



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**EFEECTO DEL CADMIO SOBRE LA GLICOSILACIÓN DE
LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES
EPIDIDIMARIOS DE RATAS WISTAR.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

PRESENTA

M. EN BRA. JOEL HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

CODIRECTORAS DE TESIS

DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA

DRA. EDITH ARENAS RÍOS

ASESORA: DRA. IRMA JIMENEZ MORALES

Ciudad de México a 02 de diciembre de 2021.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neuroendocrinología Reproductiva del Departamento de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Marcela Arteaga Silva, en el Laboratorio de Bioquímica del espermatozoide a cargo de la Dra. Edith Arenas Ríos, del Departamento de Biología de la Reproducción y en el Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría, bajo la dirección de la Dra. Rosa María Viguera Villaseñor. El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo de la Dra. Irma Jiménez Morales.

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de Doctorado, con el número de registro CVU/Becario: 622536/570248, que comprendió del periodo de 01 de enero de 2017 al 31 de diciembre de 2020. El Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y, además, cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

M. en BRA. Joel Hernández Rodríguez.

Ciudad de México a 02 de diciembre de 2021.

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN:

DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA

Departamento en Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
PRESIDENTA

DRA. EDITH ARENAS RÍOS

Departamento en Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
SECRETARIA

DRA. IRMA JIMÉNEZ MORALES

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
VOCAL

DRA. ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR

Laboratorio de Biología de la Reproducción.
Instituto Nacional de Pediatría.
VOCAL

DRA. ELIA ROLDÁN REYES

Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis
UMIEZ-Lab 2 pp. FESZ, UNAM.
VOCAL



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00122

Matrícula: 2171802183

Efecto del cadmio sobre la glicosilación de la membrana plasmática de espermatozoides epididimarios de ratas Wistar.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 2 del mes de diciembre del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA
DRA. IRMA JIMENEZ MORALES
DRA. ELIA ROLDAN REYES
DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR
DRA. EDITH ARENAS RIOS

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: JOEL HERNANDEZ RODRIGUEZ

JOEL HERNÁNDEZ RODRIGUEZ
ALUMNO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICÁLDE

PRESIDENTA

DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA

VOCAL

DRA. IRMA JIMENEZ MORALES

VOCAL

DRA. ELIA ROLDAN REYES

VOCAL

DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR

SECRETARIA

DRA. EDITH ARENAS RIOS

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación lo quiero dedicar con un gran cariño, aprecio y reconocimiento a mis Papás, los señores **Eugenio Hernández** y **Guadalupe Rodríguez**, quienes siempre han sido mi principal fuente de apoyo e inspiración para continuar progresando, aprendiendo y no dejar de plantearme y cumplir objetivos con gran ánimo y compromiso, pues en todo momento y ocasión me han hecho saber que creen fehacientemente en Mí y han depositado con gran plenitud su confianza y seguridad para que todo lo que he me proponga lo pueda cumplir y sé que puedo contar con ellos para los proyectos que aun deseo plantearme y llevar acabo. Mis Papás han sido el principio y la base de mi interés para poder progresar, pues sin duda alguna, es por parte de ellos de quienes he recibido en todo momento el sustento, la enseñanza y fortaleza para para enfrentar los momentos de gran dificultad en mi vida diaria y académica en sus distintas etapas y asimismo han sido mi fuente de inspiración para conseguir y alcanzar cada logro y éxito en mi vida profesional.

De igual manera, deseo dedicar esta tesis a mis queridas hermanas **Ale**, **Lupita** y **Mari** y así mismo a cada uno de mis estimados sobrinos, pues sé que he podido y podré continuar contando con su gran apoyo en todo momento, así como de su confianza, respaldo y compañía por todo el tiempo que la vida me lo permita. Doy gracias por los invaluable momentos que hemos podido compartir, por el tiempo que me han acompañado y por los consejos y actos que me han guiado a ser un mejor hombre de familia y para la sociedad, reafirmo que parte de este trabajo y crecimiento académico se ha podido cumplir por la inspiración que me han brindado desde etapas muy tempranas de mi vida y por su constante confianza otorgada para que me supere día con día y pueda obtener gratos triunfos en la vida.

Sé que siempre harán falta las palabras correctas para poder terminar de agradecer todas las formas mediante las cuales me han apoyado, dado confianza, otorgado su comprensión y unión a mis deseos, por lo que mi mayor anhelo es que este escrito sea una manera de inspiración para generar en Ustedes el gusto de superación en todo instante y plan que tengan. Espero que la vida y nuestra fe nos permita mantenernos unidos con gran alegría, firmeza y bendiciones para salir adelante frente a los retos puedan venir.

AGRADECIMIENTOS

Durante el tiempo que requirió poder plantear, realizar y cubrir cada uno de los objetivos que integran a este proyecto de investigación de Doctorado, ocurrieron una serie de distintos retos que para algunos pudieron llegar a significar una señal de desánimo y derrota, pero por fortuna y gracias al apoyo que recibí por parte de cada una de las personas que mencionaré, tuve un mayor número de posibilidades que permitieron resolver dichas dificultades y a su vez me brindaron la oportunidad de poder adquirir un mayor crecimiento personal y emocional además de académico, es por ello que deseo agradecer plenamente a todos los seres que me extendieron su mano, tiempo y espacios de trabajo para poder realizar mis experimentos, análisis de muestras y colaboración para la realización y conclusión de este escrito de tesis.

Dra. Marcela Arteaga Silva s gracias a Usted a quien realmente debo todo el aprendizaje que me ha permitido llegar hasta este grado, su apoyo y los conocimientos que me ha compartido a lo largo de tantos años de convivencia no solamente han influido de manera favorable para mejorar en mis estudios y progreso escolar, sino también para mi persona y nivel profesional, deseo qué pueda Yo tener muchas oportunidades para regresar una mínima parte de todo lo que me ha brindado pues para Mí es invaluable cada una de las cosas que ha hecho para mí bien, sé que no pude haber tomado mejor decisión que la de acercarme con Usted, siempre voy a admirar su buen ánimo para todas las situaciones, que sea tan positiva y su capacidad para proponer nuevas iniciativas de trabajo e investigación, confío en qué todas estas habilidades le darán aún muchos más momentos gratos llenos de alegría y éxitos, por último dejes mis deseos para que Usted y toda su familia reciban muchas bendiciones, que siempre permanezcan unidos, llenos de mucha salud y felicidad.

Dra. Edith Arenas Ríos estoy muy agradecido con Usted pues siempre he recibido un gran apoyo incondicional de su parte para poder cumplir con los objetivos de esta tesis y para mejorar en diferentes aspectos, doy gracias porqué desde el comienzo a su lado me he sentido lleno de confianza para poder realizar las metas propuestas y por sobre todo la fortaleza que me ha otorgado cada ocasión qué tuve oportunidad de trabajar en conjunto. Con el mismo afecto que siento de su parte deseo que siempre se encuentre con bien, llena de salud, amor y felicidad y qué los buenos deseos sean extensivos para su familia y seres queridos que la acompañan.

Dra. Irma Jiménez Morales, estimo mucho su atención y ayuda para ir mejorando día a día, su disponibilidad para realizar mejoras al proyecto y en la publicación, su asesoría me sirvió de gran ayuda para poder entender los temas que tenía pendientes y mejorar los que creí ya eran correctos, muchas gracias por la confianza que me tuvo. Deseo que tenga muchos éxitos, que esté muy bien y disfrute de todo momento al lado de sus seres queridos.

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor no tengo las suficientes palabras para agradecerle que todo el tiempo que he requerido de su ayuda y asesoría Usted ha siempre respondido con buena actitud y disposición, gracias por compartir su gran experiencia y para lograr realizar este trabajo de investigación y por contemplarme dentro de sus clases. No quiero dejar pasar de lado que gracias al espacio que me brindó en su laboratorio y con la guía del **Sr. Pedro Medina** se pudo completar la publicación que me permitió graduarme. Le extiendo mi eterno agradecimiento y buenos deseos para Usted y su apreciable familia, así como para sus compañeros de laboratorio en el Instituto Nacional de Pediatría.

Dr. Sergio Montes-López quiero agradecerle plenamente la oportunidad que me otorgo para poder trabajar dentro del laboratorio de Neuroquímica del INNN, pues pude contar con todas las facilidades para realizar algunos de los análisis que son una parte básica de esta investigación, no obstante, lo más valioso para Mí ha sido toda la disponibilidad, asesoría y confianza brindada sin algún interés de por medio, es por ello que deseo que la vida lo colme de muchas satisfacciones en sus proyectos, trabajo y convivencia familiar, y este lleno de salud y muchos éxitos.

Dra. Edith Cortés-Barberena le agradezco su apoyo, tiempo y confianza para poder realizar mis análisis en su equipo de citometría de flujo, y por su accesibilidad para retomar la teoría y práctica en sus clases, lo que sin duda alguna reforzó y corrigió mi conocimiento en los temas relacionados con esta área. Pero sobre todo deseo agradecer su amabilidad y atenciones que me tuvo cada ocasión que acudí con Usted, espero tenga mucha salud y bienestar, y siga teniendo más éxitos tanto profesional como personalmente.

Dra. Elia Roldán Reyes quiero expresarle mis gratos agradecimientos por haber tomado con total compromiso parte final de este proceso de obtención del grado, pese a no conocerme directamente, sin embargo, sus revisiones me dieron nuevos puntos de vista que corrigieron y mejoraron oportunamente el presente trabajo, sobre todo quiero agradecer su amabilidad y la posibilidad de seguir en contacto con Usted y su asesoría y colaboración para nuevos proyectos. Deseo que le vaya muy bien en todos sus planes y proyectos y este llena de salud por mucho tiempo más.

Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero y **Dr. Daniel Mota Rojas** les expreso mi gratitud por sus observaciones y comentarios en el escrito de tesis y en mi preexamen de grado, sin duda todos sus aportes fueron de gran ayuda para poder tener una notoria mejora y respaldo al trabajo que ahora presento, espero siga teniendo muchos éxitos y que sus conocimientos sigan siendo de gran ayuda para sus propósitos tanto en la vida personal como profesional.

Dra. Isabel Arrieta-Cruz estoy muy agradecido por toda la disponibilidad que tuvo para poder realizar parte de los objetivos que teníamos planteados, sé que no tenía Usted ningún compromiso que la obligara, pero también sé que su buen corazón y actitud de ayudar a los demás la llevo a ayudarme incondicionalmente, mil gracias y espero que todo le sea recompensado con creces.

Deseo continuar siendo específico con los agradecimientos a cada una de las personas que han aportado invaluable momentos de alegría, compañía y crecimiento en conjunto con ayuda para alcanzar las metas planeadas, pero creo nunca lograría terminar de agradecer todos esos gratos momentos, las nuevas experiencias y vivencias que he tenido al lado de seres muy importantes como los **M. en BRA. Sonia Guadalupe Pérez Aguirre** y **Sergio Marín de Jesús**, así como de las **Dras. Ofelia Limón Morales** y **Ana Laura López López**, valiosas personas con quienes he podido tener gratas experiencias, y formar recuerdos que serán por siempre muy valiosos, en compañía de otros miembros que han colaborado con el Laboratorio de Neuroendocrinología Reproductiva y han sido de gran ayuda para que pueda en un seguir avanzando en este camino de preparación y superación constante, les agradezco su ayuda, y espero seguir manteniendo la cálida comunicación y relación de trabajo por largo tiempo.

Agradezco mucho toda la ayuda, la atención oportuna y disposición que recibí por parte de los Coordinadores del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud el **Dr. Humberto González Márquez** y el **Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez**, gracias por su guía y asesoría a toda hora y en cualquier momento, a mis compañeros de generación que resolvían mis dudas sin complicaciones y a la **Universidad Autónoma Metropolitana** en general por toda la ayuda otorgada.

A TODOS ¡MIL GRACIAS!

ÍNDICE GENERAL

Título	Página
ABREVIATURAS.....	I
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	01
2. MARCO TEÓRICO.....	04
2.1. Estructura del epidídimo.....	04
2.1.1. Células principales.....	07
2.1.2. Células claras.....	10
2.1.3. Células basales.....	10
2.1.4. Células apicales.....	11
2.1.5. Células estrechas.....	12
2.1.6. Células halo.....	12
2.1.7. Células dendríticas.....	13
2.2. Función del epidídimo.....	14
2.3. Maduración espermática epididimaria.....	16
2.3.1. Cambios para la maduración del espermatozoide en el epidídimo.....	16
2.3.1.1 Cambios bioquímicos.....	17
2.4. Regulación hormonal del epidídimo.....	20
2.5. Parámetros de calidad espermática.....	22
2.5.1. Vitalidad espermática.....	23
2.5.2. Concentración espermática.....	23
2.6. infertilidad masculina.....	23
2.6.1. Efectos del Cd sobre la fertilidad masculina.....	24
2.6.2. Efectos del cadmio sobre la espermatogénesis.....	25
2.6.3. Efecto del cadmio sobre la calidad espermática.....	26
2.7. Efectos del Cd sobre la función epididimaria.....	26
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	28
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	29

3.1. Animales.....	29
3.2. Procedimiento experimental.....	29
3.3. Determinación de la concentración de Cd en sangre y epidídimo.....	30
3.4. Concentración de testosterona (T) en suero sanguíneo.....	30
3.5. Disección del epidídimo y recuperación de espermatozoides.....	31
3.6. Evaluación histológica del epidídimo.....	31
3.7. Evaluación espermática.....	32
3.8. Distribución de carbohidratos e índice de fluorescencia.....	32
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Cuantificación de Cd en la sangre y las tres regiones del epidídimo.....	34
4.2. Cuantificación de T en suero.....	35
4.3. Análisis histológico del epidídimo.....	35
4.4. Efectos del Cd en la altura y área de células principales.....	38
4.5. Determinación espermática.....	39
4.6. Efecto del Cd en la distribución de los carbohidratos.....	40
4.6.1. Patrones de distribución de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en espermatozoides.....	40
4.6.2. Porcentajes de los patrones de distribución de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en espermatozoides.....	40
4.6.3. Índice de fluorescencia de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico.....	44
4.6.4. Patrones de distribución de manosa en espermatozoides.....	45
4.6.5. Porcentajes de los patrones de distribución de la fluorescencia de manosa.....	45
4.6.6. Índice de fluorescencia de manosa.....	49
4.6.7. Índice de fluorescencia de fucosa.....	50
5. DISCUSIÓN.....	52
6. CONCLUSIONES.....	62
7. PERSPECTIVAS.....	62
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
9. ANEXOS.....	80

