de tirosina de proteínas y la compactación e integridad del DNA fueron reportados como los valores de la media \pm desviación estándar.

Se les realizaron pruebas de normalidad de D'Agostino & Pearson ómnibus, y con base a estas se decidió realizar una "t" de Student para grupos no pareados, o una Chi cuadrada para el caso de datos mostrados como porcentajes, considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$. Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico PRISMA.

IX. RESULTADOS

IX.1. Cuantificación de cadmio en sangre y epidídimo

Se observó que los Ss con administración de Cd, presentan una concentración de este metal en la circulación sanguínea significativamente mayor ($p < 0.05$), al compararse con los Ss control (Tabla 3).

Así mismo, mediante la cuantificación por espectrofotometría de absorción atómica, se determinó que la concentración de Cd que se bioacumula en las regiones de la cabeza, el cuerpo y la cola del epidídimo, en los Ss experimentales fue significativamente mayor ($p < 0.05$), en comparación a los Ss control. En la cola del epidídimo de los Ss tratados con este metal, fue donde se observó mayor cantidad de Cd (tabla 3).

Tabla 3. Cuantificación de Cd en sangre y en cabeza, cuerpo y cola del epidídimo.

Tejido		Control	Cd 0.25 mg/Kg
Sangre (μg de Cd/mL de sangre)		$1.08 \pm 0.79 \times 10^{-3}$	$107.5 \pm 26.8 \times 10^{-3*}$
Epidídimo (μg de Cd/g de tejido)	Cabeza	$4.64 \pm 1.87 \times 10^{-3}$	$735.0 \pm 362.5 \times 10^{-3*}$
	Cuerpo	$5.76 \pm 3.46 \times 10^{-3}$	$755.8 \pm 137.5 \times 10^{-3*}$
	Cola	$4.55 \pm 2.06 \times 10^{-3}$	$1045 \pm 288.7 \times 10^{-3*}$

Media \pm DS, n= 6 animales por grupo, t de Student * $p < 0.05$ al comparar con el grupo control.

IX.2. Cuantificación de testosterona en suero

En la cuantificación de T, se observó que la concentración de este esteroide disminuyó de manera significativa ($p < 0.05$), en los animales tratados con Cd, al compararse con las concentraciones en suero de los Ss del grupo control (Tabla 4).

Tabla 4. Cuantificación de T total en suero sanguíneo.

Control	Cd 0.25 mg/Kg
2.63±1.02 ng/mL	0.74±0.32 ng/mL*

Media ± DS, n= 6 animales por grupo, t de Student * $p < 0.05$ al comparar con el grupo control.

IX.3. Concentración y vitalidad espermática

A través del conteo de espermatozoides recuperados de las tres regiones del epidídimo, fue posible observar que hay una disminución significativa ($p < 0.05$) en la concentración de espermatozoides por mL, en cada una de las tres regiones del epidídimo para el caso de los Ss con administración de CdCl₂, al hacer una comparación con los Ss control (Tabla 5), dentro de estos datos se destaca la baja concentración de espermatozoides, con un valor de $48.3 \pm 12.4 \times 10^6$, que se encontraron en la región de la cola de los Ss con administración de Cd (tabla 5).

Respecto a la evaluación de la vitalidad espermática (espermatozoides vivos y muertos), tras la realización de una tinción con eosina-nigrosina para diferenciar entre ambas condiciones, y haber llevado a cabo el conteo de 100 espermatozoides por cada región del epidídimo. Se observó que los porcentajes de espermatozoides vivos en cada una de las tres regiones de estudio, disminuían significativamente ($p < 0.05$) en las muestras analizadas de los machos con administración de 0.25 mg/Kg de CdCl₂, al comparar con los porcentajes de espermatozoides vivos de los Ss control, con su región respectiva y correspondiente (tabla 5).

Tabla 5. Concentración de espermatozoides en millones/mL y porcentaje de vitalidad.

Región del epidídimo		Control	Cd 0.25 mg/Kg
Concentración	Cabeza	68.5±3.5	48.1±12.2*
	Cuerpo	62.6±3.8	40.6±11.2*
	Cola	74.2±3.1	48.3±12.4*
Vitalidad	Cabeza	96.0±0.9	89.0±2.8*
	Cuerpo	96.7±1.2	89.0±1.8*
	Cola	96.7±1.4	89.2±2.8*

Media ± DS, n= 6 animales por grupo, t de Student para la concentración de espermatozoides y Chi cuadrada para el porcentaje de vitalidad espermática *p<0.05 al comparar con el grupo control.

IX.4. Evaluación de la distribución y presencia de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa en membrana de espermatozoides

Se presentan micrografías representativas de los patrones de fluorescencia que se observaron en los espermatozoides, tras los diferentes análisis de distribución.

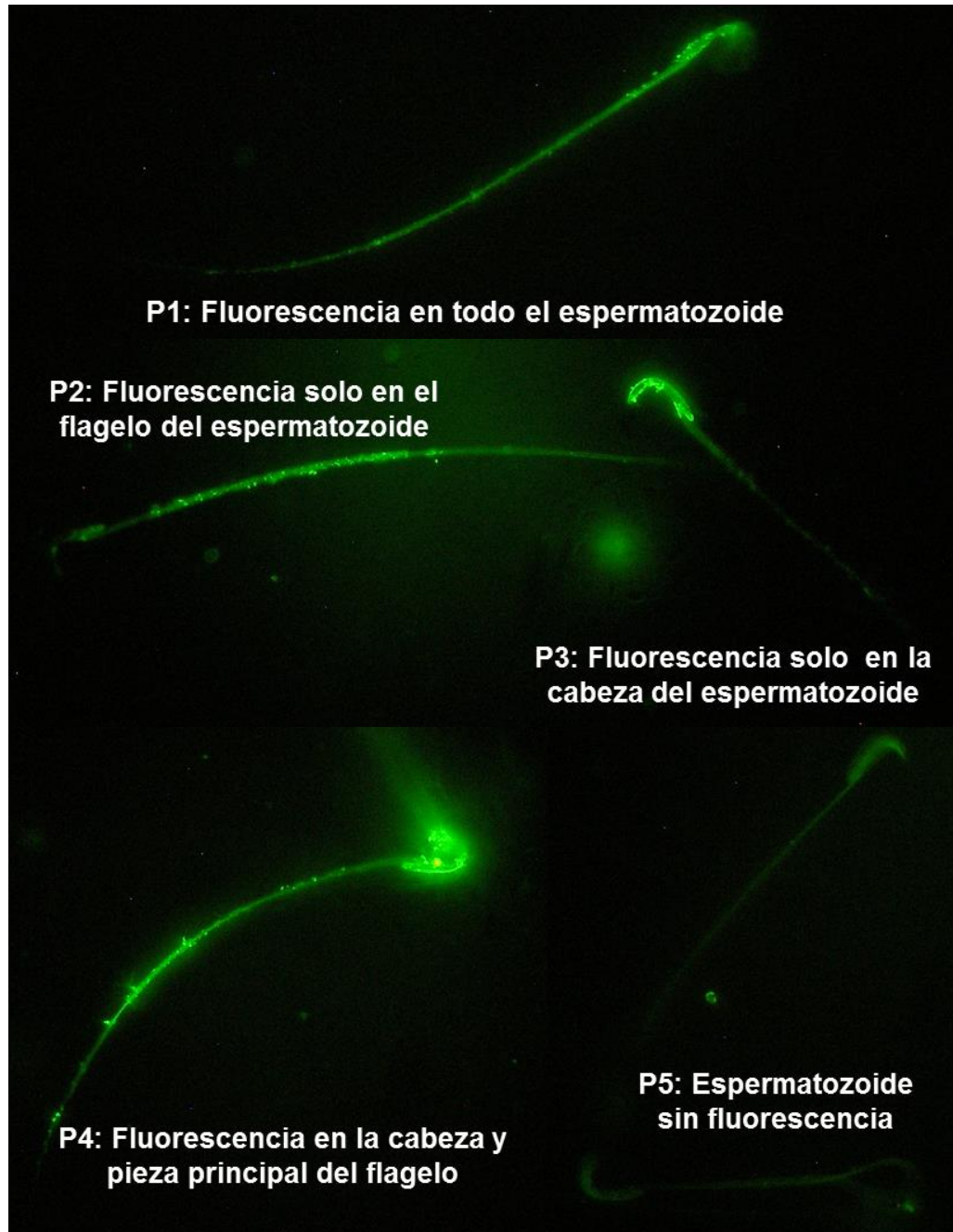


Figura 6. Micrografías de espermatozoides con los patrones identificados de fluorescencia. Patrón 1 (P1), patrón 2 (P2), patrón 3 (P3), patrón 4 (P4) y patrón 5 (P5), 100X.

- Unión de *Triticum vulgare* aglutinina (WGA) a residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico:

En la tabla 6 se encuentran los porcentajes correspondientes a cada uno de los patrones de distribución de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, identificados en los espermatozoides de la cabeza, el cuerpo y la cola del epidídimo. En ambos grupos: control salina y Cd 0.25 mg/Kg, los patrones P1 (fluorescencia en todo el espermatozoide), P2 (fluorescencia en el flagelo del espermatozoide) y P4 (fluorescencia en la cabeza y pieza principal del flagelo del espermatozoide), no tuvieron diferencias significativas al ser comparados entre sí, con su respectiva región, debido a que tienen un porcentaje muy similar entre cada una de ellas. P3 (fluorescencia en la cabeza del espermatozoide), fue el patrón predominante que se observó en todas las regiones del epidídimo de ambos grupos, sin embargo, al comparar a cada una de las regiones de estudio, de cada uno de los grupos, se observó que en el caso de los espermatozoides de la cabeza y la cola de los Ss con administración de Cd, el porcentaje fue significativamente menor, con respecto a la misma región del grupo control. En el caso del patrón de distribución P5 (espermatozoides sin fluorescencia), en las regiones de la cabeza, cuerpo y cola de Ss administrados con Cd, el aumento del porcentaje fue notorio con respecto al grupo control, no obstante, fue solo en la región de la cabeza y de la cola, donde el valor que se obtuvo fue significativo con relación a la región correspondiente de los Ss control, es decir, que fue mayor el número de espermatozoides que no fluorescieron al realizar este análisis en los Ss tratados con Cd.

Así mismo, la figura 7 está integrada por el panel de las gráficas A) a la C), en las cuales están representados el promedio y desviación estándar del índice de fluorescencia de ambos carbohidratos, calculado a partir de la intensidad media de la fluorescencia por el porcentaje de células positivas, en los espermatozoides de cada una de las regiones de estudio de ambos grupos.

Se observó que el índice de fluorescencia en la región de la cabeza (A), fue mayor en el grupo control al compararlo con el grupo experimental, aunque esta diferencia no fue lo suficientemente significativa. En la región del cuerpo (B), hubo un incremento en el valor del índice de ambos grupos, lo que puede corresponder a que sea en esta región donde se localice la mayor unión de ambos carbohidratos, no obstante, en el grupo Cd 0.25 mg/Kg el valor del índice si fue significativamente diferente al grupo control, por lo cual se señala esta diferencia. En la región de la cola del epidídimo (C), los índices de fluorescencia de ambos grupos disminuyeron, aunque es importante mencionar que al igual que en las otras dos regiones anteriores, el valor del grupo control no dejo de ser mayor; en contraste con el grupo Cd 0.25 mg/Kg, y tras realizar el análisis estadístico, se encontró que había una diferencia significativa entre ambos grupos.

Tabla 6. Porcentajes de distribución de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en espermatozoides obtenidos de diferentes regiones del epidídimo.

Patrón	Control			Cd 0.25 mg/Kg		
	Cabeza	Cuerpo	Cola	Cabeza	Cuerpo	Cola
P1	10.3±3.1	9.8±2.3	10.6±2.6	10.2±1.9	11.7±1.6	11.3±1.9
P2	8.2±0.9	7.8±1.7	8.2±1.7	8±1.4	8.5±1.5	8.3±1.8
P3	69.3±2.2	68±2.4	66.3±2.8	63.8±2.5*	63±2.6	59.8±2.8*
P4	3.3±1.2	1.8±1.5	1.7±1.6	2±1.3	1.7±1.6	1.5±1.6
P5	8.8±2.3	12.5±2.1	13.2±1.7	16±2.6*	15.2±2.8	19±3.7*

Media±DS, n= 6 animales por grupo, Chi cuadrada *p<0.05 con respecto al grupo control.