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Título	Página
Tabla 1. Lectinas vegetales utilizadas para el estudio de glicoproteínas.....	19
Tabla 2. Concentración de T en suero.....	35
Tabla 3. Efecto del Cd en la altura y el área de las células principales.....	38
Tabla 4. Efecto del Cd en la determinación espermática epididimaria	39
Figura 1. Estructura anatómica del epidídimo de rata	06
Figura 2. Esquema de la estructura, regionalización y principales células del epidídimo.....	07
Figura 3. Representación esquemática de una célula principal.....	09
Figura 4. Representación esquemática de tipos celulares en el epitelio del epidídimo.....	13
Figura 5. Regulación hormonal del epidídimo por la T.....	21
Figura 6. Cuantificación de Cd en la sangre y las tres regiones del epidídimo.....	34
Figura 7. Análisis histológico del epidídimo.....	37
Figura 8. Micrografías de patrones de distribución de fluorescencia de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en espermatozoides.....	42
Figura 9. Porcentajes de distribución de patrones de fluorescencia de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en la membrana de los espermatozoides de las tres regiones del epidídimo.....	43
Figura 10. Índices de fluorescencia de los N-acetilglucosamina y/o ácido siálico.....	44
Figura 11. Micrografías de patrones de distribución de fluorescencia manosa en espermatozoides	47
Figura 12. Porcentajes de distribución de patrones de fluorescencia de manosa en la membrana de los espermatozoides de las tres regiones del epidídimo.....	48
Figura 13: Índices de fluorescencia de manosa.....	49
Figura 14: Índices de fluorescencia de fucosa.....	51
Figura 15. Modelo esquemático del mecanismo propuesto para explicar el efecto que genera el Cd sobre el proceso de glicosilación durante la maduración espermática epididimaria de la rata Wistar.....	61

ABREVIATURAS

°C – grados Celsius

μL – microlitros

17β-HSD – enzima 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa

3β-HSD – enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa

5-αR – enzima 5-α reductasa

AB – ampollas apicales

ABP – proteína unidora de andrógenos

ANOVA – análisis de varianza

ATSDR – *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

BM – membrana basal

CA – células apicales

Ca²⁺ – calcio

CB – células basales

CC – células claras

Cd – cadmio

CdCl₂ – cloruro de cadmio

Cl⁻ – cloro

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

CP – células principales

cp – pozos recubiertos

Ctrl – control/ grupo control

CV – coeficientes de variación

CHOs – carbohidratos que participan en la glicosilación de la membrana plasmática

DHT – 5α-dihidrotestosterona

dL – decilitros

DNA – ácido desoxirribonucleico

DPN – días posnatales

E – endosomas

E₂ – 17β-estradiol

EEM – error estándar de la media

ERA – elementos de respuesta para andrógenos

EROs – especies reactivas de oxígeno

ES – epididimosomas

FITC – isotiocianato de fluoresceína
G – aparato de Golgi
g – núcleos granulares
GC – gota citoplasmática
H⁺ – hidrogeno
HC – hipertrofia celular
HCO₃⁻ – bicarbonato
HHG – eje hipotálamo hipófisis gónada
i.p. – vía intraperitoneal
INEGI – Instituto Nacional de Estadística y Geografía
K⁺ – potasio
K2-EDTA – ácido etilendiaminotetraacético dipotásico
L – lisosomas
li – lípidos infranucleares
lip – lípidos
m – metro/metros
mg – miligramos
mL – mililitros
Mv – microvellosidades
N – núcleo
NA – núcleos aberrantes
Na⁺ - sodio
Neu5Ac – ácido N-acetil-neuraminico
Neu5Gvc – ácido N-glicolil
ng – nanogramos
nm – nanómetros
NOM – Norma Oficial Mexicana
OMS – Organización Mundial de la Salud
pH – potencial hidrógeno
ppm – partes por millón
RA – receptor para andrógenos
rER – retículo endoplásmico rugoso
RIA – Radio Inmuno Análisis
RNA – ácido ribonucleico

RNA_m – RNA mensajero

Se – selenio

sER – región supranuclear de la célula

SOD-Cu/Zn – superóxido dismutasa cobre/zinc

SPZ – espermatozoides

StAR – proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda

T – testosterona

UEA – *Ulex europaeus* aglutinina

UMADI – Unidad de Manejo de Animales para Docencia e Investigación

V – vacuolización

v – vesículas apicales

VA – agregados de vesículas tubulares

WGA – *Triticum vulgare* aglutinina

Zn – zinc

μm – micrómetros

RESUMEN

Los espermatozoides al transitar por el epidídimo tienen cambios bioquímicos como parte de su maduración; entre ellos, es necesario que se generen cambios en la membrana plasmática que den paso al ensamblaje y la remodelación de los carbohidratos N-acetilglucosamina, ácido siálico, manosa y fucosa, que son agregados a la superficie de los espermatozoides para prepararlos para que puedan fertilizar con éxito al ovocito. Sin embargo, estos cambios pueden ser alterados por la exposición a contaminantes ambientales como el cadmio (Cd), que está ligado a la disminución de los parámetros espermáticos. Hasta ahora, no se había descrito si el Cd altera la capacidad del epidídimo para regular la presencia y distribución de estos carbohidratos. El objetivo del presente estudio fue determinar los efectos de la exposición de Cd en espermatozoides durante la maduración epididimaria en la rata Wistar, particularmente en la presencia y distribución de carbohidratos de la membrana plasmática. Se formaron 4 grupos experimentales: 1 control y 3 tratados con CdCl₂ por vía i.p. en dosis de 0.125, 0.25 y 0.5 mg/kg. La administración se realizó los días postnatales (DPN) 1 al 49. Tras la eutanasia a los 90 DPN, se obtuvieron espermatozoides del *caput*, *corpus* y *cauda* del epidídimo a los que se les realizó la determinación espermática y se incubaron con lectinas específicas para los carbohidratos N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa. Encontramos presencia de Cd durante la edad adulta, tanto en la sangre, como en todas las regiones del epidídimo analizadas, junto con una disminución en la concentración de testosterona. En el análisis histológico se observaron diversas alteraciones en el epitelio del epidídimo de todos los grupos tratados con Cd, que interrumpieron la maduración espermática la cual fue examinada por medio de los patrones de distribución y los índices de fluorescencia de los carbohidratos N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa, presentes en la membrana plasmática; asimismo, hubo disminución de la concentración y la vitalidad espermática. Consideramos que los problemas de infertilidad masculina que se relacionan con el Cd podrían deberse a las alteraciones en el proceso de glicosilación de los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo.

Palabras clave: cadmio, infertilidad, maduración espermática epididimaria, carbohidratos de membrana, testosterona.

ABSTRACT

Spermatozoa, when passing through the epididymis, undergo biochemical changes as part of their maturation; Among them, it is necessary to generate changes in the plasma membrane that give way to the assembly and remodeling of the carbohydrates N-acetylglucosamine, sialic acid, mannose and fucose, which are added to the surface of the sperm to prepare them so that they can fertilize successfully to the oocyte. However, these changes can be altered by exposure to environmental pollutants such as cadmium (Cd), which is linked to the decrease in sperm parameters. Until now, it has not been described whether Cd alters the ability of the epididymis to regulate the presence and distribution of these carbohydrates. The objective of the present study was to determine the effects of Cd exposure in spermatozoa during epididymal maturation in the Wistar rat, particularly in the presence and distribution of carbohydrates in the plasma membrane. 4 experimental groups were formed: 1 control and 3 treated with CdCl₂ by i.p. in doses of 0.125, 0.25 and 0.5 mg/kg. The administration was carried out on postnatal days (PND) from 1 to 49. After euthanasia at 90 PND, sperm were obtained from the caput, corpus and cauda of the epididymis to which sperm determination was performed and incubated with specific lectins for the carbohydrates N-acetylglucosamine and/or sialic acid, mannose and fucose. We found the presence of Cd during adulthood, both in the blood and in all the regions of the epididymis analyzed, together with a decrease in the concentration of testosterone. In the histological analysis, various alterations were observed in the epididymal epithelium of all the groups treated with Cd, which interrupted sperm maturation which was examined using the distribution patterns and fluorescence indices of the carbohydrates N-acetylglucosamine and/or sialic acid, mannose and fucose, present in the plasma membrane; likewise, there was a decrease in sperm concentration and vitality. We consider that male infertility problems related to Cd could be due to alterations in the glycosylation process of sperm during their transit through the epididymis.

Keywords: cadmium, infertility, sperm epididymal maturation, membrane carbohydrates, testosterone.

1. INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides son formados durante un proceso llamado espermatogénesis, tras una serie de divisiones celulares, se inicia por mitosis y posteriormente meiosis, las células germinales reducen su material genético a la mitad del número de cromosomas que tiene una célula somática de cada especie correspondiente. Dentro del proceso, también sucede la espermiogénesis que da paso a la transformación de espermátidas a espermatozoides (O'Donnell, 2015). La producción de las células sexuales se produce dentro de los testículos (Shalet, 2009).

La espermatogénesis tiene como finalidad la producción de los espermatozoides dentro del epitelio seminífero. Este proceso depende en conjunto tanto de la proliferación de las espermatogonias, como de su posterior diferenciación a espermatozoides, los cuales son liberados a la luz del túbulo testicular en la espermiación. Cabe resaltar que, tras este proceso de transformación y liberación, los espermatozoides no cuentan con la capacidad de moverse progresivamente, de realizar el proceso de capacitación y de poder llevar a cabo la reacción acrosomal, por lo que no pueden llegar a fertilizar al ovocito. De esta manera, fisiológicamente los espermatozoides no tienen el potencial fertilizante, que es adquirido, en un órgano con gran especialización llamado epidídimo (Arrotéa *et al.*, 2012; Robaire y Hinton, 2015; Hewetson *et al.*, 2017) en donde los espermatozoides deben experimentar los mecanismos que les brindan la capacidad de fertilizar, tras adquirir la maduración espermática (Dacheux *et al.*, 2009).

Por otra parte, los problemas de infertilidad han recibido atención de diversas investigaciones, debido a su importante incremento, y por ser un padecimiento que constituye un problema de salud que afecta a las parejas en edad reproductiva. En México, los datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) señalan que la infertilidad afecta a cerca de 1.5 millones de parejas, lo que corresponde a que una de cada seis de ellas, padece de problemas para lograr concebir (INEGI-Temas estadísticos, 2016). A nivel clínico, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido a la infertilidad como: la imposibilidad de lograr un embarazo luego de un año de relaciones sexuales regulares, sin el uso de algún método anticonceptivo (WHO, 2020). Así mismo, la OMS reporta que aproximadamente el 15 % de las parejas en edad reproductiva tiene problemas de fertilidad. Actualmente, los problemas de infertilidad se han atribuido a factores asociados con la mujer en un 30 %, y con factores asociados con el varón en otro 30 % de manera directa. De tal forma, que el 40 % restante se atribuye a causas múltiples sin definir, las cuales no están asociadas con alguna patología, y que pueden abarcan a los dos miembros de la pareja. Así, se ha considerado que el varón está involucrado en el 50 % de los problemas de infertilidad de la pareja (Cui *et al.*, 2016).

En los varones, las causas que conllevan a que se desencadenen los problemas de infertilidad, pueden tener como origen a una gran variedad de condiciones; sin embargo, casi siempre estas afectaciones se relacionan con alteraciones cuantitativas o cualitativas de los parámetros seminales como la concentración, la movilidad y la vitalidad de los espermatozoides (Palma y Vinay, 2014). Entre las causas que originan la infertilidad masculina, se puede mencionar varias patologías, que incluso pueden ser identificadas y tener un tratamiento, como en el hipogonadismo hipogonadotrópico y en el varicocele; otras causas 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 en un 40 % de los casos de infertilidad masculina, razón por la cual se les denomina infertilidad con etiología desconocida (Povey y Stocks, 2010; Arrotéa *et al.*, 2012).

Durante los últimos años, diversos estudios han enfocado su interés en la infertilidad masculina tanto en la salud pública como en diversas investigaciones. Se sugiere que la salud reproductiva de humanos y de animales ha sufrido efectos adversos como resultado de la exposición a agentes químicos que se encuentran en el ambiente (Povey y Stocks, 2010). Estas sustancias pueden interactuar con el sistema endócrino provocando alteraciones en la producción de espermatozoides y en las estructuras del aparato reproductor relacionadas con la capacidad fertilizante de los espermatozoides como el epidídimo, la próstata y las vesículas seminales afectando así la capacidad reproductiva del macho (Anway *et al.*, 2005; Wong y Cheng, 2011). Dentro de los agentes químicos, el cadmio (Cd), es un contaminante que se encuentra en el ambiente como resultado de las actividades antropogénicas que tiene efectos sobre la salud en general. El Cd puede ser un generador de cáncer (ATSDR, 2012) e incluso, en la reproducción se han reportado alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) (Lafuente, 2013); por ejemplo, se ha reportado que el Cd puede causar cáncer testicular y de próstata (Huff *et al.*, 2007; Lacorte *et al.*, 2015). Además, el Cd puede generar otras alteraciones en otros órganos reproductivos causando problemas en la fertilidad, entre ellos el epidídimo que es un órgano fundamental para la maduración espermática puede resultar afectado.

Al término de la espermiogénesis y al ocurrir la espermiación, los espermatozoides deben transitar por el epidídimo para adquirir los potenciales fertilizantes, proceso referido como: maduración espermática epididimaria, en donde suceden una serie de diversos cambios bioquímicos, morfológicos y fisiológicos en los espermatozoides, que desarrollan la capacidad para desplazarse hacia el ovocito, la capacidad para interactuar con el epitelio del oviducto, reconocer a la zona pelúcida y fecundar al ovocito (Dacheux y Dacheux, 2013; Gervasi y Visconti, 2017). Esto se logra

mediante mecanismos que modifican a las proteínas y los carbohidratos de la membrana plasmática del espermatozoide, conforme estas células se desplazan por el túbulo epididimario (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2016). La maduración espermática es un proceso complejo y secuencial, pues la totalidad de modificaciones que sufren los espermatozoides es desconocida, sin embargo, se sabe que este proceso implica una serie de modificaciones post-testiculares en el espermatozoide (Gervasi y Visconti, 2017; James *et al.*, 2020). Este proceso es dependiente de cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos, que dan lugar al desarrollo progresivo de la capacidad fertilizante en los espermatozoides.

Si bien, la función del epidídimo es dependiente de hormonas como la testosterona (T) o la 5 α -dihidrotestosterona (DHT), un metabolito de la T formado por una 5 α reducción. No solamente estos esteroides son los que participan en la función del epidídimo, pues la T puede dar paso a la formación de otros de ellos, como en el caso dónde es aromatizada a 17 β -estradiol (E₂) por la enzima aromatasa P450, al respecto, se ha descrito que el E₂ también participa en la regulación de las funciones que se llevan a cabo por parte del epitelio del epidídimo para poder concretar la maduración espermática, por lo que, la fisiología del epidídimo se regula tanto por la acción de andrógenos y estrógenos. La producción, secreción y asimismo la concentración de T, son un requisito para regular la morfofisiología de las 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), como parte de los procesos que están estrechamente relacionados con la producción de espermatozoides funcionales que cuenten con las habilidades para ascender dentro del oviducto, reconozcan y puedan unirse a la zona pelúcida del ovocito para luego poder penetrarlo, se encuentra la glicosilación de proteínas y de otras moléculas ancladas a la membrana plasmática de los espermatozoides, para ello se depende de la estructura y ambiente de las vías de secreción por parte de la maquinaria celular, y de un conjunto ordenado de reacciones bioquímicas que permiten que carbohidratos como N-acetilglucosamina, ácido siálico, manosa, fucosa entre otros más, puedan ser localizados y distribuidos en el espermatozoide correctamente, esto incluye la migración, remoción y adición hacia partes especiales del espermatozoide, mediante la actividad de enzimas específicas, por esta razón, poder evaluar la glicosilación de la membrana de los espermatozoides, establece un importante campo en el diagnóstico y tratamiento a los problemas de infertilidad (Cheon y Kim, 2015; Akintayo y Stanley, 2019).

A la fecha, no han sido suficientemente investigadas las afecciones por parte del Cd entre los procesos y cambios bioquímicos que experimentan los espermatozoides en su paso por el epidídimo

para adquirir la capacidad fertilizante, y que en consecuencia podrían dar lugar a una deficiencia fisiológica durante el proceso de fertilización, que no permita el éxito reproductor del macho. Motivo por el cual, este trabajo puede contribuir al entendimiento de los efectos que tienen el Cd sobre la fertilidad, causando modificaciones en la glicosilación y composición de los carbohidratos de la membrana plasmática de los espermatozoides durante su maduración epididimaria.

2. MARCO TEÓRICO

En la rata, después del nacimiento, el epidídimo debe continuar con una serie de divisiones celulares que permitan completar el enrollamiento del túbulo y, asimismo, den paso a la formación de septos que delimitan al túbulo en segmentos. Este proceso postnatal puede ser dividido en tres periodos principales: a) periodo indiferenciado, b) periodo de diferenciación, y c) periodo de expansión. Cuando el epitelio es indiferenciado se caracteriza por células columnares que contienen numerosas figuras mitóticas que permiten un rápido crecimiento del túbulo epididimario a casi 2 metros (m) de longitud en los primeros 15 días posnatales (DPN). En el periodo de diferenciación se da paso al surgimiento de los tipos celulares que son reconocidos de manera clásica en el epitelio del epidídimo adulto (células principales, halo, estrechas, basales, claras y dendríticas), se ha observado, que en el DPN 14 aparecen las células halo, en el DPN 15 se observan células estrechas y columnares, este último tipo celular para el DPN 28 se diferencia a células basales y principales, y a los 36 DPN aparecen las células estrechas y claras, a los 49 DPN todos los tipos celulares del epidídimo están totalmente diferenciados. En el periodo de expansión continua el crecimiento del túbulo y ocurre la aparición de espermatozoides en el lumen (Robaire y Hinton, 2015). Aunque los mecanismos que regulan la diferenciación y el crecimiento del túbulo y del epitelio del epidídimo aun no son totalmente conocidos, ha sido claro que la participación de andrógenos tiene un papel crítico durante el desarrollo postnatal, por lo que es importante se tenga un buen conocimiento de la estructura y funcionalidad del epidídimo, los cambios que ocurren en su interior como parte de la maduración espermática, así como los antecedentes respecto a los efectos que causa el Cd en este órgano y en los procesos que ocurren en su interior.

2.1. Estructura del epidídimo

El epidídimo es uno de los órganos sexuales masculinos, considerado como uno de los conductos sexuales accesorios, entre los que también se incluyen a: los túbulos seminíferos, la *rete testis*, los conductos eferentes, los conductos deferentes, el conducto eyaculatorio y la uretra (James *et al.*, 2020). Es una estructura en forma de medialuna que deriva del conducto de Wolff durante el desarrollo embrionario, se encuentra estructurado por un solo túbulo largo que está altamente

contorneado y es serpentino, la capa interna del conducto epididimario está revestida por un epitelio pseudoestratificado, y la capa externa está rodeada por una capa peritubular de células de músculo liso, y de un estroma de tejido intersticial que contiene la vascularización y a los vasos linfáticos (Zhao *et al.*, 2020). El conducto epididimario varía en longitud dependiendo de la especie, se ha reportado que puede medir de 1 a 80 m, siendo de 1 m en el ratón, 3 a 4 m en la rata, entre 5 y 7 m en el humano y hasta de 70 a 80 m en el caballo (Sostaric *et al.*, 2008; Arrotéa *et al.*, 2012; Robaire y Hinton, 2015). El epidídimo se origina al hacer conexión con los conductos eferentes, los cuales son los puentes de comunicación con el testículo y se delimita donde se da inicio al conducto deferente. Para su estudio, el epidídimo generalmente se divide en cuatro regiones anatómicas designadas como: I) el segmento inicial (que está presente como una región anatómicamente distintiva en ratón y rata), II) el *caput* (cabeza o región cefálica) (ambos en la región proximal), III) el *corpus* (cuerpo o región media) y IV) la *cauda* (cola, región caudal o distal) (Robaire y Hinton, 2015; Roberts y Chauvin, 2018) (figura 1). Esta regionalización, radica en los cambios morfológicos 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 8 a 11 días (Robaire y Hinton, 2015). Gran parte de esta variabilidad se debe al tiempo necesario para atravesar la región de la *cauda*; se menciona que en la región proximal y media del epidídimo son las más activas en la maduración de los espermatozoides, y que la región caudal es donde los espermatozoides son almacenados previos a la eyaculación, al respecto se ha hecho también el análisis de la expresión de genes a lo largo del órgano, y se ha observado que hay una cuidadosa regulación de manera región-específica, en la que muchos de los genes que son expresados en la región del *caput* del epidídimo, son regulados diferencialmente en las regiones del *corpus* y de la *cauda*, lo que da el sentido intuitivo de la función diferencial de cada región (Roberts y Chauvin, 2018). En la mayoría de las especies, el recorrido por el *caput* y el *corpus*, toma aproximadamente entre 1 a 3 días en cada una de las regiones. Se ha observado, que, entre el segmento inicial y la *cauda*, la altura del epitelio disminuye y a su vez la luz del túbulo se hace más amplia y está más llena de espermatozoides (Marengo, 2008).

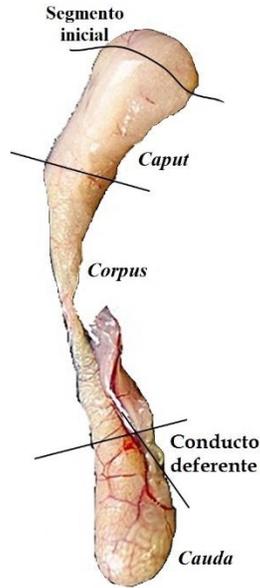


Figura 1. Estructura anatómica del epidídimo de rata. Las cuatro regiones del epidídimo: *caput*, *corpus* y *cauda*, son representadas, así como el segmento inicial. Las líneas indican el sitio donde las diferentes regiones son divididas (Reproducido de Hernández-Rodríguez *et al.*, 2019).

El epitelio que se encuentra recubriendo el túbulo epididimario en las diferentes regiones del órgano, está constituido por siete distintas poblaciones celulares, las cuales son: células principales, células claras, células basales, células apicales, células estrechas, células halo y células dendríticas (figura 2). Las células principales pueden representar hasta el 80 % del total de células epiteliales en cada una de las regiones, las células claras también se pueden encontrar en el *caput*, *corpus* y *cauda* del epidídimo, en cambio, las células apicales y estrechas están exclusivamente en el segmento inicial y región proximal, de diferente manera, las células basales, las células halo y las células dendríticas se localizan a lo largo de todo el túbulo (Robaire y Hinton, 2015; Sullivan y Belleannée, 2018). En general, las células del epitelio epididimario tienen una alta actividad metabólica, endocítica y secretora, la cual está regulada por la acción de andrógenos y estrógenos (James *et al.*, 2020).

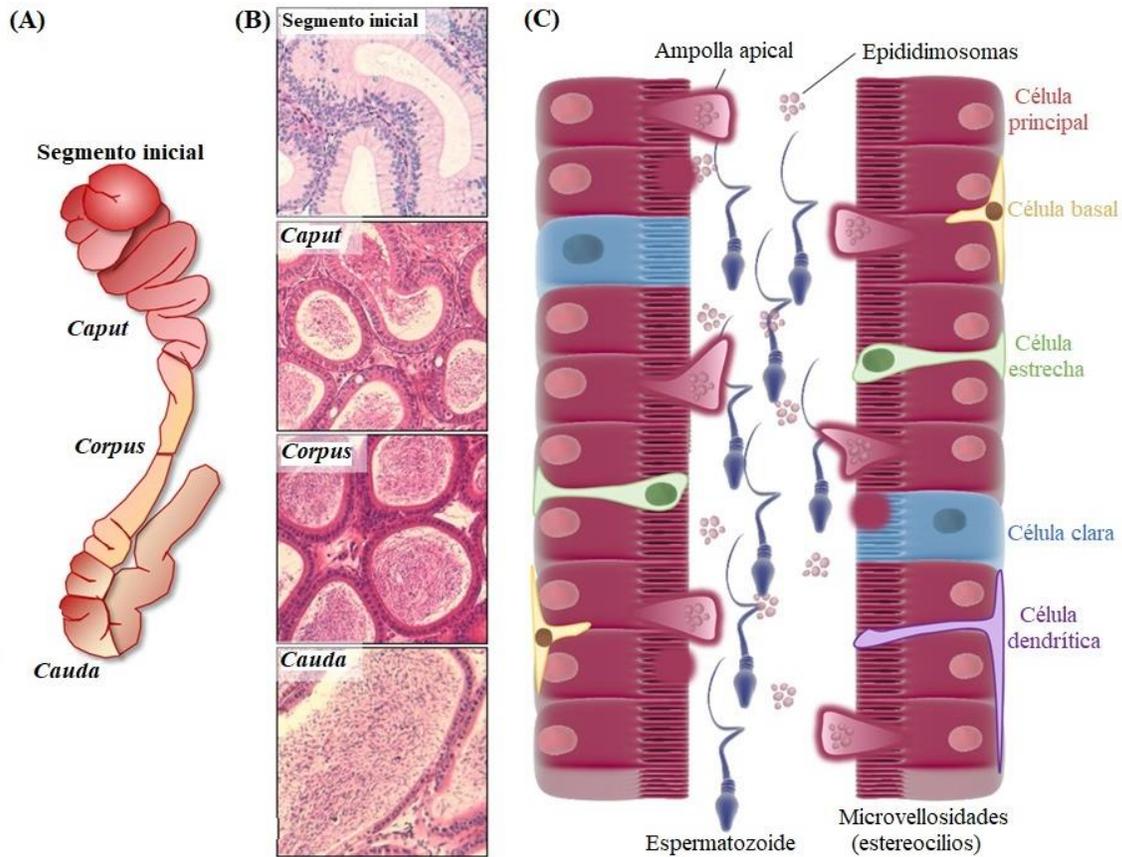


Figura 2. Esquema de la estructura (A), regionalización (B) y principales células del epidídimo (C). En la rata, el epidídimo se divide en cuatro regiones anatómicas: segmento inicial, *caput*, *corpus* y *cauda*. A lo largo del epitelio se encuentran diferentes células, incluyendo: principales, basales, estrechas, claras y dendríticas, que forman segmentos y microambientes especializados para la maduración de los espermatozoides, en este contexto, ocurre la formación y desprendimiento de estructuras similares a ampollas apicales en las células principales, y operan mediante secreción apocrina, para liberar una población heterogénea de vesículas membranosas, denominadas epididimosomas, implicadas en la comunicación intracelular con los espermatozoides (Adaptado de Zhou *et al.*, 2018).