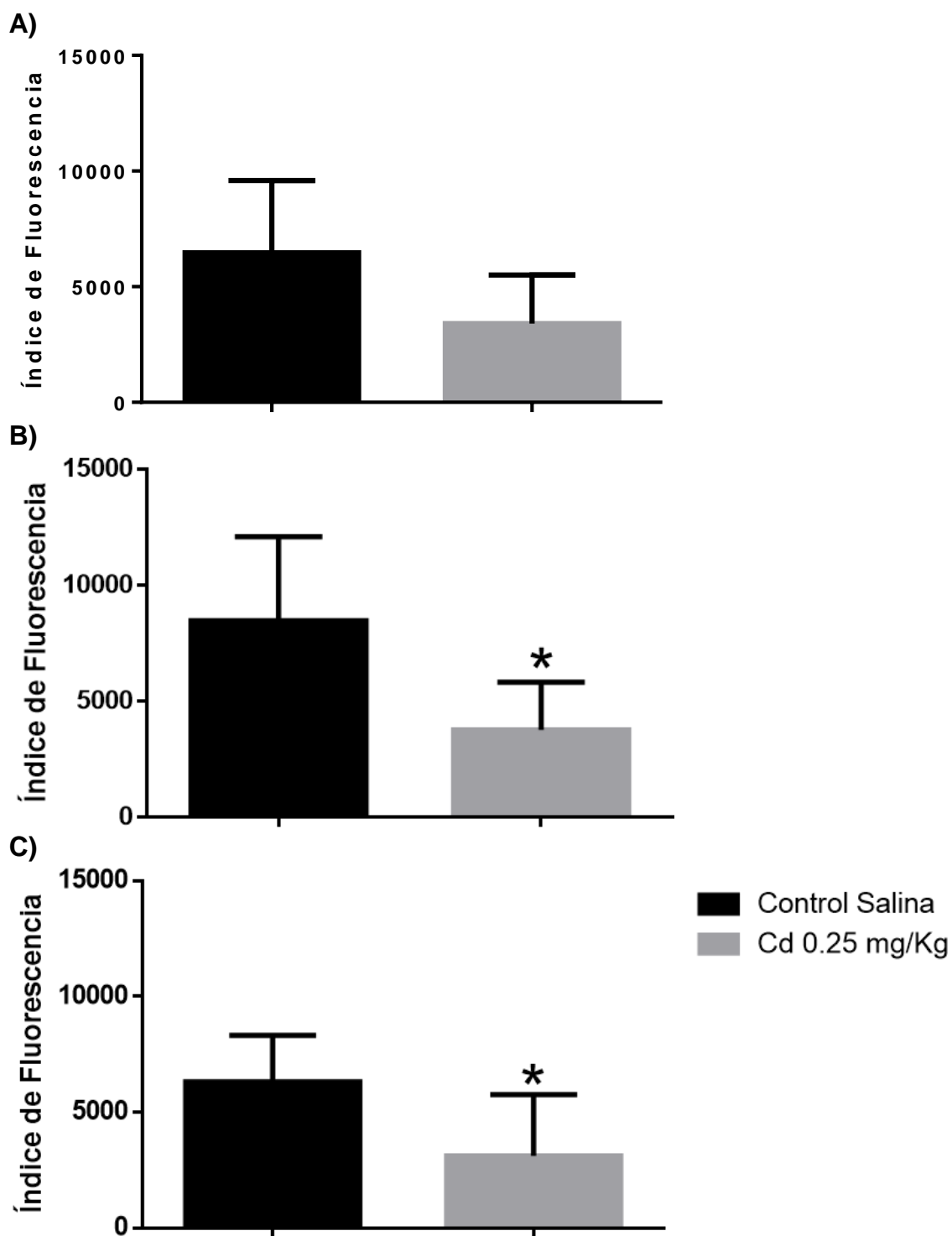


Figura 7. Se presenta en este panel el índice de fluorescencia ($X \pm DS$) de la unión de WGA a N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, en espermatozoides de cabeza (A), cuerpo (B) y cola (C), de Ss control salina y Cd 0.25 mg/Kg, n= 6 animales por grupo, t de Student * $p < 0.05$ al comparar con el grupo control.

- Unión de *Canavalia ensiformis* aglutinina (Con A) a residuos de manosa:

Los porcentajes obtenidos de cada uno de los patrones de distribución en los espermatozoides de cada una de las regiones del epidídimo correspondiente al carbohidrato manosa, se muestran en la tabla 7.

Con respecto al P1, los valores que se obtuvieron en las tres regiones del grupo control, fueron mayores a los del grupo Cd 0.25 mg/Kg, sin embargo, tras el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas entre cada una de las regiones. Para el caso del P2 y P4, los porcentajes de distribución de manosa en los espermatozoides fueron bajos en cada una de las regiones de estudio, y al realizar una comparación entre el grupo control y el grupo de administración de Cd, no se obtuvieron diferencias significativas en ninguno de los resultados. El P3 fue el predominante en ambos grupos (control salina y Cd 0.25 mg/Kg), con los porcentajes más altos en cada una de las tres regiones del epidídimo, a pesar de esto, tras realizar el análisis y comparación de cada una de las regiones entre los grupos de estudio, se determinó que tanto en la cabeza, el cuerpo y la cola del grupo con administración de Cd, existen diferencias significativas con las mismas regiones correspondientes al grupo control, como está señalado. Con respecto al P5, en el grupo Cd 0.25 mg/Kg, se observó que fue el segundo patrón predominante en los espermatozoides de las tres regiones del epidídimo estudiadas, además de que al realizar un análisis comparativo con las mismas regiones del grupo control salina, se tienen diferencias significativas en cada una de ellas.

La figura 8 se compone por el panel de gráficas: A) a la C), en las que presentan el promedio y desviación estándar del índice de fluorescencia de manosa, calculado a partir de la intensidad media de la fluorescencia por el porcentaje de células positivas, en los espermatozoides de la cabeza, el cuerpo y la cola del epidídimo. Manosa es un carbohidrato que fue detectado con la lectina Con A conjugada con FITC, en los espermatozoides de ambos grupos (control salina y Cd 0.25 mg/Kg). De manera general, se observó que el índice de fluorescencia incremento de la región de la cabeza

(A) al cuerpo (B), y a su vez hubo un cambio en la región de la cola (C) del epidídimo, como ocurrió en lo observado en N-acetilglucosamina y/o ácido siálico. Sin embargo, de forma particular el índice de fluorescencia de los espermatozoides de la cabeza en el grupo Cd 0.25 mg/Kg, tuvo una diferencia significativa con respecto al mismo índice en el grupo control, esta misma diferencia se observó en el índice de los espermatozoides de la región del cuerpo de Ss tratados con Cd, pues el valor no dejó de ser menor y significativo con respecto al índice del grupo control salina. En la región de la cola el índice del grupo con Cd incrementó un poco, y en el grupo control disminuyó, sin dejar de ser mayor, al analizar ambos grupos no se encontraron diferencias significativas.

Tabla 7. Porcentajes de distribución de manosa en espermatozoides obtenidos de diferentes regiones del epidídimo.

Patrón	Control			Cd 0.25 mg/Kg		
	Cabeza	Cuerpo	Cola	Cabeza	Cuerpo	Cola
P1	21.5±6	19.2±4.6	18.8±3.3	15.2±5.4	17.2±3.4	14.5±5.0
P2	8±3.7	10.2±3.4	9.1±3.1	8.2±1.9	9.2±3.1	9±1.7
P3	51.8±2.6	52±2.4	49.7±2.1	38.8±3.1*	41.6±2.4*	37.5±2.2*
P4	4.5±2.9	4.3±2.3	4.7±2.5	4.3±2.4	4.7±2.5	4.2±2.1
P5	14.2±2.9	14.3±1.9	17.7±1.6	33.5±3.8*	27.3±4.3*	34.8±3.9*

Media±DS, n= 6 animales por grupo, Chi cuadrada *p<0.05 con respecto al grupo control.

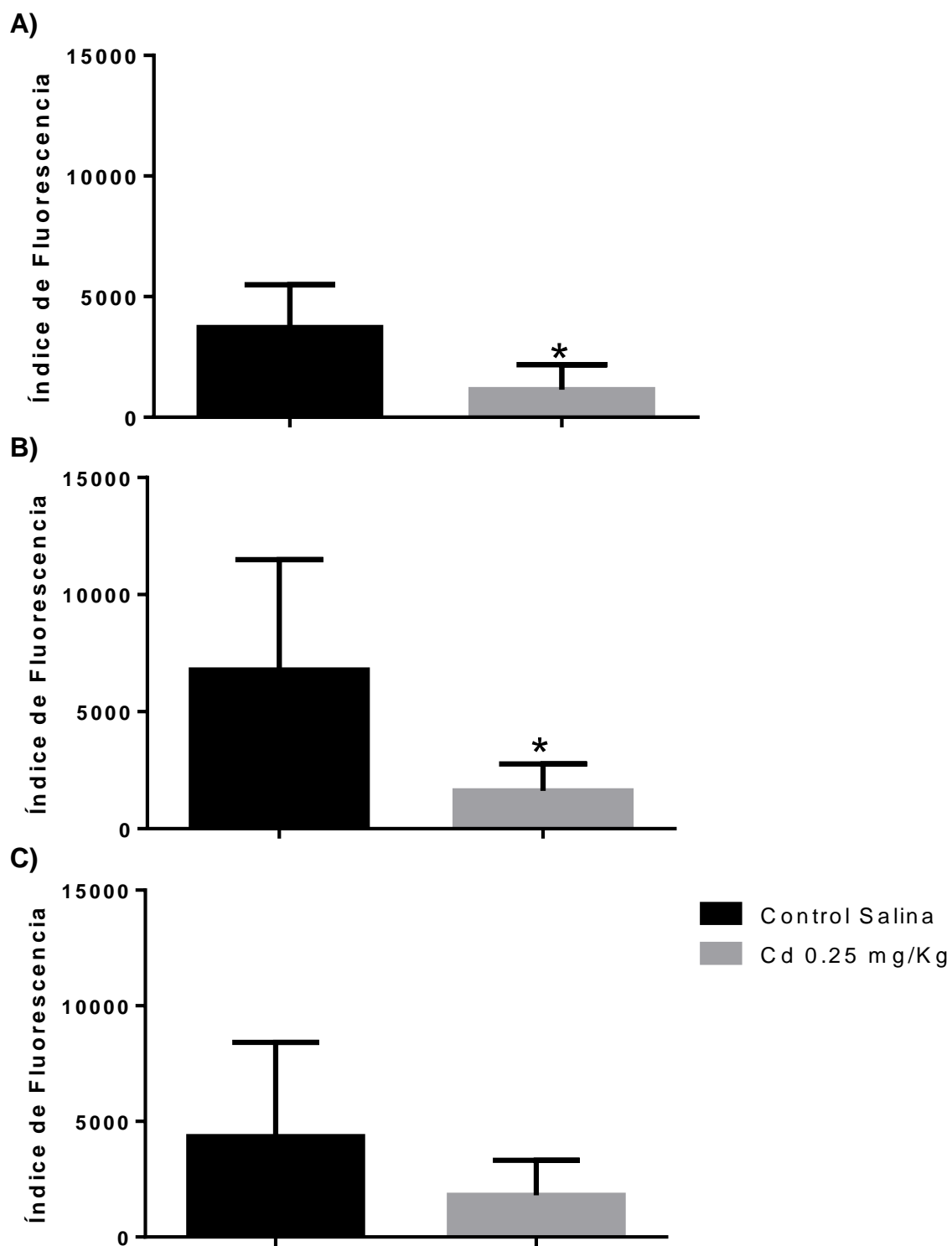


Figura 8. Representación del índice de fluorescencia ($X \pm DS$), que se obtuvo por la unión de Con A con manosa, en espermatozoides de cabeza (A), cuerpo (B) y cola (C), de Ss control salina y Cd 0.25 mg/Kg, $n = 6$ animales por grupo, t de Student $*p < 0.05$ al comparar con el grupo control.

- Unión de *Ulex europaeus* aglutinina (UEA) a residuos de fucosa:

La tabla 8 muestra los porcentajes de cada uno de los patrones de fluorescencia en los espermatozoides de las tres regiones del epidídimo, incubados con la lectina UEA conjugada con FITC. De forma general, ninguno de los cuatro primeros patrones (P1 al P4), descritos en el panel 1, tuvo algún valor, es decir, la mayoría de ellos están en cero en las tres regiones estudiadas del epidídimo, tanto en los espermatozoides del grupo control como en los espermatozoides del grupo con administración de Cd, únicamente el porcentaje de P2 y P3 de los espermatozoides del cabeza de Ss control presentó un valor distinto de cero, sin embargo, al comparar los valores correspondientes a los mismos patrones en la cabeza del grupo Cd 0.25 mg/kg, no se encontraron diferencias estadísticas. P5 es superior en porcentaje a todos los demás patrones incluidos en la tabla 8, siendo en la mayoría de las regiones de ambos grupos, el patrón que únicamente pudo ser descrito en los espermatozoides. De todas formas, se realizó un estudio de análisis comparativo y correspondiente al porcentaje de espermatozoides de cada una de las regiones estudiadas, sin lograr encontrar diferencias estadísticas en ninguna de ellas, es decir, que fucosa no es carbohidrato que se pueda detectar por este método, y por consecuencia, los espermatozoides no tuvieron una fluorescencia visible.

La identificación de la presencia del carbohidrato fucosa en espermatozoides de las tres regiones del epidídimo, se realizó tras la incubación y unión con la lectina UEA conjugada con FITC, y está representada como el índice de fluorescencia, en el panel de gráficas A) a la C) de la figura 9. En los espermatozoides de la cabeza (A), se observó que en el grupo Cd 0.25 mg/Kg el índice que se obtuvo correspondía a un valor de cero, mientras que en los espermatozoides de la misma región del grupo control salina, el valor del índice fue mayor a cero, no obstante, tras un estudio comparativo, no se encontraron diferencias significativas. En los espermatozoides del cuerpo (B) epididimario del grupo administrado con Cd, hubo un ligero incremento en el índice, con respecto a los espermatozoides de la cabeza, mientras que el índice de

fluorescencia de los espermatozoides del grupo control disminuyo ampliamente con respecto al índice obtenido en la cabeza, y al comparar los valores de los índices de fluorescencia de ambos grupos, no se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$). El índice de fluorescencia de los espermatozoides de la cola, aumento en el grupo con administración de Cd, y continuó disminuyendo en el caso de los espermatozoides de los Ss control, de manera que, al hacer el análisis estadístico, fue posible encontrar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos grupos. De forma general, la presencia de fucosa en espermatozoides de Ss con Cd, fue inversa a la vista en el grupo control.