2.1.1. Células principales

Son el tipo celular que se presenta con gran mayoría en el epitelio del epidídimo, se encuentran en todas las regiones epididimarias, dependiendo de la región, pueden abarcar aproximadamente el 80 % de la población total de las células epiteliales (regiones proximales) el 65 % en la región de la *cauda*. Son células que presentan una forma columnar con diferencias estructurales en cada región del epidídimo, y es el tipo celular que está más ampliamente estudiado; el polo apical de la membrana de las células forma microvellosidades prominentemente elongadas llamadas estereocilios, que se

extienden hacia la luz del túbulo para incrementar el área de la superficie para el intercambio entre las células epiteliales y el fluido epididimal. Sus núcleos son basales y están alineados (figuras 3 y 4), tienen como característica una maquinaria que es muy eficiente y está ampliamente desarrollada para poder cumplir con sus dos funciones: a) de secreción y b) endocítica, en ellas se incluyen a la participación del retículo endoplásmico, al aparato de Golgi y gránulos secretorios, así como pozos recubiertos, endosomas, cuerpos multivesiculares y lisosomas. Las células principales se especializan en la secreción de fluido, proceso que se encuentra ligado con los tres tipos de secreción que se han descrito en el epidídimo: (1) Secreción/reabsorción a través de transportadores, en la que las células del epiteliales expresan transportadores responsables de los cambios en la composición del fluido a lo largo del epidídimo, incluyendo a la concentración de agua, sodio (Na^+), cloro (Cl^-), bicarbonato (HCO_3^-), potasio (K^+) y de la acidificación luminal por medio de acuaporinas y de cationes de hidrogeno (H^+) (Robaire y Hinton, 2015; Park *et al.*, 2017). (2) Secreción merocrina, que asegura la secreción de diversas glicoproteínas producidas en el aparato de Golgi, este a su vez, consta de varios sáculos apilados, del cual se secretan, tanto vesículas secretoras de superficie lisa (150-300 nm) que entregan su contenido al lumen del epidídimo, pequeñas vesículas recubiertas (60-70 nm) que liberan su contenido lisosomal a cuerpos multivesiculares, y pequeñas vesículas descubiertas (60-70 nm) que pueden participar en la secreción merocrina, al fusionarse con la superficie apical de la célula. Es importante mencionar que diversos estudios de proteómica han demostrado que la secreción/reabsorción de proteínas es dinámica a lo largo del túbulo epididimario y, crea distintos microambientes en los que los espermatozoides adquieren secuencialmente sus habilidades fertilizantes, al respecto, las células principales 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 estar activamente secretadas en el compartimento luminal del epidídimo, controlando las concentraciones de proteínas (Zhou *et al.*, 2018), (3) Secreción apocrina, en la que la membrana apical de las células principales produce una gemación, que posteriormente es liberadas hacia el entorno intraluminal, en ella están contenidos orgánulos intracelulares seleccionados que liberan pequeñas vesículas membranosas denominadas epididimosomas, estas vesículas extracelulares desempeñan un papel importante en la transferencia de proteínas a la superficie del espermatozoide, incluidas las necesarias para la funcionalidad del espermatozoide en los procesos de fertilización, como pueden ser las que participan en el reconocimiento de la zona pelúcida del ovocito; evidencia muestra que los epididimosomas también transportan pequeños RNA no codificantes como un mecanismo de comunicación intercelular que puede modular la expresión génica a lo largo del epidídimo (Arrotéia *et al.*, 2012; Robaire y Hinton, 2015; Sullivan y Belleannée, 2018). Se ha observado que el complejo de uniones entre las células principales adyacentes permite por una parte la comunicación entre

células principales contiguas (uniones gap y adherentes) y por otra parte la formación de la barrera hematoepididimaria (uniones estrechas), la cual tiene un componente anatómico formado por el cinturón continuo de uniones alrededor de las células, sellando los espacios entre las células epiteliales, de modo que el compartimento luminal y los espacios intercelulares se convierten en compartimentos fisiológicos separados, además de prevenir la fuga del líquido luminal, aísla a los espermatozoides en el lado luminal para protegerlos del sistema inmunológico (componente inmunológico), los transportadores expresados en la membrana de las células epiteliales restringen y regulan el movimiento de moléculas dentro o fuera de la luz (componente fisiológico), creando así un microambiente adecuado para la maduración de los espermatozoides, la interacción de estos componentes es indispensable para que el epidídimo demuestre la máxima función para el mantenimiento y protección de los espermatozoides (Robaire y Hinton, 2015; Cyr *et al.*, 2018).

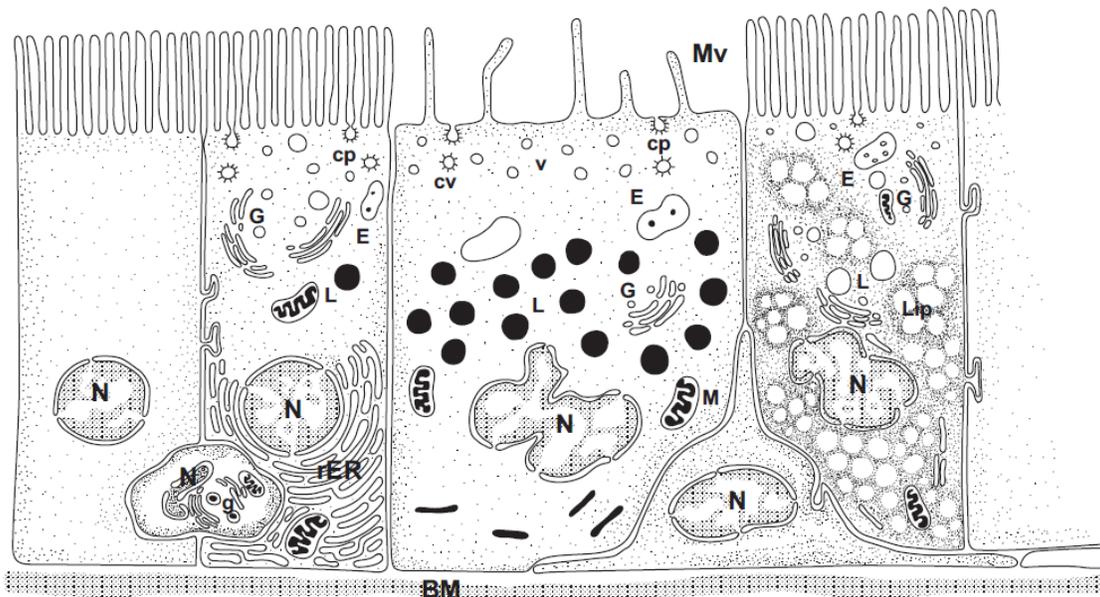


Figura 3. Representación esquemática de una célula principal en la región del *caput* del epidídimo (izquierda), y una célula principal en la región del *corpus* del epidídimo (derecha), divididas por una célula clara al centro, asimismo se presenta una célula halo y una célula basal. Las células principales 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 el *caput* del epidídimo, mientras que numerosas gotas de lípidos (lip) ocupan el citoplasma de la célula principal de la región del *corpus* del epidídimo. Las células claras muestran pocas microvellosidades (Mv) y numerosos cp, pequeñas vesículas apicales (v), E y L, todos involucrados en la endocitosis. La célula halo, se localiza insertada basalmente entre la célula principal adyacente, contiene pequeños núcleos granulares densos (g), mientras que la célula basal se

estrecha a sí misma a lo largo de la membrana basal (BM). Núcleo (N). (Reproducido de Robaire y Hinton, 2015).

2.1.2. Células claras

Este tipo celular es señalado como el segundo más abundante entre las células del epitelio epididimario, estando ampliamente distribuidas en la región del *caput* y *corpus*, pero es la región de la *cauda* la que muestra un mayor número de ellas. Estudios de microscopía electrónica han señalado que es distintivo que el dominio apical de las células claras está enriquecido con mitocondrias y repleto de aparatos endocíticos (pequeñas vesículas apicales, endosomas, pozos recubiertos, cuerpos multivesiculares y lisosomas, junto con algunas microvellosidades) debido a que están altamente involucradas en la endocitosis de las gotas citoplasmáticas que se desprenden de la población de espermatozoides en su tránsito a través del lumen del conducto epididimarios durante su maduración, así como del reciclaje de varios elementos presentes en el líquido luminal (Sullivan y Belleannée, 2018; Zhou *et al.*, 2018), entre ellos, estas células se encargan de endocitar diferentes proteínas (Arrotéia *et al.*, 2012; Robaire y Hinton, 2015), es importante mencionar que la actividad endocítica de las células claras es mucho mayor que en las células principales, y es una característica que se presenta mayormente en la región de la *cauda* del epidídimo. Este tipo celular se caracteriza por presentar en la región basal su núcleo y una cantidad variable de gotas de lípidos (figura 3). En conjunto con las células estrechas, las células claras participan en la acidificación del fluido luminal, se ha descrito que en su dominio apical poseen elementos clave de la maquinaria responsable de dicho proceso (V-ATPasa vacuolada, anhidrasa carbónica II y adenilato ciclasa soluble) necesarias para la regulación y el mantenimiento del 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; Zhou *et al.*, 2018).

2.1.3. Células basales

Son un tipo celular de apariencia hemisférica que se encuentra presente en todas las especies estudiadas a la fecha, incluyendo a humanos y roedores como la rata, asimismo, se han encontrado a lo largo de todas las regiones del túbulo epididimario interactuando directamente con las células principales y células claras a través de uniones gap, 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), salvo en algún proceso parecido a un mecanismo de muestreo de líquido epididimario, se ha establecido que este tipo celular se puede comunicar con el lumen mediante la

formación y proyección de extensiones dinámicas de citoplasma llamadas axiópodos; en un modelo de estudio *in vitro* se sugirió que las células basales podrían actuar como células madre multipotentes, con la capacidad de diferenciarse y potencialmente regenerar el epitelio del epidídimo, sin embargo, se ha observado que naturalmente este tipo celular al igual que las células principales no se dividen con gran rapidez en los adultos, por lo que su papel para reponer a otras células y actuar como células madres aún sigue sin ser considerado (Robaire y Hinton, 2015; Sullivan y Belleannée, 2018). Las células basales poseen en la membrana plasmática apical pozos recubiertos cuya función se ha ligado con el papel de ser receptores que median la endocitosis de factores derivados de la sangre y de las células principales, por otra parte, el citoplasma contienen una acumulación de gránulos y material de secreción dentro de sáculos de Golgi como parte de su función de secreción, los cuales pueden estar regulando alguna función de las células principales u otras funciones dentro del lumen que aún están por ser determinadas (Robaire y Hinton, 2015), lo que ha sido confirmado es su relación con la regulación de electrolitos y con la acidificación del pH del lumen, un proceso relacionado con la quiescencia y almacenamiento espermático que influye sobre el establecimiento de la fertilidad y la calidad espermática (Shum *et al.*, 2009). 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, por otro lado, se ha reportado la presencia de enzimas como superóxido dismutasa (SOD-Cu/Zn), glutatión-S-transferasa y metalotioneínas que están involucradas en la protección contra especies reactivas de oxígeno (EROs) (Arrotéia *et al.*, 2012; Sullivan y Belleannée, 2018).

2.1.4. Células apicales

Estas células forman cerca del 10 % de la población epitelial total en la región del segmento inicial, así como en la zona intermedia del epidídimo, pero llegan únicamente a representar el 1 % de la población celular total en la región de la *cauda* del epidídimo durante la edad adulta de la rata, sin embargo, se han visto ocasionalmente variaciones entre las regiones del epidídimo de ratas de edad avanzada. Son células que están claramente definidas por la gran cantidad de mitocondrias presentes en el citoplasma apical, además de mostrar un núcleo esférico que se ubica en el polo apical de la célula y por presentar pocas microvellosidades en el borde del lumen; hasta la fecha no se tiene evidencia de que estas células tengan contacto físico con la membrana basal del epitelio (figura 4). Se diferencian claramente de las células principales y estrechas adyacentes en función de su perfil de expresión de proteínas. Cuentan con la capacidad de endocitar sustancias desde el lumen, debido a que contienen muchas 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, Sullivan y Belleannée, 2018).

2.1.5. Células estrechas

En el epitelio del epidídimo de especies como la rata y el ratón adulto, las células estrechas son alargadas y delgadas, su presencia entre las regiones epididimarias suelen ser relativamente baja en número (Shum *et al.*, 2009), sólo están presentes en el epitelio del segmento inicial y zona intermedia (Zhou *et al.*, 2018), su población incrementa del 3 % en el segmento inicial, al 6 % de la población epitelial total en el *corpus*, suelen ser más estrechas que las células principales; se adelgazan y envían una proyección delgada de citoplasma que puede llegar a la membrana basal del epitelio, para poderse llevar a cabo un intercambio de moléculas. Estudios de microscopía electrónica demuestran que este tipo celular se caracteriza por poseer numerosas vesículas apicales en forma de copa, las cuales participan en la endocitosis (luego son recicladas en la membrana plasmática apical), estas células expresan las subunidades V-ATPasa de la bomba de protones que están involucradas en la secreción de H⁺ hacía el interior del lumen y en la acidificación del líquido epididimario en regiones proximales del epidídimo de roedores (Sullivan y Belleannée, 2018), presentan un pequeño núcleo aplanado, que se sitúa en la mitad superior del citoplasma de la célula (figura 4). 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 las 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).

2.1.6. Células halo

Son pequeñas células con un estrecho borde de citoplasma claro (figura 3), se encuentran presentes a lo largo de todo el epitelio del epidídimo, pero son más abundantes en las regiones proximales, se localizan normalmente en la base del epitelio, aunque no tocan la membrana basal, y contienen un número variable de gránulos nucleares densos (Arrotéia *et al.*, 2012; Sullivan y Belleannée, 2018). Las células halo han sido descritas incluso como linfocitos o monocitos, debido a que es difícil distinguir entre este tipo de células mediante microscopía de luz, debido a su similitud en tamaño y morfología nuclear. Las células halo en animales adultos jóvenes participan dentro del sistema inmune mediante su colaboración 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. Se ha descrito que, 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 inmunocompetente primaria en el epidídimo (Robaire y Hinton, 2015; Sullivan y Belleannée, 2018).

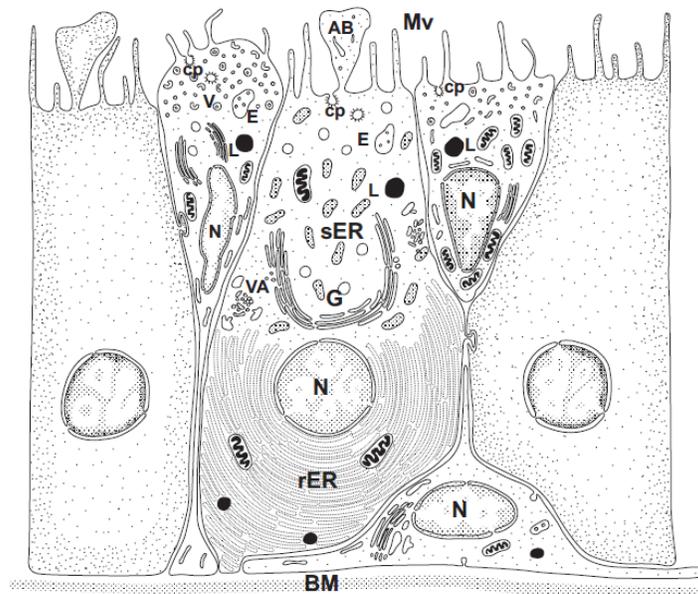


Figura 4. Representación esquemática de algunos tipos celulares encontrados en el epitelio del epidídimo. A la izquierda se representa una célula estrecha, en el centro se localiza una célula principal de apariencia columnar, cuyos organelos componen un aparato endocítico, con numerosas cisternas paralelas 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, este tipo celular muestra ampollas de citoplasma que emanan hacia la superficie apical de la célula, 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, mientras que una célula apical se puede diferenciar por la presencia de un núcleo (N) ovoide y por no tener contacto con la membrana basal. Microvellosidades (Mv), vesículas apicales en forma de copa (v), pozos recubiertos (cp), endosomas (E), lisosomas (L) (Reproducido de Robaire y Hinton, 2015).