Tabla 8. Porcentajes de distribución de fucosa en espermatozoides obtenidos de diferentes regiones del epidídimo.

Patrón	Control			Cd 0.25 mg/Kg		
	Cabeza	Cuerpo	Cola	Cabeza	Cuerpo	Cola
P1	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
P2	0.5±0.8	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
P3	0.2±0.4	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
P4	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
P5	99.3±0.8	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0

Media±DS, n= 6 animales por grupo, Chi cuadrada * $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

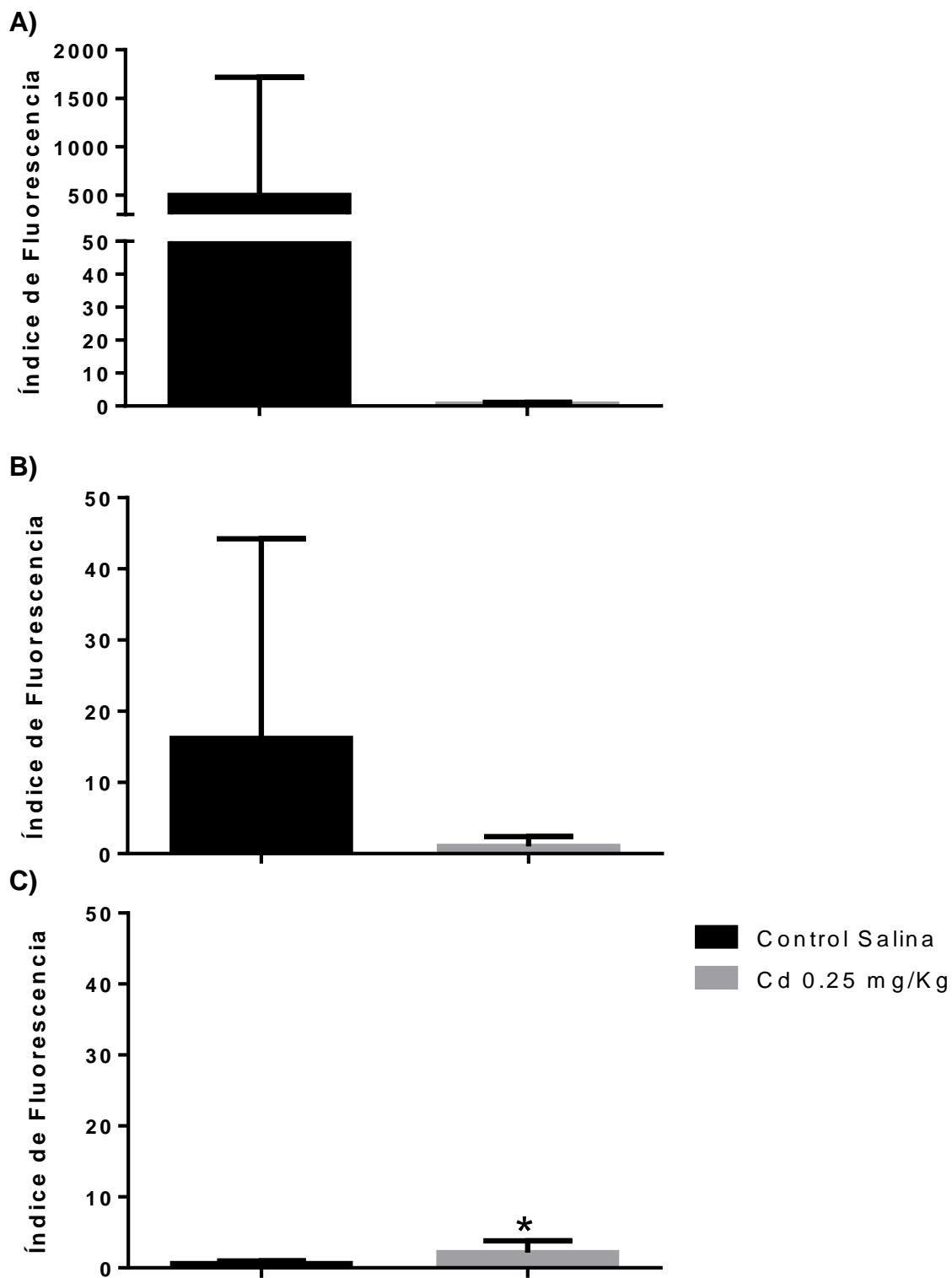


Figura 9. En este panel se presenta a las gráficas con el índice de fluorescencia (X±DS), de la unión de UEA a fucosa en espermatozoides de cabeza (A), cuerpo (B) y cola (C), de Ss control salina y Cd 0.25 mg/Kg, n= 6 animales por grupo, t de Student *p<0.05 al comparar con el grupo control.

IX.5. Fosforilación en residuos de tirosina de proteínas de los espermatozoides

La tabla 9 contiene los diversos porcentajes de distribución de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, en espermatozoides de la cabeza, el cuerpo y la cola del epidídimo de los dos grupos experimentales: control salina y Cd 0.25 mg/Kg, tras la incubación con el anticuerpo monoclonal Py20, anti-fosfoproteína tirosina conjugado con FITC.

Con respecto al P1, los espermatozoides de la cabeza del grupo con administración del metal, mostraron un menor porcentaje con respecto a los espermatozoides de la misma región de grupo de Ss control, y tras realizar un análisis estadístico, se encontró que estas diferencias eran significativas ($p < 0.05$), este mismo patrón en la región del cuerpo y de la cola tuvo valores diferentes entre ambos grupos, sin embargo, no fueron estadísticamente significativos. P2 tuvo un valor mayor en los espermatozoides de la cabeza de Ss con Cd al compararlos con los de Ss control, en el cuerpo, el porcentaje del P2 obtenido en espermatozoides de Ss con exposición a Cd fue menor con respecto al grupo control, no obstante, estas diferencias en ambas regiones no tuvieron diferencias significativas, fue únicamente en la cola del epidídimo donde los porcentaje de ambos grupos fueron estadísticamente diferentes y significativos, siendo el valor del grupo Cd 0.25 mg/kg mayor al obtenido en el grupo control salina. P3 pese a presentar valores diferentes entre cada una de las mismas regiones de los dos grupos, el análisis estadístico que se realizó, no arrojó diferencias significativas en ninguna de ellas, para el caso del P4, únicamente el porcentaje del cuerpo en el grupo de Cd 0.25 mg/Kg tuvo una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a la misma región del grupo control salina, pues tanto en los porcentajes de espermatozoides de la cabeza como de la cola de ambos grupos, los valores no fueron estadísticamente diferentes. De manera general, los espermatozoides que presentaron el P5, fueron los que tuvieron los mayores porcentajes en las tres regiones estudiadas del epidídimo, en los dos grupos (control salina y Cd 0.25 mg/Kg), no obstante, fue en espermatozoides de la cola del grupo con Cd cuyo porcentaje fue menor y significativo a la misma región del grupo control.

En la figura 10, el panel de las gráficas A) a la C), representa el índice de fluorescencia calculado en cada región del epidídimo, tras el análisis por citometría de flujo. En los espermatozoides de Ss administrados con 0.25 mg/Kg de CdCl₂, se visualiza que el promedio de proteínas que se fosforilan, incrementa progresivamente de la cabeza al cuerpo y cola del epidídimo, mientras que en el grupo control, se observó un aumento en el promedio de proteínas fosforiladas en los espermatozoides de la región del cuerpo, con respecto a los de la región de la cabeza y cola del epidídimo, no obstante no fue posible encontrar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos grupos.

Tabla 9. Porcentajes de distribución de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina en espermatozoides obtenidos de las tres regiones del epidídimo.

Patrón	Control			Cd 0.25 mg/Kg		
	Cabeza	Cuerpo	Cola	Cabeza	Cuerpo	Cola
P1	13 \pm 2.4	9.2 \pm 1.2	9.7 \pm 1.4	7.7 \pm 2.4*	10.3 \pm 1.9	8.3 \pm 2.7
P2	15.3 \pm 1.4	27.3 \pm 2	26 \pm 2.4	17.5 \pm 3.4	22.7 \pm 3.2	34.8 \pm 3.9*
P3	21.7 \pm 2.1	20.5 \pm 1.9	18 \pm 2.4	26 \pm 3.7	22.7 \pm 1.6	21.8 \pm 2.9
P4	11.2 \pm 3.4	7.3 \pm 0.8	10.3 \pm 2	12.3 \pm 3.6	12.3 \pm 3.6*	9 \pm 2
P5	38.8 \pm 2	35.7 \pm 1.8	36 \pm 2.6	36.5 \pm 1.9	32 \pm 2.8	26 \pm 2.9*

Media \pm DS, n= 6 animales por grupo, Chi cuadrada * $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

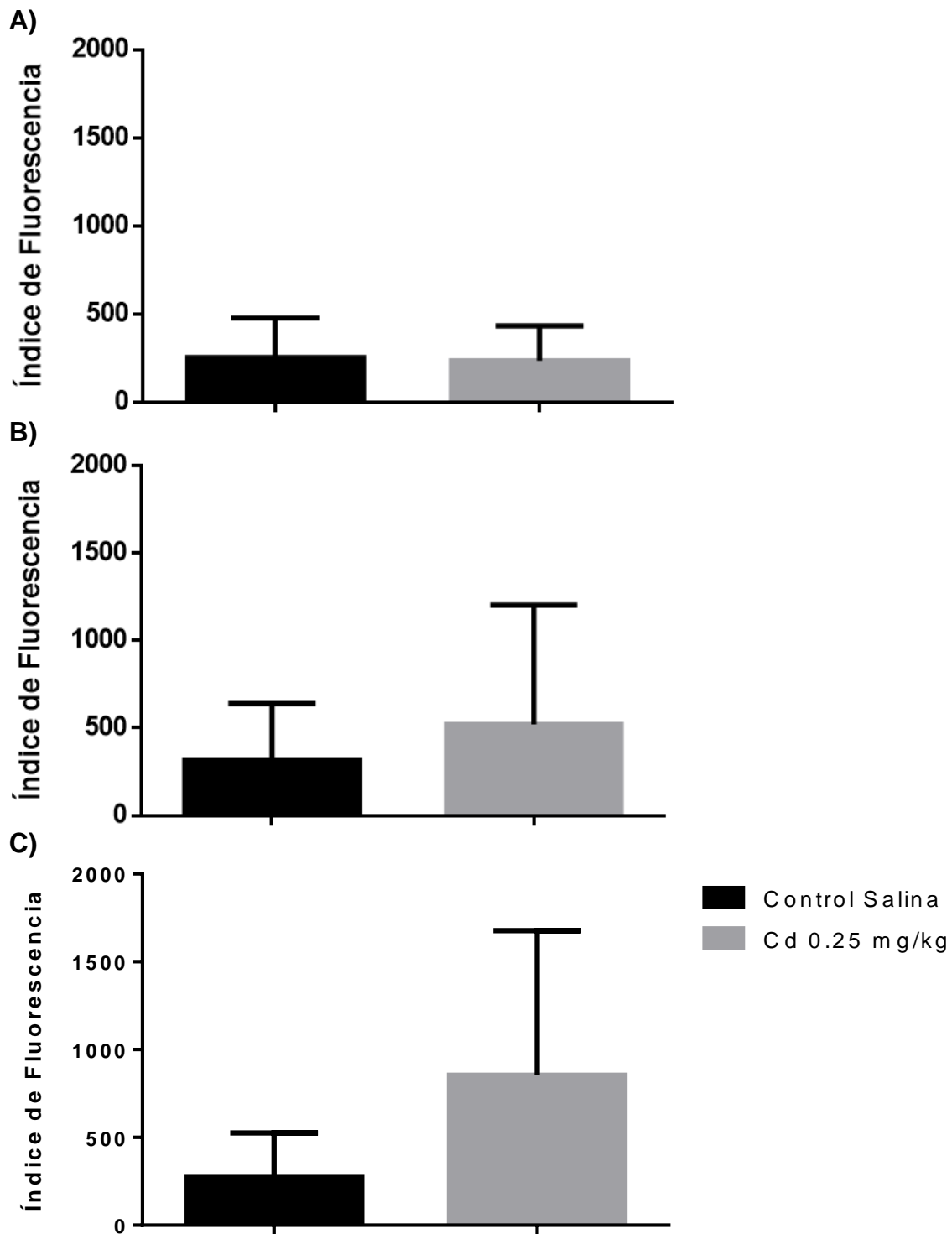


Figura 10: Se muestran los resultados del índice de fluorescencia ($X \pm DS$), de la unión del anticuerpo Py20 a proteínas fosforiladas en residuos de tirosina en espermatozoides. En este panel se muestran las gráficas correspondientes a la cabeza (A), cuerpo (B) y cola (C) del epidídimo, de Ss control salina y Cd 0.25 mg/Kg, $n=6$ animales por grupo, t de Student $*p < 0.05$ al comparar con el grupo control.

IX.6. Compactación del DNA de espermatozoides con azul de anilina

En la tabla 10 se muestra el porcentaje de espermatozoides con DNA nuclear compactado, evaluado mediante microscopio de campo claro, el cual se obtuvo del conteo aleatorio de 200 espermatozoides por cada región del epidídimo, con la tinción de AA, pues permite deducir si hubo un adecuado intercambio de histonas por protaminas durante la espermatogénesis, así como el mantenimiento de estas nucleoproteínas en los espermatozoides que se ubican en el epidídimo, debido a que este colorante es positivo a moléculas con lisina, como en el caso de las histonas, se pudo diferenciar entre espermatozoides con DNA bien compactado y espermatozoides con DNA sin correcta compactación. Los resultados señalan que los espermatozoides de las tres regiones del epidídimo de los machos control tienen un mayor porcentaje de núcleo espermático compactado, cuya diferencia estadística es significativamente mayor ($p < 0.05$) a los espermatozoides de cada región correspondiente del epidídimo en los machos con administración de Cd.