2.1.7. Células dendríticas

Mediante estudios en los que se han empleado marcadores específicos para células inmunes, se ha demostrado la presencia de células dendríticas en el epitelio epididimario. Este tipo celular tiene

como característica ser presentadoras de antígenos especializadas con la capacidad de ser reguladores claves de las respuestas inmunitarias en otros tejidos. Aunque con anterioridad se negaba la presencia de este tipo celular en el epidídimo, actualmente se ha indicado que existen extensas redes de células dendríticas a lo largo de dicho órgano, las cuales rodean la base del epitelio y extienden dendritas largas y estrechas entre las células epiteliales hacia la luz del túbulo en las regiones epididimarias proximales, se caracterizan por tener fuertes propiedades de presentación de antígenos y muestran un aumento significativo en condiciones de inflamación; las células basales poseen características estructurales similares con las células dendríticas, sin embargo, estas dos poblaciones son distintas en términos de la expresión de marcadores de proteínas, por lo que se plantea que desempeñan funciones distintas en el epidídimo, así mismo, es probable que las células dendríticas interactúen tanto con las células halo como con el sistema linfático para servir en la monitorización inmunitaria del epidídimo (Robaire y Hinton, 2015; Sullivan y Belleannée, 2018).

De manera coordinada, todas las células epiteliales que recubren al conducto del epidídimo establecen un entorno luminal fluido, mediante la secreción activa y la absorción de macromoléculas (proteínas, glicoproteínas) que son sintetizadas tras la expresión de diferentes genes, además de pequeñas moléculas (azúcares, electrolitos) que unidas a los compuestos derivados de los testículos, proporcionan un ambiente óptimo para que se modifiquen a los espermatozoides que recorren el conducto epididimario al estar en contacto directo con el microambiente luminal, como un requisito del proceso de maduración (Tulsiani, 2006; Robaire y Hinton, 2015), aunado a que son las responsables de eliminar residuos citoplasmáticos y de proteger a los espermatozoides, gracias a la formación de una barrera anatómica e inmunológica durante el recorrido que realizan por el túbulo epididimario, al igual que cuando se encuentran almacenados (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2016).

2.2. Función del epidídimo

Tras la formación de los espermatozoides en el epitelio de los túbulos seminíferos, y la posterior liberación de los mismos durante el proceso de espermiación, los gametos abandonan el testículo para dirigirse hacia la región del *caput* y luego a la del *corpus* para llevar a cabo su maduración, antes de ser reunidos y almacenados en la región de la *cauda* (Robaire y Hinton, 2015), para que estos procesos puedan ocurrir, a su vez es necesario que el epidídimo desempeñe ciertas funciones importantes: I) Mantener la concentración espermática: el principal proceso que ocurre en el segmento inicial es la absorción del fluido testicular que acompaña a los espermatozoides, por las células epiteliales presentes en esta región, se ha reportado que los conductos eferentes y el segmento inicial son responsables de absorber aproximadamente el 90 % del líquido que sale de la *rete testis*, y

el resto se absorbe durante el tránsito por las demás regiones del epidídimo, este proceso da como resultado un incremento en la concentración de espermatozoides que es ampliamente significativa en la región de la *cauda* en comparación con la *rete testis*; este incremento a su vez es necesario para mantener la concentración de espermatozoides presentes en el semen, un factor de gran importancia para la fertilidad masculina (James *et al.*, 2020). II). Transporte de espermatozoides: desde la *rete testis* hasta el conducto deferente (James *et al.*, 2020). Varios métodos han sido empleados para medir la duración de este tránsito, entre ellos la incorporación de isotopos al DNA de células germinales y haciendo el seguimiento de la progresión de los espermatozoides por el epidídimo, de esta manera se ha estimado el tiempo mínimo necesario, el tiempo de tránsito total y a través de cada región del epidídimo, se ha determinado que el tiempo mínimo que requieren los espermatozoides para atravesar el epidídimo es de aproximadamente 10 días; así mismo, se ha observado que la progresión de los espermatozoides marcados entre la región del *caput* y del *corpus* es similar entre todas las especies estudiadas, y la mayor diferencia entre las especies radica en el tiempo que les toma transitar a través de la *cauda* (Robaire y Hinton, 2015). Los espermatozoides entran al epidídimo impulsados por el fluido testicular y posiblemente por el batido de las células ciliadas en los conductos eferentes, sin embargo, en el segmento inicial se reduce drásticamente el flujo del fluido, por lo que el transporte de los espermatozoides queda a cargo del epidídimo. El mecanismo responsable de conducir el contenido a través de la luz del epidídimo se atribuye principalmente a las contracciones musculares rítmicas del musculo liso que rodea al túbulo, mientras que las contracciones ocurren con mayor frecuencia en la región del *caput*, se presentan con mayor amplitud en la región de la *cauda* (James *et al.*, 2020). Las contracciones del musculo liso del túbulo epididimario están influenciadas por factores hormonales y neuronales, al respecto, se ha reportado que los andrógenos y estrógenos pueden controlar la contractilidad del túbulo, al igual que péptidos neuronales como oxitocina, vasopresina y endotelina, mediante sus receptores presentes en el epitelio del epidídimo, lo que resulta en un incremento del número de espermatozoides transportados entre las regiones, así como en la cantidad de eyaculados (Robaire y Hinton, 2015). III) Proteger y almacenar a los espermatozoides: una gran labor por parte del epidídimo es la de proporcionar una protección a los espermatozoides del posible daño causado por el entorno externo durante su tránsito, para ello, en este órgano se han desarrollado varios mecanismos de defensa, debido también a que las células del epitelio epididimario tienen una alta actividad metabólica que da como resultado la generación de EROs que son dañinas para los espermatozoides, para combatir este problema, las células epiteliales producen y liberan varias enzimas antioxidantes, incluida la superóxido dismutasa, hacia la luz del epidídimo, y con ellas se puedan neutralizar a las EROs, además de formar a la barrera hematoepididimaria, para proteger a los espermatozoides maduros del sistema inmunológico y de las sustancias nocivas que puedan existir

en el torrente sanguíneo, por otra parte, la región de la *cauda* funciona como un lugar de almacenamiento para los espermatozoides funcionalmente maduros antes de la eyaculación, de acuerdo con cada especie, se ha reportado que entre el 50 y el 80 % de los espermatozoides presentes en la luz del epidídimo se localizan en la región de la *cauda*, para ello, las células epiteliales de esta región, secretan tanto factores que participan en la regulación del pH luminal así como proteínas y enzimas específicas que ayudan a mantener un entorno luminal funcional, que permite mantener a los espermatozoides en un estado inactivo durante el almacenamiento (James *et al.*, 2020)

2.3. Maduración espermática epididimaria

En los mamíferos la producción exitosa y funcional de los gametos masculinos no solamente comprende la correcta transformación de espermatogonias a espermatozoides dentro del epitelio testicular, sino que los espermatozoides liberados requieren de una serie de cambios post-gonadales que son facilitados por los microambientes especializados que se presentan secuencialmente a lo largo del lumen del conducto epididimario (Dacheux y Dacheux, 2013). Los cambios que ocurren en los espermatozoides, se ha indicado que ocurren mayormente en las dos primeras regiones del epidídimo, culminado antes de su almacenamiento en la región caudal (Robaire y Hinton, 2015).

2.3.1. Cambios para la maduración del espermatozoide en el epidídimo

Los primeros investigadores plantearon la hipótesis de que la maduración del espermatozoide era una propiedad inherente de estas células y que era dependiente únicamente de la cantidad adecuada de tiempo que permanecían en el epidídimo. Ahora se sabe que los espermatozoides deben interactuar con una diversidad de sustancias propias de las diferentes regiones del epidídimo, para adquirir la capacidad fertilizante y el éxito reproductivo tras el apareamiento natural (James *et al.*, 2020). Esto, se logra mediante diversos mecanismos que causan varias modificaciones, tanto en el batido flagelar, como en la superficie del espermatozoide, los cuales permiten la adquisición de las propiedades necesarias para encontrar y penetrar de manera eficiente las capas que envuelven al ovocito (como la zona pelúcida), y que generan que haya un aumento en la carga negativa total de la superficie, ocurran modificaciones en las propiedades de unión a lectinas, cambios en la composición de lípidos de la membrana, remodelación de micro dominios de balsas de membrana así como de otras moléculas, entre ellas algunas proteínas, glicoproteínas, y la relocalización de antígenos de superficie (Sullivan y Mieusset, 2016), todos estos cambios implican interacciones complejas entre las secreciones del epidídimo y los gametos masculinos, aunado a que, durante el tránsito de los espermatozoides, las regiones del epidídimo también deben proporcionar: aireación, alimentación, eliminación de residuos y una protección física-bioquímica de los gametos.

2.3.1.1 Cambios bioquímicos

Dado 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 que está expuesta directamente al fluido epididimario se modifica constantemente a medida que la célula espermática pasa a través de las distintas regiones de este órgano. La glicosilación es una de las modificaciones postranscripcionales en las glicoproteínas presentes en la membrana del espermatozoide, se puede definir desde un punto de vista químico como la reacción de grupos amino primarios con el grupo carbonilo de los azúcares reductores para formar enlaces azúcar-proteína (Spiro, 2002), estas modificaciones ocurren mientras se desplazan los espermatozoides de la región del *caput* a la región de la *cauda* del epidídimo. Dos conjuntos de enzimas realizan las modificaciones en las glicoproteínas: (1) glicohidrolasas, una clase de enzimas hidrolíticas que separan residuos de azúcar de glicoconjugados existentes, es decir, que catalizan la eliminación de residuos del azúcar terminal de la porción de glicanos de glicoproteínas y glicolípidos, el mecanismo de acción de las glicohidrolasas se da a partir de dos restos de ácido carboxílico en el sitio activo: uno ionizado y otro protonado, el primer resto estabiliza al ion oxocarbonio resultante y el segundo facilita la salida del grupo de escisión, estas exoenzimas reciben su nombre con base a su azúcar específico, así una α -glucosidasa hidrolizará solo a restos glucosil α -enlazados mientras que una α -manosidasa solo separará a residuos manosil α -enlazados (Tulsiani, 2006), y (2) glicosiltransferasas, una clase de enzimas sintéticas que modifican a las glicoproteínas y glicolípidos existentes al agregar residuos de un azúcar donante (azúcar nucleótido) a los sitios aceptores de las moléculas existentes, la actividad catalítica de estas enzimas se centra en la capacidad de poder transferir residuos de un azúcar al sitio aceptor en los glicolípidos así como en aminoácidos presente en las glicoproteínas, en estas últimas el tipo de unión que se presenta puede ser de dos formas: O- y N-glicano (Tulsiani, 2006), dependiendo si el aminoácido contiene un grupo funcional hidroxilo o no, respectivamente (Spiro, 2002). este tipos de enzimas están presentes en altas concentraciones en el fluido luminal del epidídimo que rodea a los espermatozoides, de manera que son las que modifican a los glicoconjugados de la superficie del espermatozoide, la actividad de estas enzimas la ejemplifica Tulsiani (2006) con los cambios observados en los residuos de galactosil de la N-acetil- β 1,3-galactosamina los cuales se pueden localizar en la membrana plasmática de espermatozoides del *caput*, pero no en la membrana plasmática de espermatozoides de la *cauda*, por lo que se han postulado dos posibles explicaciones, la primera indica que la aparente pérdida de los residuos de galactosil puede deberse a su eliminación por parte de β -D-galactosidasas, o en un segundo caso por el enmascaramiento de dichos residuos por la adición de otros residuos de azúcares con la ayuda de otras glicosiltransferasas del fluido luminal.

La importancia de los cambios en la superficie celular del espermatozoide durante el proceso de maduración ha sido bien documentada, y ha permitido relacionar la adquisición de la capacidad fertilizante del espermatozoide con dichas modificaciones, estos cambios son imprescindibles para que ocurran los posteriores, una vez que la célula espermática sea depositada en el tracto reproductor femenino (Tulsiani, 2006; Chandra *et al.*, 2008; Toyonaga, Kaihara y Tsutsui, 2011).

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 entre un carbohidrato con una proteína y con un ácido graso, estas porciones de carbohidratos pueden ser reconocidas específicamente por lectinas, término que define 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 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 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.

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).

Tabla 1. 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		
Fucosa	<i>Ulex europaeus</i>	UEA
	<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).

Gran parte del conocimiento actual sobre los cambios en los glicoconjugados de la superficie del espermatozoide proviene de estudios de su unión a una lectina, se ha reportado que lectinas como: *Canavalia ensiformis* aglutinina (Concanavalina A, Con A), que se une a residuos de manosa, un carbohidrato que conforman de manera permanente la membrana de los espermatozoides y confiere amplia flexibilidad en la membrana, la cual es de vital importancia para la movilidad (Aliabadi *et al.*, 2013). *Triticum vulgare* aglutinina (WGA), detecta residuos de N-acetilglucosamina y/o de ácido siálico (ácido N-acetil-neuraminico (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, 2011), 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 otros investigadores, que es en la cabeza del espermatozoides donde se encuentran los valores más altos de unión entre el ácido siálico y la membrana plasmática, en comparación al caso del flagelo, donde los valores de la unión de mismo carbohidrato a esta región del espermatozoide, son más bajos, y conforme los espermatozoides son transportados hacia la región distal del epidídimo, los valores en

el flagelo continúan disminuyendo, por lo que es posible que la unión del ácido siálico a la membrana pueda ser un indicador relevante y estar relacionada a la maduración espermática en la rata (Hall y Killian, 1987) y posteriormente con la unión del espermatozoide al ovocito.

Ulex europaeus aglutinina (UEA) que reconoce residuos de fucosa, su 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, 2011), 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 (Igotz *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 *cauda* al hacer una comparación con la región del *caput*.

Los cambios que ocurren durante el proceso de maduración espermática en la composición 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 *cauda* que en los del *caput* del epidídimo. Otros residuos de carbohidratos, como la α -D-glucosa y manosa se presentan en mayor proporción en las membranas de los espermatozoides del *caput* y de la *cauda*, pero, en muy baja cantidad en las de las células del *corpus* epididimario. En relación con el contenido de manosa en la membrana plasmática, se ha descrito que se establecen diferencias de la región del *caput* hacia la *cauda*, que tienen relación con el grado de maduración de los espermatozoides, por lo que la distribución de carbohidratos de membrana puede ser considerada como parte del proceso de maduración espermática epididimaria (Rodríguez Tobón *et al.*, 2021).

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 la DHT por la enzima esteroide 5α -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 para andrógenos (ERA), 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 5α -reducida en las células epiteliales a DHT, sino que también suele ser aromatizada en estas células al E_2 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 necesarias 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).

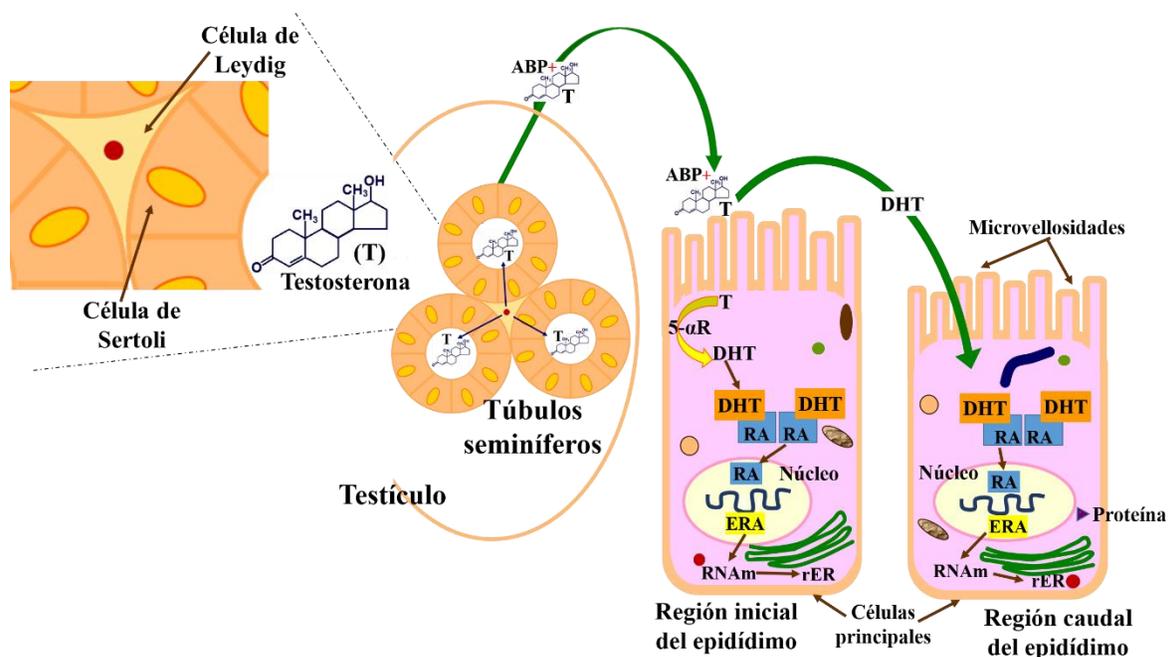


Figura 5. Regulación hormonal del epidídimo por la T. La T se puede metabolizar a DHT por la acción de la enzima 5α reductasa ($5\alpha R$) y ejercer su acción a través del RA intracelular. Este a su vez actúa como factor de transcripción receptor-ligando y se une como un homodímero a los elementos de respuesta para andrógenos (ERA) para que se lleve a cabo la síntesis de proteínas para el mantenimiento y función del epidídimo. Proteína unidora de andrógenos (ABP), retículo endoplásmico rugoso (rER), RNA mensajero (RNAm) (Adaptado de Hernández-Rodríguez *et al.*, 2016).

2.5. Parámetros de calidad espermática

Una vez que los espermatozoides han adquirido la maduración espermática y han sido almacenados en la *cauda* 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 (2021), y con el establecimiento del manual que sirve de guía en los laboratorios de andrología, es posible analizar la calidad espermática, en humanos, 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.
 - La viscosidad: Si la muestra es muy viscosa puede deberse a una disfunción prostática.
 - El 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.
 - El 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.
 - El pH: El valor debe encontrarse por encima de 7.1. Valores inferiores podrían indicar azoospermia (ausencia de espermatozoides) o procesos inflamatorios crónicos.
 - La 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.
 - La 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.
 - La 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.

2.5.1. 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 (WHO, 2021), 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 espermatozoides inmóviles muertos y 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 (WHO, 2021).

2.5.2. Concentración espermática

Como parte de una de las pruebas básicas del análisis espermático se tiene que realizar el conteo del número de espermatozoides que existe 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 una cámara de conteo. 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.

2.6. infertilidad masculina

Entre los agentes ambientales asociados con la infertilidad masculina, se encuentran los metales pesados; como el Cd (Wijesekara *et al.*, 2015; Hussein *et al.*, 2020). El Cd es uno de los agentes tóxicos con mayor presencia en el ambiente, es utilizado ampliamente para proteger contra la corrosión de metales como el hierro y el acero, se utiliza como sulfito de Cd y selenito de Cd en la

fabricación de pinturas para colorear cerámicas y plásticos. También se requiere en la fabricación de baterías de hidróxido de níquel-Cd para la industria automotriz. En la agricultura forma parte de fertilizantes fosforados y pesticidas (Cichy, Jaroszek y Pasezek, 2014), incluso compuestos de Cd son vertidos a las aguas, depositándose en los ríos y lagos llegando a los alimentos a través de las aguas de riego. Es así como el Cd puede entrar en contacto con los alimentos, pues se bioacumula, es decir este metal no puede salir del organismo (Tbeileh *et al.*, 2007; Saeed, 2013), presentándose en peces y otras especies marinas de consumo humano. Otro factor importante de exposición al Cd es el humo del tabaco, para personas fumadoras como no fumadoras (Ashraf, 2012). De acuerdo con la NOM-009-SSA1-1993 y la *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR, 2012) las concentraciones de Cd a las que el ser humano puede exponerse son de 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 son: el agua potable, los alimentos y el aire, además de la exposición ocupacional al Cd en diversas áreas de trabajo, como es el caso de las industrias mineras, automotriz y textil (Siu *et al.*, 2009).

2.6.1. Efectos del Cd sobre la fertilidad masculina

El Cd actúa en el eje HHG y ejerce efectos no deseables en los tres niveles, provocando una disminución en la concentración de T, por efecto de una disminución en la actividad de las enzimas esteroidogénicas testiculares: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD), enzimas claves en la biosíntesis de T, además de que el Cd reduce significativamente el número de las células de Leydig (Ji *et al.*, 2010), donde se lleva a cabo la síntesis de este andrógeno. La disminución en la concentración de T causada por la intoxicación con Cd, no sólo afecta la función testicular que puede alterar la espermatogénesis (Järup y Akesson, 2009; Lafuente, 2013), sino que también disminuye el peso de otros órganos dependientes de andrógenos como el epidídimo (Robaire y Hamzeh, 2011). Sin embargo, en el epidídimo, no se conocen los efectos que provoca el Cd en los procesos de maduración espermática y la adquisición de la capacidad fertilizante. A la fecha, la mayoría de investigaciones que estudian los efectos del Cd en los espermatozoides, son realizadas en muestras de eyaculado de humanos y roedores, en la mayoría de estos estudios hay una disminución en la concentración, movilidad y viabilidad espermática (Järup, 2003; Haouem *et al.*, 2008; ATSDR, 2012). Se ha reportado que la concentración de Cd en 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 por la reducción de la calidad espermática (Pant *et al.*, 2003), así como el incremento de

anormalidades morfológicas en los espermatozoides, que afectan al movimiento progresivo, reconocimiento y fertilización del ovocito, además se ha demostrado que el Cd provoca una reacción acrosomal prematura (Oliveira *et al.*, 2009), a través de las EROs, que pueden causar lipoperoxidación de las membranas, lo que se ha correlacionado con azoospermia en varones infértiles (Akinloye *et al.*, 2006). Por otro lado, el Cd, causa daño al DNA de los espermatozoides (Xu *et al.*, 2003), pues incrementa su fragmentación y descompactación.

De hecho, la exposición a Cd y la disminución de T puede afectar el desempeño del epidídimo, a través de las células epiteliales que rodean a los espermatozoides, por modificación de la expresión y secreción de proteínas relacionadas con la maduración, y el almacenamiento de los espermatozoides (O'Hara *et al.*, 2011; Kerkhofs *et al.*, 2012).

En la rata Wistar la administración de cloruro de cadmio (CdCl₂) en una sola dosis (1.1, 1.4 y 1.8 mg/kg), se ha correlacionado con una disminución en la presencia de espermatozoides en la región del segmento inicial, *caput* y *cauda* del epidídimo, junto con un aumento en el espesor del epitelio en el *caput* del epidídimo, sugiriéndose que este efecto se debe a una incapacidad en la resorción del fluido luminal (Ribeiro, 2013), así mismo, la exposición a Cd disminuye la concentración y movilidad de los espermatozoides del epidídimo (Benoff *et al.*, 2009), sin embargo, la administración paralela de antioxidante como el azafrán (*Crocus sativus* L.) evita los efectos tóxicos del Cd en los espermatozoides (Asadi *et al.*, 2013).

2.6.2. 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 paracrinos 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 la detención de la fase G2/M en la meiosis, inhibe la espermiación, induce además la apoptosis en células espermatogénicas (Jenardhanan *et al.*, 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 anormalidades morfológicas (Asadi *et al.*, 2013; Adamkovicova *et al.*, 2016).

2.6.3. 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).

2.7. Efectos del Cd 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 el porcentaje de los espermatozoides vivos (Järup, 2003; Haouem *et al.*, 2008; ATSDR, 2012). También se sabe, que el Cd causa un alto número de anormalidades morfológicas a lo largo de todo el espermatozoide, que afectan su movimiento progresivo, y comprometen la posibilidad de que ocurra el reconocimiento y fertilización del ovocito, en conjunto a las afectaciones al material genético que transportan (Taha *et al.*, 2013), a través de las EROs, que pueden causar lipoperoxidación 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 los puentes disulfuros (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 *et al.*, 2015). Estas alteraciones también se han asociado con la infertilidad. Sin embargo, en estudios con exposición de espermatozoides a CdCl₂ *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 *et al.*, 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 CdCl₂ (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, el *caput* y la *cauda* 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 en el *caput* del epidídimo de los animales tratados con 1.1 y 1.4 mg/kg de Cd, sugiriéndose que este efecto se debe probablemente a una desestabilización de las membranas de las células principales que reduce la actividad celular y la incapacidad de reabsorber el fluido luminal. Con respecto a la luz del túbulo, se observó que, en la región de la *cauda*, 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, es necesario 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, cuya importancia radica en el papel que tienen dentro de tracto reproductor femenino, en procesos relacionados con la capacitación y reacción acrosomal, así como en el reconocimiento entre gametos y en la fecundación del ovocito (Cheon y Kim, 2015).

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo afecta la exposición de Cd a la maduración epididimaria de los espermatozoides de la rata Wistar?

HIPÓTESIS

El Cd causa alteraciones en el epitelio epididimario que repercuten en los parámetros espermáticos, por lo tanto, el Cd afectará la maduración epididimaria de los espermatozoides al modificar la glicosilación de la membrana plasmática de espermatozoides de la rata Wistar.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos a la exposición de Cd en la maduración epididimaria de espermatozoides en la rata Wistar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la bioacumulación de Cd por la exposición a diferentes dosis en las tres regiones del epidídimo: *caput*, *corpus* y *cauda*.
2. Determinar si el Cd altera la distribución y concentración de los residuos de carbohidratos: N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa presentes en los espermatozoides del *caput*, *corpus* y *cauda* del epidídimo.
3. Analizar e identificar el efecto del Cd en el epitelio del *caput*, *corpus* y *cauda* del epidídimo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Animales

Se utilizaron cuatro ratas Wistar preñadas provenientes de la UMADI de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I), para la obtención de crías machos. El día del nacimiento se consideró como el DPN 1. Los machos se distribuyeron aleatoriamente y las camadas se ajustaron a 6 crías por madre. Se formaron 4 grupos experimentales con 6 ratas macho cada uno, y se les asignó a un tratamiento, los animales de los grupos I, II y III fueron administrados con CdCl₂ vía intraperitoneal (i.p.), en una dosis de 0.125, 0.25 y 0.5 mg/kg de peso corporal, disueltos en 100 µL de solución salina normal estéril. A los animales del grupo IV o control (Ctrl) se le administró el vehículo de administración (100 µL de solución salina normal estéril). Todos los animales fueron tratados diariamente con el CdCl₂ o el vehículo del 1 al 49 DPN. Se estableció este periodo de administración debido a que comprende el tiempo en que el epitelio del epidídimo de la rata lleva a cabo su diferenciación celular (Robaire and Hinton, 2015). Todos los machos fueron destetados a los 21 DPN (aprox. 50 g de peso corporal) y permanecieron alojados en grupos de n = 6 cada uno, de acuerdo con su tratamiento. Todo el tiempo los animales se mantuvieron en condiciones estándar, en un ciclo de luz y oscuridad controlado de 12 a 12 h (luces encendidas a las 20:00 h, apagadas a las 8:00 h), con acceso *ad libitum* a agua y alimentos. Todos los experimentos se realizaron bajo estricta conformidad con la Guía del Instituto Nacional de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH, 2011), 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-I y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

3.2. Procedimiento experimental

Cuando los animales cumplieron los 90 DPN, se les practicó eutanasia por decapitación, bajo anestesia profunda. La sangre periférica del cuerpo fue recolectada en dos tubos Vacutainer. La sangre del tubo Vacutainer con K2-EDTA, se utilizó para cuantificar la concentración de Cd por espectrofotometría de absorción atómica. El segundo tubo Vacutainer que contenía un gel de separación, se centrifugó para separar a la sangre en sus componentes, se recuperó el suero para determinar la concentración de T por Radio Inmuno Análisis (RIA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La disección bilateral de los epidídimos se realizó inmediatamente después de la eutanasia, y fueron seccionados en sus tres regiones anatómicas de estudio: *caput*, *corpus* y *cauda*. De cada región del epidídimo derecho se obtuvieron 100 mg de tejido que se utilizaron para cuantificar la concentración de Cd por espectrofotometría de absorción atómica y para obtener las muestras de tejido que fueron fijadas en solución Karnovsky para el posterior análisis histológico. De

las secciones del epidídimo izquierdo se obtuvieron a los espermatozoides para el análisis de la evaluación espermática, así como para la identificación de los patrones de distribución de los carbohidratos N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa por medio de microscopia de epifluorescencia y para la obtención del índice de fluorescencia mediante el marcaje con lectinas específicas conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a partir de los histogramas de intensidad de fluorescencia contra el número de células marcadas obtenidos en un citómetro de flujo.