Tabla 10. Porcentaje de espermatozoides de las tres regiones del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola), en los que se detectó tenían DNA compactado.

Región del epidídimo	Control	Cd 0.25 mg/Kg
Cabeza	95.3 \pm 1.97%	88.5 \pm 2.07%*
Cuerpo	96.0 \pm 2.00%	87.0 \pm 2.53%*
Cola	97.3 \pm 1.21%	86.5 \pm 2.66%*

Media \pm DS, n= 6 animales por grupo, Chi cuadrada * $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

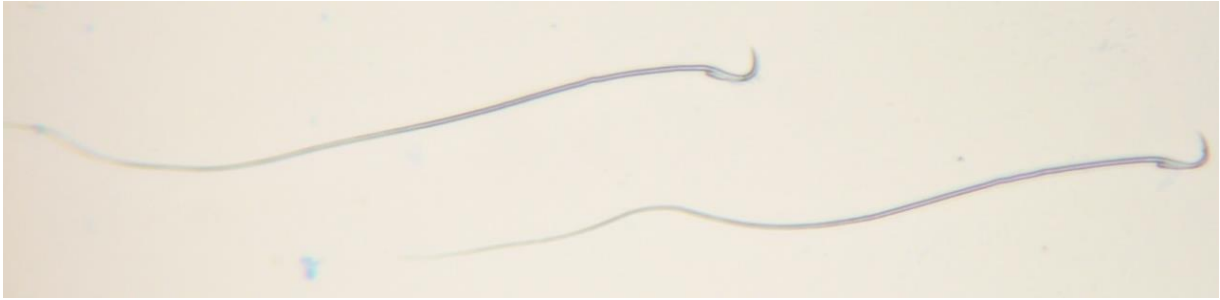


Figura 11. Micrografía que representa la compactación del DNA en espermatozoides con la tinción de AA. Cuando el DNA en el núcleo de la cabeza del espermatozoide no tiene una coloración azul, es posible decir que ha ocurrido un adecuado intercambio de histonas por protaminas, y que a su vez estás se han mantenido a lo largo del tránsito por el epidídimo, 100X.

IX.7. Integridad del DNA de espermatozoides con naranja de acridina

Los resultados del conteo de espermatozoides mediante microscopia de epifluorescencia, para revisar el estado de integridad del DNA nuclear de los espermatozoides se muestran en la tabla 11. A través de la tinción con NA, se diferenció entre espermatozoides con DNA íntegro (fluorescencia verde) y espermatozoides con DNA dañado (fluorescencia naranja-rojiza).

De manera general, los porcentajes de DNA íntegro en los espermatozoides de las tres regiones de estudio del epidídimo de los Ss del grupo Cd 0.25 mg/Kg, presentaron una diferencia significativa ($p < 0.05$) con los porcentajes correspondientes al DNA íntegro de los espermatozoides de cada una de las mismas regiones (cabeza, cuerpo y cola), en los Ss del grupo control. Es importante mencionar que, aunque no se encontraron diferencias significativas, al analizar entre sí a los valores de las tres regiones de estudio de los mismos Ss, los porcentajes de integridad en espermatozoides de Ss expuestos a Cd fueron disminuyendo de la región de la cabeza al cuerpo y la cola, respectivamente, siendo en esta última, la región en la cual se obtuvo el promedio más bajo. Con respecto al grupo control, los espermatozoides tuvieron porcentajes de integridad, que fueron incrementando gradualmente de la región de la cabeza, al cuerpo y la cola, a pesar de que no se encontraron diferencias significativas, es importante mencionar que fue en la región caudal en donde se tuvo el mayor porcentaje de espermatozoides con DNA íntegro.

Tabla 11. Porcentaje de espermatozoides de las tres regiones del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola), que mostraron tener DNA integro.

Región del epidídimo	Control	Cd 0.25 mg/Kg
Cabeza	95.0±3.10%	83.7±3.14%*
Cuerpo	95.2±2.64%	83.2±2.32%*
Cola	96.3±2.16%	82.3±2.80%*

Media±DS, n= 6 animales por grupo, Chi cuadrada *p<0.05 con respecto al grupo control.

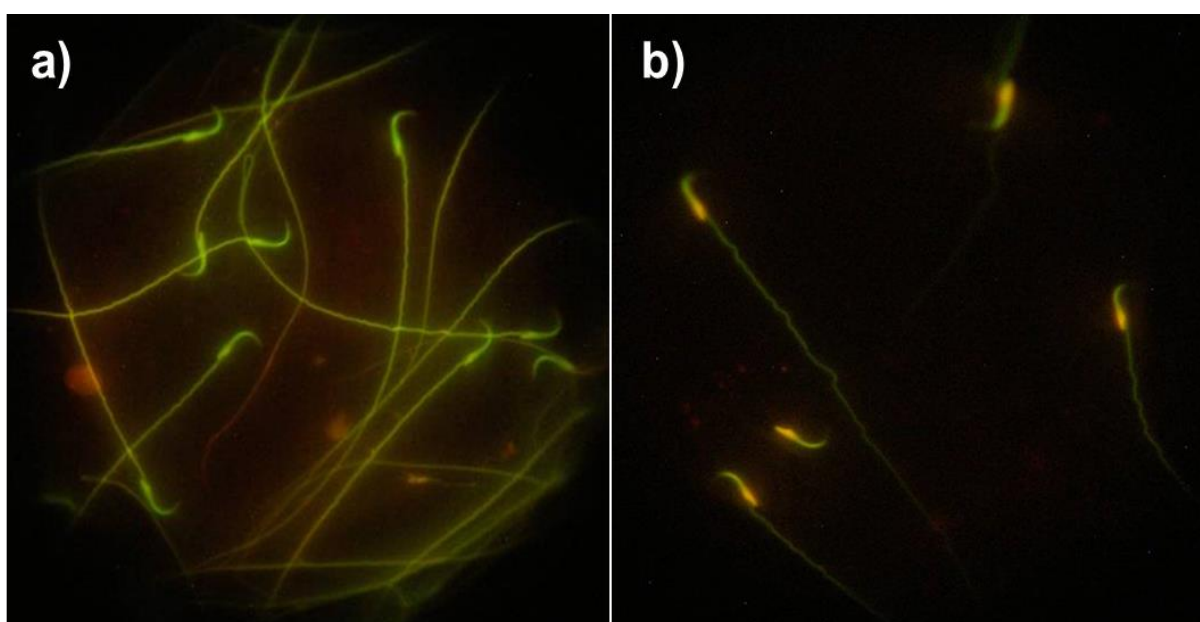


Figura 12. Micrografías que representan la a) integridad y b) fragmentación del DNA en espermatozoides con la tinción de NA. Obsérvese un mayor daño en la integridad del DNA de espermatozoides de los Ss tratados con Cd 0.25 mg/Kg (b) al compararlos con los espermatozoides de Ss control (a). 40X.

Los resultados sobre el efecto del Cd en los diferentes parámetros analizados, descritos anteriormente, se sintetizan en la tabla 12, en la que se señala: la concentración de T, bioacumulación de Cd. Así como, la determinación espermática y los cambios bioquímicos analizados a través de los siguientes indicadores de maduración espermática epididimaria: modificaciones en la distribución y presencia de los carbohidratos de la membrana plasmática, además de la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas y el mantenimiento de la compactación e integridad del DNA espermático.

Tabla 12. Efectos del Cd sobre los indicadores de maduración espermática.

	Grupos					
	Control			Cd 0.25mg/Kg		
Concentración de T en suero	↑			↓		
Concentración de Cd en sangre	↓			↑		
	Regiones del epidídimo					
	Cabeza	Cuerpo	Cola	Cabeza	Cuerpo	Cola
Concentración de Cd en epidídimo	↓	↓	↓	↑	↑	↑
Determinación espermática						
Concentración	↑	↑	↑	↓	↓	↓
Vitalidad	↑	↑	↑	↓	↓	↓
Cambios bioquímicos						
Distribución de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
Presencia de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico	↑↓	↑	↑	↑↓	↓	↓
Distribución de manosa	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
Presencia de manosa	↑	↑	↑↓	↓	↓	↑↓
Distribución de fucosa	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
Presencia de fucosa	↑↓	↑↓	↓	↑↓	↑↓	↑
Distribución de proteínas fosforiladas	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
Presencia de proteínas fosforiladas	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
Compactación de DNA	↑	↑	↑	↓	↓	↓
Integridad de DNA	↑	↑	↑	↓	↓	↓

Las flechas dentro de la tabla representan: ↑ Para valores significativamente mayores, ↓ para valores significativamente menores, ↑↓ para valores que no tuvieron diferencias significativas entre los grupos.

X. DISCUSIÓN

El Cd es un metal pesado no esencial en la fisiología del organismo, sin embargo, por su similitud con moléculas como el calcio y el zinc, interfiere con los procesos fisiológicos de regulación en el metabolismo (Staessen *et al.*, 1991; Yang y Shu, 2015) de estos elementos, la intoxicación por Cd se relaciona con graves daños a nivel celular de órganos vitales como el hígado, el riñón, los huesos y el cerebro, e incluso está clasificado como cancerígeno por el Programa Nacional de Toxicología (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) (ATSDR, 2008). La exposición postnatal al Cd tiene graves consecuencias en el desarrollo sexual del macho, los animales expuestos a este metal antes de la pubertad presentan una reducción del desarrollo de los testículos y de la concentración de T, así como una disminución en la motivación y ejecución sexual, en comparación a los individuos sanos (Arteaga-Silva *et al.*, 2015). Los efectos tóxicos de este metal dependen de la vía de acceso, cantidad y tiempo de exposición (agudo o crónico) (ATSDR, 2008; Andujar, Bensefa-Colas y Descatha, 2010). Una vez dentro del organismo, el Cd se elimina lentamente por la orina, pues se une estrechamente a las metalotioneínas, las cuales son casi completamente reabsorbidas en los túbulos renales, y el Cd al no tener alguna participación en efectos benéficos dentro del cuerpo, se acumula alcanzando una vida media de 20 a 40 años dentro del organismo (ATSDR, 2008; Ronchetti *et al.*, 2013).

En el presente estudio se cuantificó la presencia y bioacumulación de Cd en sangre y en las tres regiones del epidídimo de sujetos control y con administración de Cd. Observándose que el Cd está presente en una alta concentración en sangre y en cada una de las tres regiones del epidídimo de los sujetos experimentales. Nuestros datos coinciden con los reportados por Lacorte *et al.* (2013), quienes cuantificaron la concentración de Cd en sangre y en epidídimo, y observaron una mayor acumulación en los machos expuestos a este metal. Confirmándose que el Cd al entrar al organismo difícilmente puede ser eliminado, acumulándose en varios órganos como el epidídimo. Se ha reportado, que el Cd tiene un efecto negativo en la regulación y mantenimiento de la barrera hemato-epididimaria (Dubé y Cyr, 2013), lo que ocasiona cambios en la

histología del epidídimo, incluyendo una reducción del epitelio, necrosis de las células epiteliales, vasoconstricción y edema intersticial junto con la infiltración de células mononucleares. Lo que resulta en una alteración en el proceso de maduración espermática que se asocia con infertilidad (Adamkovicova *et al.*, 2014). Aunado a este efecto, también se sabe que el Cd, en otros órganos como el pulmón, hígado, riñón, hueso y el sistema nervioso, provocando estrés oxidativo, proliferación y apoptosis a nivel celular (Lafuente, 2013; Matović *et al.*, 2015).

Por otra parte, ha sido bien descrito que la producción continua y eficiente de gametos masculinos depende de la proliferación de espermatogonias y posteriormente su diferenciación a espermatozoides anatómicamente completos (Hess y Renato de Franca, 2008), para lo cual es necesario que el eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-testículo funcione coordinadamente, sin embargo la intoxicación por Cd causa una marcada disminución de la concentración sérica de T, alterando la regulación del eje HHG (Lafuente, 2013). En este trabajo hemos encontrado que la administración de Cd durante las etapas postnatales de la rata, disminuye significativamente la concentración de T en la edad adulta. Yari *et al.*, 2016, reportan que la administración de Cd disminuye significativamente la concentración de T en ratas macho tratadas con este metal, al compararlos con los machos control y *sham* (Alkhedaide *et al.*, 2016). Esta disminución la atribuyen a que el Cd afecta la actividad de enzimas esteroideogénicas, como también ha sido descrito en el ratón por Ji *et al.* (2010), en donde se señala que los efectos del Cd sobre la concentración de T están ligados a la disminución de la actividad de las enzimas esteroideogénicas testiculares 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD), además de causar la muerte de las células de Leydig encargadas de la biosíntesis de T (Ji *et al.*, 2010).

Además se han reportado otras alteraciones fisiológicas causadas por el Cd, como alteraciones en la concentración, vitalidad y movilidad de los espermatozoides. En humanos, por ejemplo se ha encontrado que la concentración de Cd en la sangre de pacientes con infertilidad es inversamente proporcional a la concentración de

espermatozoides en el eyaculado (Benoff *et al.*, 2009). Asadi *et al.* (2013), evaluaron la concentración y vitalidad espermática, tras la administración de Cd en ratas, y observaron que el Cd disminuye significativamente el número de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo, así como el porcentaje de espermatozoides vivos. Estos resultados coinciden con los datos reportados en este trabajo de investigación, de igual manera es posible señalar que no solo en la región de la cola hay una reducción en el número de espermatozoides, pues en la cabeza y el cuerpo del epidídimo, también se presentó una disminución en el número de espermatozoides, así como una disminución en el porcentaje de espermatozoides vivos, después del tratamiento con Cd.