3.3. Determinación de la concentración de Cd en sangre y epidídimo

Se obtuvieron muestras de 3 mL de sangre periférica en tubos libres de metales, y secciones de tejido de aproximadamente 100 mg, de cada una de las regiones del epidídimo, de cada uno de los machos de los 4 grupos experimentales. Las muestras de sangre se mantuvieron en refrigeración a 4 °C y las muestras de los tejidos de epidídimo se mantuvieron en congelación en tubos de polipropileno a -20 °C, hasta que fueron procesadas y analizadas. 200 µL de cada muestra de sangre se digirieron en 800 µL de una mezcla de ácidos compuesta por ácido nítrico, perclórico y sulfúrico, en proporciones de 5:2:1, las muestras de tejido de cada una de las regiones del epidídimo se digirieron en 500 µL de ácido nítrico concentrado (Suprapure, Merck, Edo. de Mex), en ambos casos se dejaron en digestión por 7 días. Después de la digestión total, la solución resultante fue analizada en un espectrofotómetro de absorción atómica modelo AA analyst 600, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA, con horno de grafito y un auto-muestreador (AS 800, Perkin Elmer), con una lámpara específica para Cd (*hollow cathode lamp*) y ajustando a una longitud de onda de 228.8 nanómetros (nm). En cada análisis, se utilizó una curva de calibración construida con valores conocidos (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 µg/L), usando una solución comercial para certificar las concentraciones de Cd (GFAA *Stock mixed standard*; Perkin-Elmer). Se aseguró el control de calidad de las muestras, con una solución estándar de hígado bovino (NIST 1577b), previamente digerida por el mismo procedimiento que las muestras. Para optimizar y validar las mediciones, este material certificado fue analizado al inicio y final de cada análisis. La cuantificación de Cd en sangre se expresó en µg de Cd/mL, y la cuantificación de Cd en epidídimo se expresó en µg de Cd/g. Previo a cada análisis, la cristalería se limpió con ácido nítrico al 3 % y se enjuagó varias veces con agua desionizada (Galicia-García *et al.*, 1997).

3.4. Concentración de T en suero sanguíneo

La concentración de T fue medida por medio de la técnica de RIA, usando el kit *Coat-A-Count® Total Testosterone* PITKTT-8 kit (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc., Los Ángeles, CA), el cual tiene un límite de detección de 4 ng/dL. Este kit ha sido validado previamente en modelo de roedores (ratón, rata) por el *Ligand Assay and Core Analysis at the Center for Research in*

Reproduction at the University of Virginia (Charlottesville, VA), como fue descrito por Pirard *et al.* (2018). El anticuerpo para T usado tiene una reactividad cruzada de 3.3 % con DHT, 0.5 % con otros andrógenos, 0.01 % con glucocorticoides, y 0.02 % con E₂. Los promedios de los coeficientes de variación (CV) inter- e intra- análisis fueron calculados en un grupo de siete muestras estándar con un rango de 0.2-8 ng/mL, los cuales son los valores normales de T en el plasma sanguíneo de ratas adultas macho. Los valores de la media inter- e intra- análisis de los CV fue de 7.9 y 8.6 %, respectivamente. El análisis de las muestras fue realizado por duplicado usando un contador gamma, siguiendo las instrucciones del fabricante, los resultados también fueron estimados siguiendo sus especificaciones.

3.5. Disección del epidídimo y recuperación de espermatozoides

Todos los procedimientos fueron realizados a 36 °C. La disección, eliminación de tejido adiposo y conectivo de los epidídimos, así como la división en las regiones del *caput*, *corpus* y *cauda*, fue realizada de acuerdo con el procedimiento descrito por Arenas-Ríos *et al.* (2005) y Cervantes *et al.* (2008). En tubos de microcentrífuga de 2 mL se colocaron por separado cada una de las regiones del epidídimo en 500 µL de solución Ringer a 36 °C y se realizó un fino picado del tejido con tijeras y se dejó en agitación suave, para favorecer la salida de los espermatozoides del tubo epididimario. Posteriormente, la suspensión celular se recolectó con una pipeta Pasteur y se filtró a través de una malla de lycra (98 % nylon/poliamida, 2 % Lycra/elastano) con un diámetro de trama de 20 µm, el filtrado se recolecto por separado en tubos de microcentrífuga de 2 mL que se mantuvieron a 36 °C. Los espermatozoides en suspensión se lavaron dos veces por centrifugación a 500 g por 5 minutos. Al final de cada lavado se eliminó el sobrenadante y el botón de espermatozoides fue re-suspendido en 1000 µL de solución Ringer. Al término de los lavados, la suspensión final de espermatozoides de cada región del epidídimo fue considerada para realizar la evaluación espermática, por lo que los valores reportados en esta investigación fueron expresados con respecto al total de espermatozoides presentes en un mL de solución Ringer.

3.6. Evaluación histológica del epidídimo

Las muestras de tejido de las tres regiones del epidídimo derecho fueron fijadas en solución de Karnovsky modificado por 24 h, posteriormente se fijaron con OsO₄ al 1% y se procesaron para su inclusión en EPON 812 (Ted Pella, Inc., Redding, CA, USA). Se obtuvieron secciones semifinas de las muestras procesadas de 1 µm de espesor con un ultra micrótomo Leica UCT (Leica, Viena, Austria) y se tiñeron con azul de toluidina (Sigma-Aldrich, México) al 5% y se montaron en portaobjetos. El análisis histológico fue realizado por un solo observador con un microscopio óptico

Olympus BX 51 (Tokio, Japón). Para cada uno de los cuatro grupos, se analizaron 30 regiones del epitelio epididimario. La longitud del epitelio y el área de las células principales (dado que es el tipo celular que predomina en las tres regiones del epidídimo) se determinaron utilizando el programa Image-Pro® Plus (versión 5.1. *Media Cybernetics*, INC. MD, USA).

3.7. Evaluación espermática

Al inicio de cada análisis, se realizó la evaluación espermática de cada una de las regiones del epidídimo por un solo observador. Para establecer el número de espermatozoides en millones por mL (10^6 /mL) (concentración espermática), se tomaron dos alícuotas de 10 μ L de la dilución de cada una de las muestras de espermatozoides, se colocaron en cada uno de los lados de la cámara de Neubauer (hemocitómetro), y fueron observados con un objetivo a 40X, se contaron los espermatozoides de cinco cuadrados específicos. El porcentaje de espermatozoides vivos (vitalidad espermática) en cada una de las muestras de las tres regiones del epidídimo, se evaluó con la tinción de eosina-nigrosina, para ello, se colocaron 10 μ L de la muestra de espermatozoides en una laminilla y se mezclaron con 10 μ L del colorante. Se observaron 200 espermatozoides con un objetivo de 40X, los espermatozoides teñidos se consideraron muertos y aquellos que no se teñieron fueron considerados vivos. Ambos parámetros fueron evaluados siguiendo los criterios establecidos en el manual de la OMS (WHO, 2021), y adaptados para la rata por Lucio *et al.* (2009).

3.8. Distribución de carbohidratos e índice de fluorescencia

El marcaje de carbohidratos específicos en la membrana plasmática de los espermatozoides se realizó mediante la incubación por separado de alícuotas de 50 μ L de las muestras de espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo con diferentes lectinas conjugadas con FITC. Se utilizó la lectina WGA que se une a residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, la lectina Con-A que se une a residuos de manosa y la lectina UEA, que se une a residuos de fucosa. Las alícuotas con las muestras de espermatozoides se incubaron durante 30 minutos a 36°C con un volumen de 5 μ L de lectinas diluidas 1:50 en PBS, al término, se lavaron 2 veces por centrifugación a 500g con solución PBS, posteriormente se fijaron las muestras con paraformaldehído al 1 % durante 1 hora a temperatura ambiente, previo al análisis se lavaron nuevamente las muestras por centrifugación con solución PBS. Se establecieron los patrones de distribución de la fluorescencia en la membrana plasmática de los espermatozoides con el marcaje de cada lectina, mediante un microscopio de epifluorescencia con un filtro específico para FITC (460 nm excitación, 490 nm fluorescencia y 520 nm filtros de barrera), se contabilizaron 100 espermatozoides en cada análisis. Con las mismas muestras, se determinaron los índices de fluorescencia por medio de citometría de flujo, para ello se emplearon muestras con un

millón de espermatozoides previamente incubados con lectinas, que fueron analizadas en un citómetro de flujo modelo FACScan (Becton Dickinson, *Immunocytometry Systems*, San José, CA, EUA). Cada índice se calculó por medio del análisis de los histogramas de intensidad de fluorescencia obtenidos contra el número de células marcadas, una vez que se adquirieron diez mil eventos en cada análisis. Asimismo, en cada muestra se tuvo un control negativo, que se realizó al incubar previamente cada lectina con su respectivo carbohidrato en una concentración de 0.3 M durante 30 minutos, antes de agregarlas a las muestras de espermatozoides (Fierro *et al.*, 1996).

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos están presentados como la media \pm EEM (error estándar de la media). Se utilizó la prueba ómnibus de D'Agostino y Pearson para comprobar la normalidad de los datos. Cada parámetro se analizó mediante ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey. Los valores obtenidos con una $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete de software estadístico *GraphPad Prism* versión 6.01 (La Jolla, CA).

4. RESULTADOS

4.1. Cuantificación de Cd en la sangre y las tres regiones del epidídimo

Mediante espectrofotometría de absorción atómica se determinó la concentración de Cd en la sangre, en las regiones *caput*, *corpus* y en la *cauda* del epidídimo de los grupos tratados. Se observó en sangre un incremento estadísticamente significativo en la concentración de Cd comparado con el grupo control ($p < 0.05$) (figura 6).

En todos los grupos con las diferentes administraciones de Cd 0.125, 0.25 y 0.5 mg/kg se observó que la concentración de Cd en la región del *caput*, el *corpus* y la *cauda* de los grupos experimentales fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación con las regiones correspondientes del grupo Ctrl. De manera particular, se observó en la región de la *cauda* del epidídimo de los grupos tratados con este metal, una mayor concentración de Cd, además el grupo de 0.5 mg/kg mostró los valores más altos en todas las regiones del epidídimo (figura 6). Es importante mencionar que en las muestras de sangre y en las tres regiones del epidídimo, cada concentración de Cd determinada presentó un incremento relacionado con la concentración de la dosis administrada.

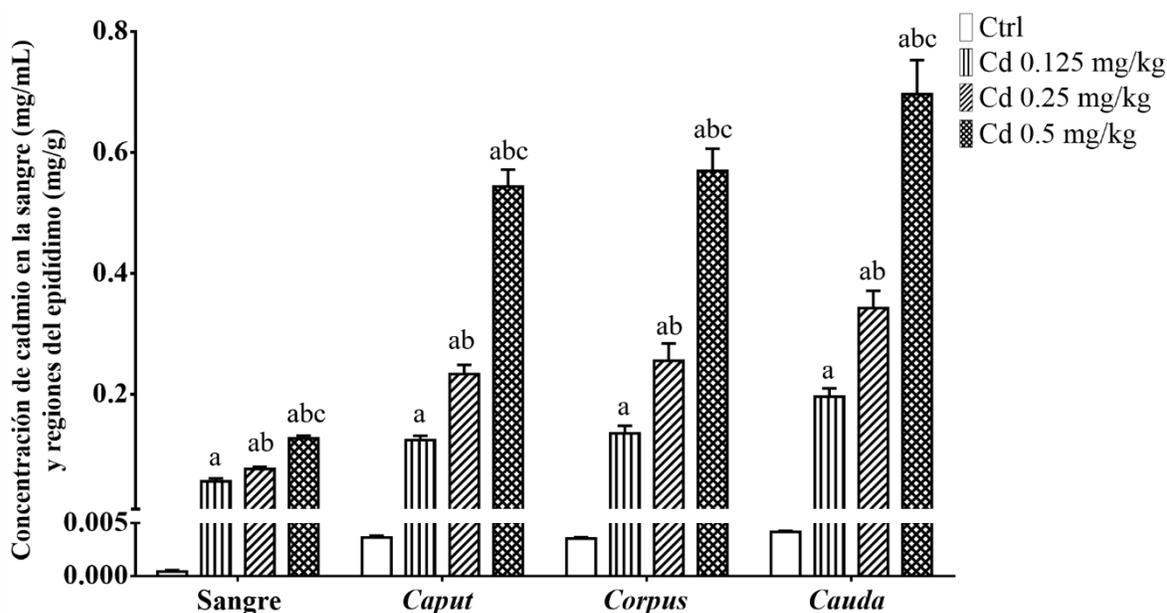


Figura 6. Cuantificación de Cd en sangre y las tres regiones del epidídimo. Los datos están expresados como la media \pm EEM, ($n = 6$ /grupo de tratamiento). ^a $p < 0.05$ Ctrl vs grupos con tratamiento de Cd; ^b $p < 0.05$ Cd 0.125 vs Cd 0.25 y 0.5 mg/kg; ^c $p < 0.05$ Cd 0.25 vs 0.5 mg/kg.

4.2. Cuantificación de T en suero

En la tabla 2 se muestran las concentraciones séricas de T a los 90 DPN en todos los machos de los grupos con tratamiento de Cd y del grupo Ctrl. Cabe recordar que todos los tratamientos tuvieron una duración de 49 días continuos de exposición a las diferentes dosis de Cd a partir del nacimiento debido a que es el tiempo señalado que les toma a las células del epitelio del epidídimo completar diferenciación, y se suspendieron hasta que los grupos experimentales cumplieron los 90 DPN. Los resultados mostraron una disminución significativa en la concentración de T en los grupos expuestos a Cd en comparación con el grupo Ctrl ($p < 0.05$). Observamos que la T disminuyó de forma significativa en relación con la dosis de Cd administrada a cada uno de los grupos expuestos ($p < 0.05$).