De tal forma que la concentración de Cd en el semen podría contribuir a la infertilidad masculina mediante la reducción de la calidad espermática, como lo ha sugerido Pant *et al.*, 2003. Se ha planteado que el mecanismo por el cual el Cd puede estar causando esta afección pudiera iniciarse en el tejido testicular, al ocasionar una disrupción de la barrera hemato-testicular y la de otros órganos del aparato reproductor, como la barrera hemato-epididimaria, lo que repercute en una disminución en la concentración, vitalidad y movilidad espermática, principalmente porque el Cd ejerce un efecto deletéreo en el proceso de espermatogénesis y alteraciones en la maduración espermática (Yang y Shu, 2015). Es importante mencionar que se ha encontrado que la acción de antioxidantes, como el azafrán (*Crocus sativus* L.) puede prevenir los efectos tóxicos del Cd en los espermatozoides (Asadi *et al.*, 2013).

Como parte de los cambios bioquímicos importantes que ocurren en los espermatozoides cuando atraviesan el conducto epididimario, durante su maduración, se encuentran los eventos de glicosilación de proteínas en la membrana plasmática del espermatozoide y la fosforilación de algunas proteínas. De la glicosilación depende la capacidad del espermatozoide para atravesar las mucosas cervicales, acercarse al ovocito y fertilizarlo. Mientras que la fosforilación de proteínas del espermatozoide, en particular en los residuos de tirosina, da lugar a la activación de las proteínas ligadas con la movilidad en el flagelo y con la posterior reacción del acrosoma (Moseley *et al.*,

2005; Mor *et al.*, 2007). Estos cambios son fundamentales para la adquisición de la capacidad fertilizante (Tulsiani, 2003; Seligman, Zipser y Kosower, 2004).

Con respecto a los cambios bioquímicos como la glicosilación, en este trabajo, se emplearon lectinas específicas para los carbohidratos: N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa. Todos estos son carbohidratos con funciones importantes en las interacciones del espermatozoide con el epitelio celular del oviducto y en la unión con el ovocito (Ignatz *et al.*, 2001; Tulsiani y Abou-Haila, 2012). De ahí que sea importante determinar los patrones de distribución de éstos. De forma particular, la N-acetilglucosamina es importante para la interacción entre gametos, y se requiere para que se lleve a cabo la reacción acrosomal y la fertilización (Cardona-Maya y Cadavid, 2005; Tulsiani y Abou-Haila, 2012). En el caso del ácido siálico, este incrementa la carga negativa de la superficie del espermatozoide durante el tránsito epididimal, lo que evita la adhesión entre los espermatozoides. Para estos carbohidratos, nosotros observamos un patrón de fluorescencia mayor en la cabeza de los espermatozoides en los Ss control. Lo que concuerda con lo descrito por Hall y Killian (1987), quienes reportan valores más altos de unión de N-acetilglucosamina y ácido siálico. Mientras que en los Ss tratados con Cd el patrón de fluorescencia siempre fue menor, efecto que puede estar mediado por el Cd *per se* o bien por la disminución de T, afectando la funcionalidad de las células epididimarias.

Por otro lado, se ha reportado que la unión de N-acetilglucosamina y del ácido siálico, es mediada por la actividad de las enzimas glicosiltransferasas: N-acetilglucosamiltransferasa y sialiltransferasa, si bien en el caso de la primera enzima no existe del todo un patrón bien diferenciado de su actividad. Tulsiani (2003) señala que de la región distal de la cabeza a la proximal de la cola (regiones cercanas al cuerpo del epidídimo), la actividad de la N-acetilglucosamiltransferasa es más alta en los espermatozoides, lo que concuerda con los resultados de las gráficas de la figura 7, cuyo índice de fluorescencia nos puede de forma indirecta, indicar una mayor presencia de N-acetilglucosamina en la región del cuerpo de ambos grupos. En el caso de la sialiltransferasa, Tulsiani (2003) indica que la actividad de esta enzima es mayor

en las regiones de la cabeza proximal, y disminuye significativamente en la región de la cola distal del epidídimo, es quizás por esta razón que el índice de fluorescencia en nuestros patrones de distribución de la cola del epidídimo disminuyó en ambos grupos con respecto a la región del cuerpo. Conforme avanzan los espermatozoides a través del túbulo epididimario, se ha sugerido que los cambios en la presencia de los carbohidratos N-acetilglucosamina y ácido siálico, están relacionados con la maduración espermática (Hall y Killian, 1987).

En cuanto a la manosa, se sabe que este carbohidrato conforma de manera permanente a la membrana de los espermatozoides, pues le confiere flexibilidad al espermatozoide, característica que es de gran importancia para la movilidad (Aliabadi *et al.*, 2013). En este trabajo de investigación encontramos que en los espermatozoides de Ss tratados con Cd, la distribución y presencia de manosa, muestran diversos cambios con respecto al grupo control, observándose bajos porcentajes para el patrón de fluorescencia P3 (fluorescencia solo en la cabeza), y un mayor valor del patrón P5 (espermatozoides sin fluorescencia). Estas variaciones pueden repercutir, tanto en la maduración de los espermatozoides como en la capacitación y fertilización, pues se ha demostrado que manosa forma parte de la membrana plasmática (Jiménez *et al.*, 2006; Sharma, Ichikawa y Freeze, 2014) y es un carbohidrato relacionado en el proceso de unión del espermatozoide con la zona pelúcida del ovocito en varias especies, incluyendo al ser humano (Jiménez *et al.*, 2006). De tal forma, que el Cd puede estar afectando de esta manera el potencial fertilizante de los espermatozoides.

Con respecto a fucosa, los patrones de distribución: P1 a P4 (tabla 8) de este carbohidrato en la membrana de los espermatozoides de la cabeza, el cuerpo y la cola de ambos grupos, siempre presentaron valores en cero. Así mismo, la fucosa presentó índices de fluorescencia muy bajos (figura 9), en el caso del grupo tratado con Cd, el valor del índice fue de cero en los espermatozoides de la cabeza del epidídimo, y aumento de forma tenue hacia el cuerpo y la cola, en donde hubo una diferencia significativa con el índice de fluorescencia de los espermatozoides control, pues en

ellos el índice de fluorescencia se redujo ampliamente de la región de la cabeza hacia la cola. Estas diferencias puede ser consecuencia de la exposición a Cd, pues este metal afecta al testículo y por tanto la espermatogénesis (Adamkovicova *et al.*, 2014), mediante un proceso en el cual la fucosiltransferasa incorpora fucosa en las glicoproteínas de los espermatoцитos en paquiteno y en las espermatidas redondas (Tulsiani, 2006).

Los resultados de los índices de fluorescencia de nuestro grupo control coinciden con lo publicado por Tulsiani (2003), quien señala que fucosiltransferasa muestra una actividad más alta en los espermatozoides de la cabeza distal y disminuye hacia la región de la cola, lo que fue diferente en el grupo tratado con Cd.

De tal forma, que el efecto que tienen el Cd sobre la presencia de fucosa en los espermatozoides, compromete el potencial fertilizante de los mismos, debido a que este carbohidrato es importante en el reconocimiento y unión especie-específica entre gametos, mediante la unión a proteínas de la zona pelúcida (Tulsiani y Abou-Haila, 2012). Además, de que la presencia de fucosa en el espermatozoide y en el plasma seminal tiene la capacidad de formar una reserva de espermatozoides en el oviducto, cuando se une con las proteínas del epitelio celular (Ignatz *et al.*, 2001), por lo que puede haber un efecto adverso en la fusión de espermatozoide-ovocito cuando la disposición de fucosa es reducida (Tulsiani, 2006).

De modo general, los carbohidratos estudiados en la membrana plasmática de los espermatozoides del grupo de Ss tratados con Cd, se observaron en menor presencia y con diferentes índices de fluorescencia. Sin embargo, la presencia y distribución fue constante, de manera similar a lo reportado por Tulsiani y Abou-Haila (2012). Al analizar la toxicidad que genera el Cd a nivel celular, se puede plantear que es de esta manera como se puede estar afectando la actividad de las enzimas encargadas de los eventos de glicosilación en el fluido del túbulo epididimario, y cuya acción es de gran importancia como lo señala Tulsiani (2003), para el adecuado recambio e

incorporación de azúcares, conforme los espermatozoides experimentan la maduración epididimaria.

Con respecto a los patrones de distribución de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, en ambos grupos los porcentajes de fluorescencia del P2 (fluorescencia en el flagelo del espermatozoide), aumentaron de la cabeza a la cola del epidídimo, en donde hayamos diferencias significativas entre los grupos, y el patrón de distribución P3 (fluorescencia en la cabeza del espermatozoide) disminuyó el porcentaje de la región de la cabeza hacia la región de la cola en ambos grupos. El patrón P5 (espermatozoides sin fluorescencia) tuvo los porcentajes más altos de los dos grupos, y solo en la cola del epidídimo hubo una diferencia significativa, al ser mayor el valor en el porcentaje de los espermatozoides del grupo tratado con Cd. En el trabajo de Lewis y Aitken (2001), revisaron mediante inmunohistoquímica el impacto que tiene la maduración espermática en los patrones de fosforilación de tirosinas en espermatozoides de la cabeza y la cola del epidídimo de la rata Wistar, y se reporta que en la región de la cola, los espermatozoides exhiben con mayor frecuencia un patrón de fosforilación en la región posterior del espermatozoide (correspondiente al flagelo), que puede corresponder con lo descrito en el patrón P2 (fluorescencia solo en el flagelo del espermatozoide), lo que coincide con los resultados de los porcentajes de fluorescencia en ambos grupos de este trabajo de investigación. De igual forma en la publicación de Lewis y Aitken (2001), se determinó que en los espermatozoides de la cabeza del epidídimo la fosforilación de proteínas en la cabeza de los espermatozoides es mayor con respecto a la fosforilación en proteínas de la cabeza de los espermatozoides de la región de la cola, dato similar a lo obtenido y descrito en el patrón P3. Para el caso de los resultados mostrados por la técnica de citometría de flujo, para buscar diferencias de intensidad por fluorescencia, utilizando un anticuerpo (Py20) específico contra proteínas fosforiladas en residuos de tirosina en espermatozoides de ambos grupos, encontramos que los porcentajes de presencia (presencia) del grupo tratado con Cd aumentan de la cabeza al cuerpo y a la cola del epidídimo, mientras que en el grupo control, el mayor porcentaje de fosforilación estuvo

en la región del cuerpo, con respecto a las otras regiones. De acuerdo al estudio de Wang *et al.* (2016), quienes también observaron la toxicidad causada por Cd en espermatozoides de la cola del epidídimo de ratón, es mayor el porcentaje de proteínas fosforiladas en sujetos con administración de Cd al compararse con el grupo control. Sin embargo, este incremento no indica un evento favorable que pudiera beneficiar a la movilidad espermática, pues los parámetros de movilidad estaban inhibidos. Efecto que puede deberse a que el Cd está modificando la actividad de tirosincinasas o a los sitios de unión de las proteínas sustrato, siendo esta una explicación a los estudios que señalan que tanto en animales como en seres humanos con exposición a Cd se presentan alteraciones en la movilidad espermática (Da Costa *et al.*, 2016). Dado que la fosforilación de tirosinas, es uno de los cambios intracelulares importantes en el espermatozoide durante la maduración, y es la base molecular esencial para el desarrollo coordinado del movimiento progresivo, la capacitación (hiperactivación) y reacción acrosomal del espermatozoide en el oviducto de la hembra, este evento puede ser la causa principal de la infertilidad en el macho. Por otra parte se ha descrito que las fallas en la movilidad espermática por efecto del Cd pueden deberse a un desgaste energético y a una disminución del ATP/AMP, pues el estado de fosforilación está regulado por una vía dependiente de Adenosinmonofosfato cíclico (AMPC), y por la actividad de proteínas cinasas y fosfatasas.

Con respecto al porcentaje de compactación del DNA espermático, en las tres regiones del epidídimo de los Ss tratados con Cd, presentaron valores significativamente menores al compararse con el grupo control. En el trabajo de Cooper y Yeung (2006), se describe de forma general, que la compactación del DNA de los espermatozoides, cuando transitan de la región de la cabeza a la cola del epidídimo, debe incrementar, esto ocurre porque la cromatina se condensa por medio de la oxidación de los grupos sulfhidrilo de las protaminas. Sin embargo, en los espermatozoides del grupo tratado con Cd, esta descripción no se cumplió, debido a que el porcentaje de compactación del DNA en los espermatozoides de la cola es menor con respecto al porcentaje de compactación en la cabeza del epidídimo. Este hecho sólo lo observamos en nuestro

grupo control. La obtención de un menor porcentaje de espermatozoides con DNA compactado en el grupo de sujetos expuestos a Cd, se puede comparar con el estudio *in vitro* de Méndez, Báez y Villamediana, 2011, en donde evaluaron el estado de condensación del DNA en espermatozoides humanos expuestos a 2 y 4 ppm de CdCl₂, y reportan que fue menor la compactación del DNA con respecto a su grupo control, aunque no significativo. Probablemente esto se debe a que eran espermatozoides que se evaluaron tras el proceso de licuefacción del plasma seminal, en los cuales puede ocurrir una rápida descondensación de la cromatina.

En el caso de la integridad del DNA, en este estudio, los espermatozoides de la cabeza, el cuerpo y la cola del epidídimo de los sujetos con administración de Cd, tuvieron porcentajes de integridad de DNA más bajos y estadísticamente significativos, con respecto a los valores equivalentes a las mismas regiones de los sujetos control, este hecho es derivado de la exposición a Cd, pues se ha descrito que causa efectos negativos en la cromatina de los espermatozoides. Observándose un incremento de la fragmentación del DNA, una reacción acrosomal prematura y una disminución de la movilidad (Oliveira *et al.*, 2009). En nuestra investigación, los datos reportados para el grupo tratado con Cd puede relacionarse con los publicados por Sepaniak *et al.* (2006). Quienes observaron que en hombres había una similitud entre la concentración de Cd en plasma seminal y un incremento significativo en la fragmentación del DNA espermático de individuos fumadores al compararlos con no fumadores, esto es importante de señalar, pues la pérdida de la integridad del DNA en los espermatozoides, es la anomalía más frecuente que conlleva al extravío de información genética en los gametos masculinos, y contribuye a los problemas de fertilidad (Wdowiak *et al.*, 2015); los resultados de este estudio, tienen similitud con los ya reportados por Oliveira y su grupo de trabajo en 2009 en ratón, pues publicaron que la administración y presencia de Cd afecta a la integridad del DNA de los espermatozoides, debido a que desestabiliza la estructura de la cromatina espermática, además de que sugieren que tal efecto se produce, tras haber ocurrido en intercambio de histonas por protaminas.

En los resultados de integridad del DNA espermático, de los Ss del grupo con exposición al metal, no se observó la característica descrita por el trabajo de Cooper y Yeung (2006), en donde mencionan que el porcentaje de espermatozoides con DNA integro, aumenta de la región de la cabeza a la cola del epidídimo, cuando lo revisaron con la tinción de NA, descripción que sí ocurrió en los espermatozoides del grupo control en esta investigación.

Adicionalmente, a los objetivos planteados en este estudio se analizó el índice de fertilidad para cuatro ratas macho expuestas a Cd, para ello se ocuparon ratas hembras en estro natural; las cuales fueron colocadas con los machos para su apareamiento. Al término de la cópula se verificó el tapón vaginal en las hembras según lo propuesto por Lucío *et al.* (2009). Posteriormente se monitorearon las hembras hasta su posible fecha de alumbramiento. De estas hembras ninguna quedó gestante, lo que indica que los machos no tienen la capacidad fertilizante; es decir que el Cd interfirió con su fertilidad.

Con base a los resultados obtenidos y descritos en este estudio, surge la posibilidad de proponer un modelo (figura 13) que trata de explicar el efecto del Cd sobre la maduración epididimaria. El Cd una vez que entra en el torrente sanguíneo (1), se une principalmente a la albumina para su transportación o incluso puede ser transportado por metalotioneínas (2) (proteínas secuestradoras de Cd "Cd-MT") y posteriormente ser absorbido en diferentes órganos como el riñón, el hígado, etc. (Yang y Shu, 2015). De manera similar podría estar llegando el Cd al epidídimo, al llegar a este órgano puede entrar a través de transportadores específicos como el transportador de cationes orgánicos, el transportador 8 regulado por zinc/hierro, el transportador de metales divalentes 1 y por los canales de Ca^{+2} (3), e incluso se ha propuesto que es por las propias metalotioneínas (Belyaeva *et al.*, 2001; Yang y Shu, 2015).

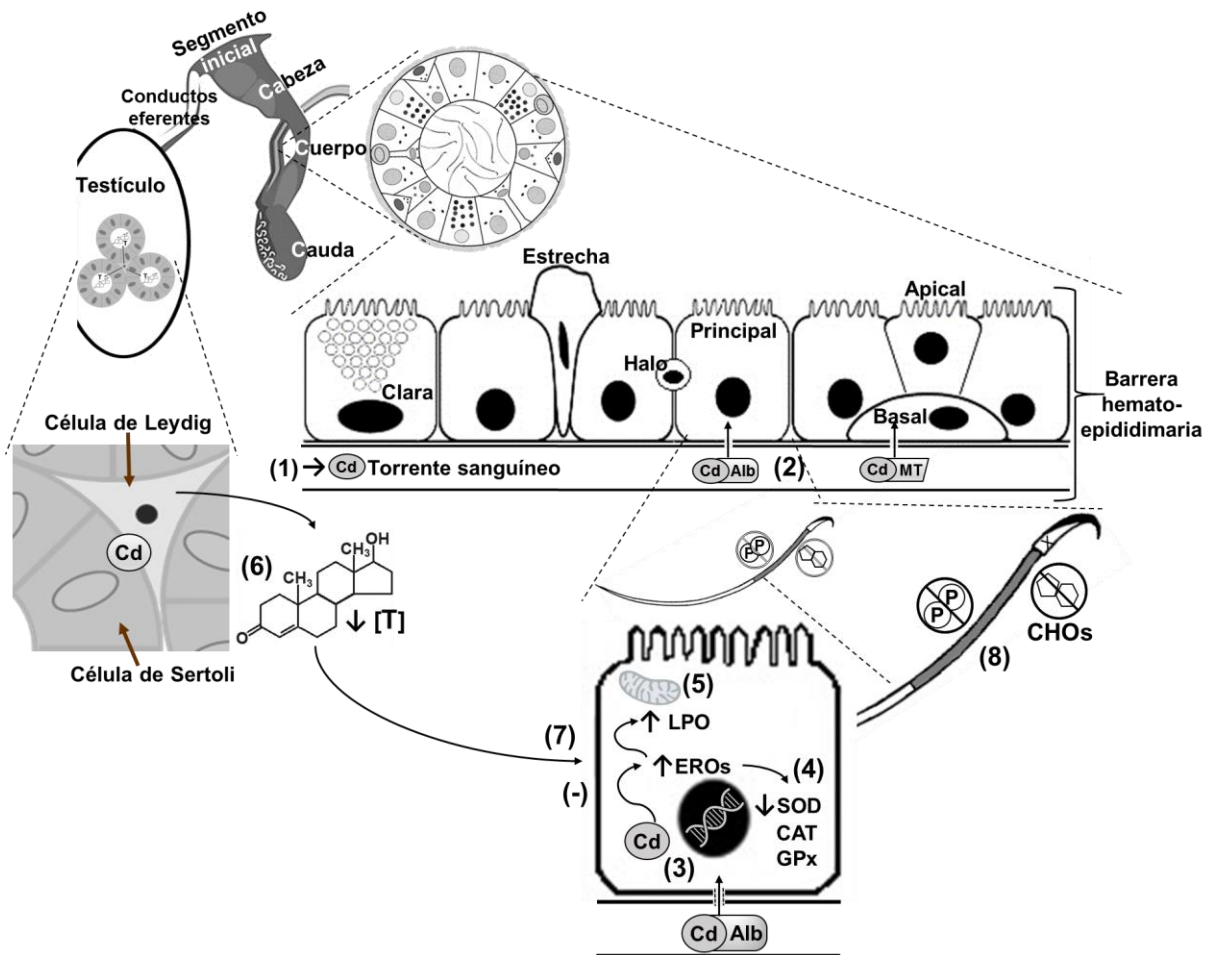


Fig. 13. Modelo esquemático donde se busca explicar el efecto del Cd sobre la maduración espermática epididimaria de la rata macho Wistar. Cd-Alb (unión de Cd a albumina); Cd-MT (unión de Cd a metalotioneína); LPO (lipoperoxidación); SOD (superóxidodismutasa); CAT (catalasa); GPx (glutación peroxidasa), P (fosforilación de proteínas en residuos de tirosina), CHOs (carbohidratos que participan en la glicosilación de la membrana plasmática). Adaptado de: Avenel, Shur y Hess, 2011.

Así, el Cd podría llegar al epidídimo y bioacumularse en las células epididimarias, provocando la generación de EROs, principalmente por una reducción en la actividad de enzimas implicadas en las defensas antioxidantes como la SOD, CAT y GPx (4) (Bertin y Averbeck, 2006). Además de generar LPO, provocando una interrupción de membranas celulares y mitocondriales, induciendo a la apoptosis (5). Por otra parte, los radicales libres inducidos por el Cd producen daño al DNA (Bertin y Averbeck, 2006), observado como la descompactación y fragmentación de esta molécula. Aunado a estos eventos, el Cd provoca una disminución de T (6) al reducir la actividad de las enzimas esteroideogénicas 3 β -HSD y 17 β -HSD (Ji *et al.*, 2010). Induciendo una

disminución en la función de las células epididimarias (7); las cuales son andrógeno dependientes (Robaire y Hamzeh, 2011). De tal forma, que estos eventos podrían estar influyendo: a) en la función de las células epididimarias, b) interrumpir la distribución de carbohidratos (N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa), 3) en la fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas de los espermatozoides, y por otro lado, 4) impactar en la compactación e integridad del DNA de los espermatozoides (8). Estos efectos, podrían repercutir directamente en una disminución en la concentración, movilidad y vitalidad espermática, lo que propiciará una disminución en la capacidad fertilizante y por tanto en el éxito reproductor por parte del macho.

XI. CONCLUSIÓN

Al bioacumularse el Cd en las tres regiones del epidídimo, se vieron afectados los indicadores de la maduración espermática epididimaria. De tal forma, que la fertilidad en el macho puede verse afectada por este metal pesado y así contribuir con la infertilidad de etiología desconocida y ser la causa de la disminución en la concepción de la pareja.

XII. BIBLIOGRAFÍA

Adamkovicova, M., Toman, R., Cabaj, M., Massanyi, P., Martiniakova, M., Omelka, R., Krajcovicova, V. y Duranova, H. 2014. Effects of subchronic exposure to cadmium and diazinon on testis and epididymis in rats. *The Scientific World Journal*, 2014(2014): 1-9.

Adamkovicova, M., Toman, R., Martiniakova, M., Omelka, R., Babosova, R., Krajcovicova, V., Grosskopf, B. y Massanyi, P. 2016. Sperm motility and morphology changes in rats exposed to cadmium and diazinon. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14(42): 1-7.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2004. Health and Human Services. US Department of Health and Human Services. Public Health Service; Atlanta, GA. Interaction profile for arsenic, cadmium, chromium and lead.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2008. Toxicological Profile for Cadmium. Draft for public comment. Toxic Division of Toxicology and Human Health Sciences, Environmental Toxicology Branch. Atlanta, GA. 487 pp.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2012. Toxicological profile for cadmium. Division of Toxicology and Human Health Sciences, Environmental Toxicology Branch, Atlanta, GA. 487 pp.

Akinloye, O., Arowojolu, A.O., Shittu, O.B. y Anetor, J.I. 2006. Cadmium toxicity: a possible cause of male infertility in Nigeria. *Reproductive Biology*, 6(1): 17-30.

Aliabadi, E., Karimi, F., y Talaei-Khozani, T. 2013. Effects of L-Carnitine and Pentoxifylline on Carbohydrate Distribution of Mouse Testicular Sperm Membrane. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 38(2): 107-115.

Alkhedaide, A., Alshehri, Z.S., Sabry, A., Abdel-Ghaffar, T., Soliman, M.M. y Attia, H. 2016. Protective effect of grape seed extract against cadmium-induced testicular dysfunction. *Molecular Medicine Reports*, 13(4): 3101-3109.

Amann, R.P., Hammerstedt, R.H. y Veeramachaneni, D.N. 1993. The epididymis and sperm maturation: a perspective. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(4): 361-381.

Andujar, P., Bensefa-Colas, L. y Descatha, A. 2010. Intoxication aiguë et chronique au cadmium. *La Revue de médecine interne*, 31(2): 107-115.

Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, M. y Skinner, M.K. 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male infertility. *Science*, 308(5727): 1466-1469.

Arenas-Ríos, E., León-Galván, M.A. y Rosado-García, A. 2012. Espermatogénesis, maduración y almacenamiento epididimario de espermatozoides en mamíferos. Avances en la Biología de la Reproducción, Compiladora Retana-Márquez, S., editorial UAM-SEP.

Arrotéia, K.F., Vianna-Garcia, P., Ferreira-Barbieri, M., Lopes-Justino, M. y Violin-Pereira, L.A. 2012. The epididymis: embryology, structure, function and its role in fertilization and infertility. En: Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics, Prof. Luis Violin Pereira, Eds. InTech, pp: 41-66.

Arteaga-Silva, M., Mendoza-Mendoza, T.N., Hernández-Rodríguez, J., Viguera-Villaseñor, R.M., Montes-López, S., Limón-Morales, O., Bonilla-Jaime, H. y Vázquez Palacios, G. 2015. La exposición postnatal al cadmio disminuye los niveles de testosterona y provoca un déficit de la motivación y ejecución sexual en ratas macho adultas. En Sanz-Martin, A., Olvera-Cortés, M.E., Hernández González, M. & Guevara Pérez, M.A. (Eds.), Neurodesarrollo de la cognición y la conducta. 69-104 pp. Zapopan, Jalisco, México: Universidad de Guadalajara.

Asadi, M.H., Zafari, F., Sarveazad, A., Abbasi, M., Safa, M., Koruji, M., Yari, A. y Alizadeh-Miran, R. 2013. Saffron improves epididymal sperm parameters in rats exposed to cadmium. Nephro-urology monthly, 4(6): 1-6.

Ashraf, M.W. 2012. Levels of heavy metals in popular cigarette brands and exposure to these metals via smoking. The Scientific World Journal, 2012(2012): 1-5.

Avenel, J., Shur, B.D. y Hess, R.A. 2011. Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. Biology of Reproduction. 84(2): 207-217.

Belleannée, C., Labas, V., Teixeira-Gomes, A.P., Gattic, J.L., Dacheuxa, J.L. y Dacheux, F. 2011. Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. Journal of proteomics, 74: 59-78.

Belmonte, S.A., Romano, P.S. y Sosa, M.A. 2002. Mannose-6-phosphate receptors as a molecular indicator of maturation of epididymal sperm. Archives of Andrology, 48(1): 53-63.

Belyaeva, E.A., Glazunov, V.V., Nikitina, E.R. y Korotkov, S.M. 2001. Bivalent metal ions modulate Cd²⁺ effects on isolated rat liver mitochondria. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 33(4): 303-318.

Benoff, S., Hauser, R., Marmar, J.L., Hurley, I.R., Napolitano, B. y Centola, G.M. 2009. Cadmium concentrations in blood and seminal plasma: correlations with sperm number and motility in three male populations (infertility patients, artificial insemination donors, and unselected volunteers). Molecular Medicine, 15(7-8):248-262.

- Benoff, S., Jacob, A. y Hurley, I. 2000. Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Human Reproduction Update*, 6(2): 107-121.
- Bertin, G. y Averbeck, D. 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, 88(11): 1549-1559.
- Björndahl, L., Söderlund, I. y Kvist, U. 2003. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human Reproduction*, 18(4): 813-816.
- Blanco, A., Moyano, R., Vivo, J., Flores-Acuña, R., Molina, A., Blanco, C., Agüera, E. y Monterde, J. G. 2007. Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23(1): 96-101.
- Byrne, C., Divekar, S.D., Storchan, G.B., Parodi, D.A. y Martin, M.B. 2009. Cadmium — A metallo hormone? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3): 266–271.
- Cano, P., Poliandri, A.H., Jiménez, V., Cardinali, D.P. y Esquifino, A.I., 2007. Cadmium induced changes in Per 1 and Per 2 gene expression in rat hypothalamus and anterior pituitary: effect of melatonin. *Toxicology Letters*, 172(3): 131-136.
- Cardona-Maya, W.D. y Cadavid A.P. 2005. Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N-acetilglucosamina. *Actas Urológicas Españolas*, 29(7): 676-684.
- Castillo-Villanueva, A. y Abdullaev, F. 2005. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Revista de Investigación Clínica*, 57(1): 55-64.
- Chandra, A., Srinivasan, K.R., Jamal, F., Mehrotra, P.K., Singh, R.L. y Srivastav, A. 2008. Post-translational modifications in glycosylation status during epididymal passage and significance in fertility of a 33 kDa glycoprotein (MEF3) of rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Reproduction*. 135(6): 761-770.
- Ciarrocca, M., Capozzella, A., Tomei, F., Tomei, G. y Caciari, T. 2013. Exposure to cadmium in male urban and rural workers and effects on FSH, LH and testosterone. *Chemosphere*, 90(7): 2077-2084.
- Cichy, B., Jaroszek, H. y Pasezek, A. 2014. Cadmium in phosphate fertilizers; ecological and economical aspects, *CHEMIK*, 68(10): 837-842.
- Cooper, T.G. 2005. Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Human Reproduction*, 20(1): 09-11.

Cooper, T.G. 2011. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 13(1): 130-138.

Cooper, T.G. y Yeung, C.H. 2006. Sperm maturation in the human epididymis. En De Jonge, C.J. y Barratt, C.L.R (Eds), *The sperm cell*. 72-107 pp. Cambridge University Press, N.Y.

Cui, X., Jing, X., Wu, X. y Yan, M. 2016. Protective effect of resveratrol on spermatozoa function in male infertility induced by excess weight and obesity. *Molecular Medicine Reports*, 14(5): 4659-4665.

Da Costa, R., Botana, D., Piñero, S., Proverbio, F. y Marín, R. 2016. Cadmium inhibits motility, activities of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase and axonemal dynein-ATPase of human spermatozoa. *Andrologia*, 48(4): 464-469.

Dacheux, J.L. y Dacheux, F. 2014. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*, 147(2): 27-42.

Dacheux, J.L., Belleannée, C., Jones, R., Labas, V., Belghazi, M., Guyonnet, B., Druart, X., Gatti, J.L. y Dacheux, F. 2009. Mammalian epididymal proteome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 306 (1-2): 45-50.

Dacheux, J.L., Castella, S., Gatti, J.L. y Dacheux, F. 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*, 63(2): 319-341.

Damm, O.S. y Cooper, T.G. 2010. Maturation of sperm volume regulation in the rat epididymis. *Asian Journal of Andrology*, 12(4): 578-590.

De Maistre, E., Bene, M.C., foliguet, B., Touati, F. y Faure, G.C., 1996. Centrifugation on Percoll gradient enhances fluorescent lectin binding on human sperm: a flow cytometric analysis. *Archives of Andrology*, 37(3): 179-187.

Delfino, M.R., Sarno, M.C., Martínez, C.E. y Rinaldi, D.S. 2003. Cadmio en hojas de tabaco. *Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, 1-3.

Dubé, E. y Cyr, D.G. 2013. The blood-epididymis barrier and human male fertility. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 763(2013): 218-236.

Esquifino, A.I., Márquez, N., Alvarez-Demanuel, E. y Lafuente, A. 1999. Effects of chronic alternating cadmium exposure on the episodic secretion of prolactin in male rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 12(4): 205- 210.

Esquifino, A.I., Seara, R., Fernández-Rey, E. y Lafuente, A., 2001. Alternate cadmium exposure differentially affects the content of gamma-aminobutyric acid (GABA) and taurine within the hypothalamus, median eminence, striatum and prefrontal cortex of male rats. *Archives of Toxicology*, 75(3): 127-133.

Fierro, R., Foliguet, B., Bene, M.C., Barbarino, P., Faure, G., y Grignon, G. 1996. Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction: modifications judged by electron microscopy/flow cytometry. *Archives of Andrology*, 36(3): 187-196.

Filtz, M.T., Vogel, W.K. y Leid, M. 2014. Regulation of transcription factor activity by interconnected post-translational modifications. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(2): 76-85.

Gunnarsson, D., Nordberg, G. y Selstam, G. 2007. Differential effects of cadmium on the gene expression of seven-transmembrane-spanning receptors and GAPDH in the rat testis. *Toxicology Letters*, 168(1): 51-57.

Guo, W., Qu, F., Xia, L., Guo, Q., Ying, X. y Dinget, Z. 2007. Identification and characterization of ERp29 in rat spermatozoa during epididymal transit. *Reproduction*, 133(3): 575-584.

Hachfi, L. y Sakly, R. 2010. Effect of Cd transferred via food product on spermatogenesis in the rat. *Andrologia* 42(1): 62-64.

Hall, J.C. y Killian, G.J. 1987. Changes in rat sperm membrane glycosidase activities and carbohydrate and protein contents associated with epididymal transit. *Biology of Reproduction*, 36(3): 709-718.

Haouem, S., Najjar, M.F., Hani, A.E. y Sakly, R. 2008. Accumulation of cadmium and its effects on testis function in rats given diet containing cadmium-polluted radish bulb. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 59(5): 307-311.

Hernández-Cruz, P., Pérez-Campos, E., Martínez-Martínez, L., Ortiz, B. y Martínez, G. 2005. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *REB*, 24(1): 21-27.

Hernández-Rodríguez, J., Togno-Peirce, C., López de Jesús, P., Pérez-Aguirre, S.G., Arenas-Ríos, E., Viguera-Villaseñor, R.M., Montes-López, S., Bonilla-Jaime, H., Damián-Matzumura, P. Arteaga-Silva, M. 2016. Efecto del cadmio en la maduración espermática epididimaria. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(3): 11-21.

Hess, R.A. y Renato de Franca, L. 2008. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 636(1):1-15.

Hinton, B.T., Galdamez, M.M., Sutherland, A., Bomgardner, D., Xu, B., Abdel-Fattah, R. y Yang, L. 2011. How do you get six meters of epididymis inside a human scrotum? *Journal of Andrology*, 32(6): 558-564.

Hui, X., Yuan, S.Q., Zheng, Z.H. y Yan, W. 2013. The cytoplasmic droplet may be indicative of sperm motility and normal spermiogenesis. *Journal of Andrology*, 15(6): 799-805.

Huleihel, M y Lunenfeld, E. 2004. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian Journal of Andrology*, 6(2004): 259-268.

Ignotz, G.G., Lo, M.C., Perez, C.L., Gwathmey, T.M. y Suarez, S.S. 2001. Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biology of Reproduction*, 64(6): 1806-1811.

INEGI, 2016: Instituto Nacional de Estadística y Geografía - Temas estadísticos, en: www3.inegi.org.mx/sistemas/temas/default.aspx?s=est&c=17484, 30 may. 2016.

Järup, L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68(1): 167-182.

Järup, L. y Akesson, A. 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3): 201-208.

Jenardhanan, P., Panneerselvam, M. y Mathur, P.P. 2016. Effect of environmental contaminants on spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15 pp.

Ji, Y.L., Wang, H., Liu, P., Wang, Q., Zhao, X.F., Meng, X.H., Yu, T., Zhang, H., Zhang, C., Zhang, Y. y Xu, D.X. 2010. Pubertal cadmium exposure impairs testicular development and spermatogenesis via disrupting testicular testosterone synthesis in adult mice. *Reproductive Toxicology*, 29(2): 176–183.

Ji, Y.L., Wang, H., Zhang, Y., Zhao, M., Chen, Y.H. y Xu, D.X. 2013. N-acetylcysteine protects against cadmium-induced germ cell apoptosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress in testes. *Asian Journal of Andrology*, 15(2): 290-296.

Jiménez, I., Fierro, R., González-Márquez, H., Mendoza-Hernández, G., Romo, S. y Betancourt, M. 2006. Carbohydrate affinity chromatography indicates that arylsulfatase a from capacitated boar sperm has mannose and n-acetylglucosamine/sialic acid residues. *Archives of Andrology*, 52(2006): 455-462.

Jiménez, I., González-Márquez, H., Ortiz, R., Herrera, J.A., Garcíí, A, Betancourt, M. y Fierro, R. 2003. Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 59(5-6): 1171-1180.

Jiménez-Ortega, V., Cano-Barquilla, P., Fernández-Mateos, P., Cardinali, Daniel, P., Esquifino, A.I., 2012. Cadmium as an endocrine disruptor: correlation with anterior pituitary redox and circadian clock mechanisms and prevention by melatonin. *Free Radical Biology & Medicine*, 53(12): 2287-2297.

Keber, R., Rozman, D. y Horvat, S. 2013. Sterols in spermatogenesis and sperm maturation. *Journal of Lipid Research*, 54(1): 20–33.

Kerkhofs, S., Dubois, V., De Gendt, K., Helsen, C., Clinckemalie, L., Spans, L., Schuit, F., Boonen, S., Vanderschueren, D., Saunders, P.T.K., Verhoeven, G. y Claessens, F. 2012. A role for selective androgen response elements in the development of the epididymis and the androgen control of the 5 reductase II gene. *The FASEB Journal*, 26(10): 4360-4372.

Lacorte, L.M., Seiva, F.R., Rinaldi, J.C., Delella, F.K., Moroz, A., Sarobo, C., Godinho, A.F., Fávoro, W.J., Fernandes, A.A. y Felisbino, S.L. 2013. Caffeine reduces cadmium accumulation in the organism and enhances the levels of antioxidant protein expression in the epididymis. *Reproductive Toxicology*, 35(2013): 137-143.

Lafuente, A. 2013. The hypothalamic–pituitary–gonadal axis is target of cadmium toxicity. An update of recent studies and potential therapeutic approaches. *Food and Chemical Toxicology*, 59(2013): 395-404.

Lafuente, A., Marquez, N., Perez-Lorenzo, M., Pazo, D. y Esquifino, A.I., 2000. Pubertal and postpubertal cadmium exposure differentially affects the hypothalamus-pituitary-testicular axis function in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 38(10): 913-923.

Lafuente, A., Marquez, N., Pérez-Lorenzo, M., Pazo, D. y Esquifino, A.I., 2001. Cadmium effects on hypothalamic–pituitary–testicular axis in male rats. *Experimental Biology and Medicine*, 226(6): 605-611.

Lafuente, A., Márquez, N., Piquero, S. y Esquifino, A.I. 1999. Cadmium affects the episodic luteinizing hormone secretion in male rats: possible age-dependent effects. *Toxicology Letters*, 104(1-2): 27–33.

Lewis, B. y Aitken, R.J. 2001. Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 64(2001): 1545-1556.

Lucio, R.A., Tlachi-López, J.L., López, A.A., Zempoalteca, R. y Velázquez-Moctezuma, J. 2009. Análisis de los parámetros del eyaculado en la rata Wistar de laboratorio: descripción de la técnica. *Veterinaria México*, 40(4): 405-415.

Manna, P., Sinha, M. y Sil, P.C., 2008. Cadmium induced testicular pathophysiology: Prophylactic role of taurine. *Reproductive Toxicology*, 26(3-4): 282-291.

Marengo, S.R. 2008. Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Animal Reproduction Science*, 105(1-2): 52-63.

Matović, V., Buha, A., Đukić-Ćosić, D. y Bulat, Z. 2015. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food and Chemical Toxicology*, 78(2015): 130-140.

Méndez, Y., Báez, F. y Villamediana, P. 2011. Efecto de la exposición *in vitro* de espermatozoides humanos a cadmio (CdCl₂). *Perinatología y Reproducción Humana*, 25(4): 198-204.

Mendiola, J., Moreno, J.M., Roca, M., Vergara-Juárez, N., Martínez-García, M.J., García-Sánchez, A., Rendueles, B.E., Moreno-Grau, E., López-Espín, J.J., Ten, J., Bernabeu R. y Torres-Cantero, A.M. 2011. Relationships between heavy metal concentrations in three different body fluids and male reproductive parameters: a pilot study. *Environmental Health*, 10(6): 1-7.

Micucci H.A. y Camps, E. 1987. Lectinas: Obtención, Estructura Química, Propiedades y Aplicaciones Diagnósticas y Farmacológicas. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 6(1): 35-54.

Mor, V., Das, T., Bhattacharjee, M. y Chatterjee, T. 2007. Protein tyrosine phosphorylation of a heparin-binding sperm membrane mitogen (HBSM) is associated with capacitation and acrosome reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352(2): 404-409.

Moseley, F.L., Jha, K.N., Björndahl, L., Brewis, I.A., Publicover, S.J., Barratt, C.L. y Lefièvre, L. 2005. Protein tyrosine phosphorylation, hyperactivation and progesterone-induced acrosome reaction are enhanced in IVF media: an effect that is not associated with an increase in protein kinase A activation. *Molecular Human Reproduction*, 11(7): 523-529.

Mouritsen, A., Aksglaede, L., Sorensen, K., Mogensen, S.S., Leffers, H., Main, K.M., Frederiksen, H., Andersson, A.M., Skakkebaek, N.E. y Juul, A. 2010. Hypothesis: exposure to endocrine-disrupting chemicals may interfere with timing of puberty. *International Journal of Andrology*, 33(2):346-359.

Murphy, V.A. 1997. Cadmium: Acute and chronic neurological disorders. In: Yasui M, Strong M, Ota K, Verity MA (Eds.) *Mineral and Metal Neurotoxicology*. Boca Raton, FL: CRC press, pp. 229–240.

- Neto, F.T., Bach, P.V., Najari, B.B., Li, P.S. y Goldstein, M. 2016. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 17 pp.
- O'Donnell, L., Nicholls, P.K., O'Bryan, M.K., McLachlan, R.I. y Stanton, P.G. 2011. Spermiation, The process of sperm release. *Spermatogenesis*, 1(1): 14-35.
- O'Hara, L., Welsh, M., Saunders, P.T.K. y Smith, L.B. 2011. Androgen receptor expression in the caput epididymal epithelium is essential for development of the initial segment and epididymal spermatozoa transit. *Endocrinology*, 152(2): 718-729.
- Ohtani, K., Yanagiba, Y., Ashimori, A., Takeuchi, A., Takada, N., Togawa, M., Hasegawa, T., Ikeda, M. y Miura, N., 2013. Influence of injection timing on severity of cadmium-induced testicular toxicity in mice. *The Journal of Toxicological Sciences* 38(1): 145-150.
- Oliva, R. 2006. Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update*, 12(4): 417-435.
- Oliva-Hernández, J. y Marcos-González, M. 2010. Efectos de la descongelación-lavado sobre la motilidad, vitalidad y morfología de espermatozoides de baja calidad. *Revista Internacional de Andrología*, 8(1):14-20.
- Oliveira, H., Spanò, M., Santos, C. y Pereira, M.L. 2009. Adverse effects of cadmium exposure on mouse sperm. *Reproductive Toxicology*, 28(4): 550-555.
- Ortega-López, L., Olaya-Vila, E., López-Domínguez, P., Gabriel-Segovia, A., Orozco-Gómez, I., Núñez-Calonge, R., y Caballero-Peregrín, P. 2010. Comparación entre el test de fragmentación de DNA espermático mediante la técnica de SCD y el índice de vitalidad medida con el test de naranja de acridina. *Revista Internacional de Andrología*, 8(3): 114-121.
- Palma, C y Vinay; J.C. 2014. Infertilidad masculina, *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25: 122-128.
- Palomo-Peiró, M.J. 1995. Efecto del tratamiento de los espermatozoides sobre la fecundación *in vitro* en el caprino. Tesis inédita de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Pant, N., Upadhyay, G., Pandey, S., Mathur, N., Saxena, D.K. y Srivastava, S.P. 2003. Lead and cadmium concentration in the seminal plasma of men in the general population: correlation with sperm quality. *Reproductive Toxicology*, 17: 447-450.

Pavlaki, M.D., Araújo, M.J., Cardoso, D.N., Silva, A.R.R, Cruz, A., Mendo, S., Soares, A.M.V.M., Calado, R. y Loureiro, S. 2016. Ecotoxicity and genotoxicity of cadmium in different marine trophic levels. *Environmental Pollution*, 215(2016): 203-212.

Pizent, A., Tariba, B. y Živković, T. 2012. Reproductive toxicity of metals in men. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 63(1): 35-46.

Poliandri, A.H., Esquifino, A.I., Cano, P., Jiménez, V., Lafuente, A., Cardinali, D.P. y Duvilanski, B.H., 2006. In vivo protective effect of melatonin on cadmium induced changes in redox balance and gene expression in rat hypothalamus and anterior pituitary. *Journal of Pineal Research*, 41(3): 238-246.

Povey, A. C. y Stocks, S. J. 2010. Epidemiology and trends in male subfertility, *Human Fertility*. 13(4):182-188.

Quintero-Vásquez, G.A., Bermúdez-Cruz, R.M. y Castillo-Cadena, J. 2015. Infertilidad masculina y fragmentación del ADN espermático: Un problema actual. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18(2): 144-151.

Ramírez, A. 2002. Toxicología del Cd conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 63(1): 51-64.

Ribeiro, C.M., Queiróz, D.B.C., Patrão, M.T.C.C., Denadai-Souza, A., Romano, R.M., Silva, E.J.R. y Avellar, M.C.W. 2015. Dynamic changes in the spatio-temporal expression of the β -defensin SPAG11C in the developing rat epididymis and its regulation by androgens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 404(2015): 141-150.

Ribeiro, S.P. 2013. Efeitos do cádmio, chumbo e zinco em epidídimo de ratos Wistar. Tesis inédita de Maestría. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais-Brasil.

Robaire, B. y Hamzeh, M. 2011. Androgen Action in the epididymis. *Journal of Andrology*, 32(6): 592-599.

Robaire, B. y Hinton, B.T. 2015. The Epididymis. En: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*, 4th ed, T.M. Plant y A.J. Zeleznik, Eds. USA: Elsevier, 619-677 pp.

Rodríguez-Tobón, A. 2011. Análisis macro y microestructural del epidídimo en relación con la maduración y almacenamiento de espermatozoides en el murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus*. Tesis inédita de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.

Rodríguez-Tobón, A. 2016. Estudio de la maduración de espermatozoides epididimarios del murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus*. Tesis inédita de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.

Ronchetti, S.A., Miler, E.A., Duvilanski, B.H. y Cabilla, J.P. 2013. Cadmium mimics estrogen-driven cell proliferation and prolactin secretion from anterior pituitary cells. Nadal A, ed. PLoS One, 8(11): e81101.

Saeed, B.T. 2013. Effects of cadmium on sperm parameters, histological and hormonal changes in testes of mature rats. Iraqi Journal. Embryos and Infertility Researches, 3: 45-51.

Seligman, J., Zipser, Y. Y Kosower, N.S. 2004. Tyrosine Phosphorylation, Thiol Status, and Protein Tyrosine Phosphatase in Rat Epididymal Spermatozoa. Biology of Reproduction, 71(3): 1009-1015.

Sellami A., Chakroun N., Zarrouk S. B., Sellami H., Kebaili S., Rebai T. y Keskes L. 2013. Assessment of chromatin maturity in human spermatozoa: Useful aniline blue assay for routine diagnosis of male infertility. Hindawi Publishing Corporation. Advances in Urology, 8 pp.

Sepaniak, S., Forges, T., Gerard, H., Foliguet, B., Bene, M. y Monnier-Barabarino, P. 2006. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. Toxicology, 223(1-2): 54-60.

Sharma, V., Ichikawa, M. y Freeze, H.H. 2014. Mannose metabolism: More than meets the eye. Biochemical and Biophysical Research Communications, 453(2014): 220-228.

Shum, W.W.C., Da Silva, N., Brown, D. y Breton, S. 2009. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. Journal of Experimental Biology, 212 (pt11): 1753-1761.

Siu, E. R., Mruk, D. D., Porto, C. S. y Cheng, C. Y. 2009. Cadmium-induced testicular injury. Toxicology and Applied Pharmacology, 238(3): 240-249.

Sostaric, E., Aalberts, M., Gadella, B.M. y Stout, T.A.E. 2008. The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. Animal Reproduction Science, 107(3-4): 237-248.

Staessen, J., Amery, A., Bernard, A., Bruaux, P., Buchet, J.P., Claeys, F., De Plaen, P., Ducoffre, G., Fagard, R., lauwerys, R.R., Lijnen, P., Nick, L., Saint Remy, A., Roels, H., Rondia, D., Sartor, F. y Thijs, L. 1991. Effects of exposure to cadmium on calcium metabolism: a population study. British Journal of Industrial Medicine, 48(10): 710-714.

Taha, E.A., Sayed, S.K., Ghandour, N.M., Mahran, A.M., Saleh, M.A., Amin, M.M. y Shamloul, R. 2013. Correlation between seminal lead and cadmium and seminal parameters in idiopathic oligoasthenozoospermic males. *Central European Journal of Urology*, 66(1): 84-92.

Tajiri, S., Fukui, T., Sawaguchi, A. y Yoshinaga, K. 2012. Cell- and region-specific expression of sugar chains in the mouse epididymal epithelium using lectin histochemistry combined with immunohistochemistry. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 88: 141-146.

Tbeileh, N., Elbetieha, A., Darmani, H. y Khamas, W. 2007. Effects of long term exposure to cadmium chloride on fertility in adult male mice. *Veterinary Research*, 1: 40-48.

Toshimori, K. 1998. Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell and Tissue Research*. 293(2): 177-187.

Toyonaga, M., Kaihara, A. y Tsutsui, T. 2011. The quality of cryopreserved sperm collected from feline caudal epididymides stored at room temperature. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 73(10): 1395-1398.

Tulsiani, D.R.P. 2003. Glycan modifying enzymes in luminal fluid of rat epididymis: Are they involved in altering sperm surface glycoproteins during maturation? *Microscopy Research and Technique*, 61(2003): 18-27.

Tulsiani, D.R.P. 2006. Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: An overview of their potential role in sperm maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250(2006): 58-65.

Tulsiani, D.R.P. y Abou-Haila, A. 2012. Biological processes that prepare mammalian spermatozoa to interact with an egg and fertilize it. *Scientifica*, 2012(2012): 1-12.

Villaverde, A.I., Hetherington, L. y Baker, M.A. 2016. Quantitative glycopeptide changes in rat sperm during epididymal transit. *Biology of Reproduction*, 94(4): 1-13.

Wang, B. y Du, Y. 2013. Cadmium and its neurotoxic effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013(2013): 1-12.

Wang, L., Li, Y., Fu, J., Zhen, L., Zhao, N., Yang, Q., Li, S. y Li, X. 2016. Cadmium inhibits mouse sperm motility through inducing tyrosine phosphorylation in a specific subset of proteins. *Reproductive Toxicology*, 63(2016): 96-106.

Wang, W., Sun, Y., Liu, J., Wang, J., Li, Y., Li, H., Zhang, W. y Liao, H., 2012. Protective effect of theaflavins on cadmium-induced testicular toxicity in male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 50(9): 3243-3250.

Wdowiak, A., Bakalczuk, S. y Bakalczuk, G. 2015. The effect of sperm DNA fragmentation on the dynamics of the embryonic development in intracytoplasmatic sperm injection. *Reproductive Biology*, 15(2): 94-100.

Whitfield, M., Pollet-Villard, X., Levy, R., Drevet, J.R. y Saez, F. 2015. Posttesticular sperm maturation, infertility, and hypercholesterolemia. *Asian Journal of Andrology*, 17(2015): 742-748.

Wijesekara, G.U.S., Fernando, D.M.S., Wijerathna, S. y Bandara, N. 2015. Environmental and occupational exposures as a cause of male infertility: A caveat. *Ceylon Medical Journal*, 60(2): 52-56.

Wong, E.W. y Cheng, C.Y. 2011. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends pharmacology sciences*. 32(5): 290-299.

World Health Organization, WHO. 2010. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva. 286 Pp.

Xu, D.X., Shen, H.M., Zhu, Q.X., Chua, L., Wang, Q.N., Chia, S.E. y Ong, C.N. 2003. The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1-2): 155-163.

Yang, H. y Shu, Y. 2015. Cadmium transporters in the kidney and cadmium-induced nephrotoxicity, *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1): 1484-1494.

Yang, J.M., Arnush, M., Chen, Q.Y., Wu, X.D., Pang, B. y Jiang, X.Z. 2003. Cadmium-induced damage to primary cultures of rat Leydig cells. *Reproductive Toxicology*, 17(5): 553-560.

Yari, A., Sarveazad, A., Asadi, E., Raouf-Sarshoori, J., Babahajian, A., Amini N., Amidi, F., Bahadoran, H., Joghataei, M., Asadi, M. y Shams, A. 2016. Efficacy of *Crocus sativus* L. on reduction of cadmium-induced toxicity on spermatogenesis in adult rats. *Andrologia*, 2016(2016): 1-9.

Zhang, X. y Lui W.Y. 2014. Dysregulation of nectin-2 in the testicular cells: An explanation of cadmium-induced male infertility. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1839 (2014): 873-884.