Tabla 2. Concentración de T en suero.

Ctrl	Cd 0.125 mg/kg	Cd 0.25 mg/kg	Cd 0.5 mg/kg
2.504 ± 0.101	1.133 ± 0.026^a	0.755 ± 0.059^{ab}	0.391 ± 0.022^{abc}

La concentración de T se muestra en ng/mL. Los datos están expresados como la media \pm EEM, ($n = 6$ /grupo de tratamiento). ^a $p < 0.05$ Ctrl vs grupos con tratamiento de Cd; ^b $p < 0.05$ Cd 0.125 vs Cd 0.25 y 0.5 mg/kg; ^c $p < 0.05$ Cd 0.25 vs 0.5 mg/kg.

4.3. Análisis histológico del epidídimo

En la figura 7 se muestra el análisis histológico del epitelio de cada una de las regiones del epidídimo, tanto de los machos del grupo Ctrl como de los grupos administrados con las diferentes dosis de Cd.

En las secciones histológicas del grupo Ctrl observamos que la estructura del túbulo epididimario de los diferentes cortes transversales de las regiones del *caput*, *corpus* y *cauda*, presentó un epitelio caracterizado por la presencia de diferentes tipos celulares, entre los que se observaron e identificaron a células basales (CB), apicales (CA), claras (CC) y predominantemente células principales (CP) con sus microvellosidades características y un gran número de epididimosomas que concuerdan con lo que ha sido descrito en trabajos previos dónde se analiza a nivel histológico la población celular presente a lo largo de todo el epitelio epididimario. La vacuolización (V) ha sido señalada como una característica que predomina en CP del *caput*, asimismo, observamos que su presencia disminuyó conforme se fueron evaluando los cortes más cercanos a la región de la *cauda*

del epidídimo. Igualmente, se observó que la densidad de los espermatozoides (SPZ) presentes en el lumen aumentó desde la región del *caput* hasta la *cauda* (figura 7 A-C).

En los cortes epididimarios de los machos tratados con la dosis de Cd 0.125 mg/kg (figura 7 D-F), se observaron ligeras alteraciones en el epitelio epididimario, entre ellas la presencia de núcleos aberrantes (NA) y un aumento de *v* hacia la parte apical de las células, a lo largo de las tres regiones del epidídimo. Además, se observó un menor número de SPZ en la luz con respecto a las secciones del grupo Ctrl, asimismo, observamos que en varios de esos SPZ se conservó la gota citoplasmática (GC).

El grupo con tratamiento de Cd 0.25 mg/kg mostró un mayor número de *v* apical y basal en CC y CP, con una presencia evidente de NA en este último tipo celular en las regiones del *corpus* (figura 7 H) y *cauda* (figura 7 I). Se observó una disminución en la densidad de SPZ en la luz del túbulo, siendo más evidente en la *cauda* (figura 7 I), junto con la persistencia de GC en algunos SPZ.

Los machos con la dosis de 0.5 mg/kg, presentaron el mayor número de alteraciones en todas las secciones del epidídimo. En la región del *caput* (figura 7 J) y la *cauda* (figura 7 L), algunas CP y CC presentaron hipertrofia celular (HC) caracterizada por un mayor tamaño celular, en comparación con las células de los machos Ctrl y las células de los tratamientos de 0.125 y 0.25 mg/kg. Además de presentar una mayor cantidad de *v*, desplazando el núcleo hacia la base de las células. Los SPZ presentes en el lumen de ambas regiones disminuyó con respecto a las regiones de los machos del grupo Ctrl, pero contenían una gran cantidad de GC. En la región del *corpus* (figura 7 K), la HC y la *v* de CP se observó acompañada de la presencia de NA. Además, existían abundantes lípidos infranucleares (li) ubicados hacia la región basal de CP y CC. Los SPZ que estaban presentes en la luz del túbulo tenían una gran cantidad de GC.

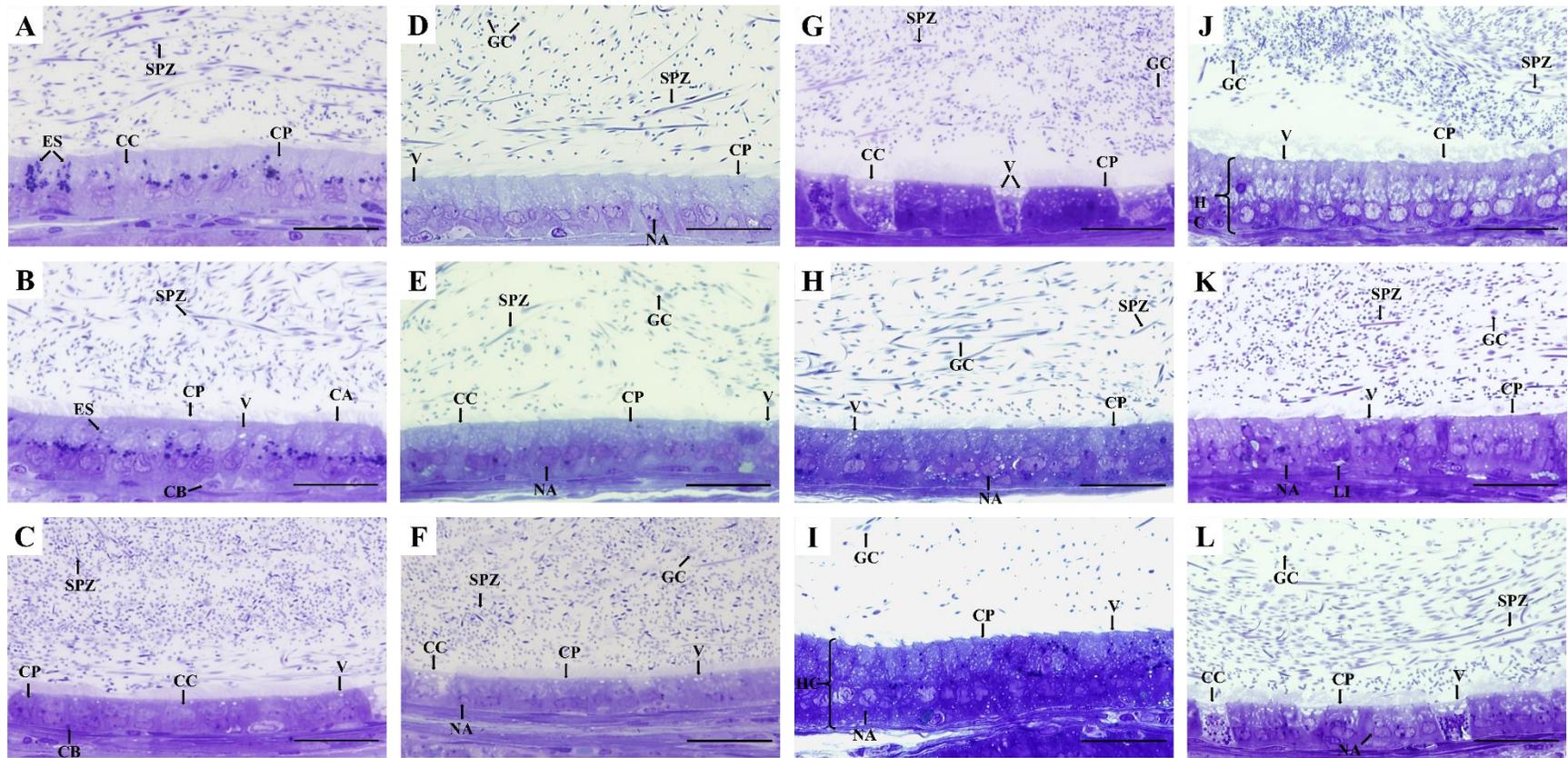


Figura 7. Análisis histológico del epidídimo. Ctrl: (A) *caput*, (B) *corpus*, (C) *cauda*; Cd 0.125 mg/kg: (D) *caput*, (E) *corpus*, (F) *cauda*; Cd 0.25 mg/kg: (G) *caput*, (H) *corpus*, (I) *cauda*; Cd 0.5 mg/kg (J) *caput*, (K) *corpus*, (L) *cauda*. Célula principal (CP); célula apical (CA); célula basal (CB); célula clara (CC); núcleo aberrante (NA); gota citoplasmática (GC); epididimosomas (ES); espermatozoides (SPZ); hipertrofia celular (HC); vacuolización (V); lípidos infranucleares (LI). Azul toluidina, 60 X. Barra 100 μ m.

4.4. Efectos del Cd en la altura y área de células principales

En la tabla 3 se presentan los datos de la altura y el área de las células principales de las tres regiones del epidídimo. En el grupo Ctrl observamos que tanto la altura como el área de las células principales disminuyeron gradualmente desde el *caput* hasta la *cauda*, en comparación con las secciones analizadas en las diferentes dosis de Cd de los grupos tratados ($p < 0.05$). En la región del *caput* se encontraron diferencias significativas en la altura y en el área de las células principales de todos los grupos tratados con Cd al compararlos con el grupo Ctrl ($p < 0.05$), de igual manera se observaron diferencias significativas entre todos los grupos tratados con Cd ($p < 0.05$). En la región del *corpus* la altura y el área de las células principales de todos los grupos tratados con las dosis de Cd tuvieron diferencias significativas con el grupo Ctrl ($p < 0.05$), de manera particular, la altura de las células principales del grupo con dosis de Cd 0.5 mg/kg fue significativamente mayor ($p < 0.05$) al compararla con las mediciones de los grupos tratados con las dosis de Cd 0.125 y 0.25 mg/kg, por otra parte, en esta región no se observaron diferencias significativas al comparar entre si el área de las células principales de los grupos tratados con Cd. En la región de la *cauda* hubo diferencias significativas en la altura y el área de las células principales de todos los grupos tratados con Cd al compararlos con el grupo Ctrl ($p < 0.05$), asimismo en ambas mediciones se encontraron diferencias significativas en todos los grupos tratados con Cd al compararlos entre si ($p < 0.05$).

Tabla 3. Efecto del Cd en la altura y el área de las células principales.

		Ctrl	Cd 0.125 mg/kg	Cd 0.25 mg/kg	Cd 0.5 mg/kg
Altura (μm)	<i>Caput</i>	83.5 \pm 0.44	69.9 \pm 0.83 ^a	47.4 \pm 0.79 ^{ab}	86.7 \pm 0.86 ^{abc}
	<i>Corpus</i>	70.1 \pm 0.90	60 \pm 0.79 ^a	58.5 \pm 0.36 ^a	63.7 \pm 0.89 ^{abc}
	<i>Cauda</i>	36.8 \pm 1.01	48.6 \pm 1.14 ^a	80.8 \pm 2.47 ^{ab}	42.4 \pm 0.96 ^{abc}
Área (μm^2)	<i>Caput</i>	1853 \pm 23.3	1531 \pm 30.2 ^a	1233 \pm 33.5 ^{ab}	2034 \pm 27.2 ^{abc}
	<i>Corpus</i>	1775 \pm 26.2	1579 \pm 35.9 ^a	1555 \pm 40.6 ^a	1601 \pm 35.2 ^a
	<i>Cauda</i>	603 \pm 12	884 \pm 18.5 ^a	1987 \pm 52.8 ^{ab}	1018 \pm 20.7 ^{abc}

Los datos están expresados como la media \pm EEM, (n = 6/grupo de tratamiento). ^ap < 0.05 Ctrl vs grupos con tratamiento de Cd; ^bp < 0.05 Cd 0.125 vs Cd 0.25 y 0.5 mg/kg; ^cp < 0.05 Cd 0.25 vs 0.5 mg/kg.

4.5. Determinación espermática

La concentración espermática se llevó a cabo con el conteo de una muestra proporcional de los espermatozoides recuperados de cada una de las tres regiones del epidídimo de todos los machos de los diferentes tratamientos analizados. Se observó de manera general una disminución significativa ($p < 0.05$) en la concentración de espermatozoides de cada una de las regiones del epidídimo de los tres grupos con administración de $CdCl_2$ tras hacer una comparación con la respectiva región de los machos del grupo Ctrl (tabla 4), de manera particular observamos que en cada una de las tres regiones del epidídimo las muestras del grupo que recibió la dosis de 0.5 mg/kg fueron las que tuvieron siempre una menor concentración de espermatozoides y mostraron diferencias significativas al compararlas con la concentración espermática correspondiente de las otras dosis de Cd administradas ($p < 0.05$).

En la evaluación del porcentaje de vitalidad espermática observamos que en el grupo Ctrl hubo un incremento progresivo en el valor de este parámetro de la región del *caput* a la *cauda*, este comportamiento no se observó en los grupos tratados con Cd, por el contrario, fue en los grupos con dosis de 0.25 y 0.5 mg/kg en los que el porcentaje de vitalidad fue menor en la región de la *cauda* que en las otras regiones (tabla 4), aunado al hecho que en cada una de las regiones todos los grupos tratados con Cd fueron significativamente diferentes del grupo Ctrl ($p < 0.05$), en el *caput* y la *cauda* las dosis de 0.25 y 0.5 mg/kg mostraron diferencias significativas con la dosis de 0.125 mg/kg ($p < 0.05$), en el *corpus* solo hubo diferencias significativas entre las dosis de 0.125 y 0.5 mg/kg ($p < 0.05$).

Tabla 4. Efecto del Cd en la determinación espermática epididimaria

		Ctrl	Cd 0.125 mg/kg	Cd 0.25 mg/kg	Cd 0.5 mg/kg
Concentración ($\times 10^6/\text{mL}$)	<i>Caput</i>	68.29 \pm 1.05	50.45 \pm 1.53 ^a	47.57 \pm 1.44 ^a	23.55 \pm 2.11 ^{abc}
	<i>Corpus</i>	54.83 \pm 1.08	40.26 \pm 0.77 ^a	40.03 \pm 1.64 ^a	17.20 \pm 1.91 ^{abc}
	<i>Cauda</i>	74.10 \pm 1.85	53.08 \pm 1.55 ^a	51.19 \pm 1.68 ^a	25.58 \pm 3.37 ^{abc}
Vitalidad (%)	<i>Caput</i>	96.17 \pm 0.31	91.83 \pm 0.40 ^a	89.50 \pm 0.56 ^{ab}	88.17 \pm 0.70 ^{ab}
	<i>Corpus</i>	96.50 \pm 0.43	91.17 \pm 0.60 ^a	89.50 \pm 0.42 ^a	88.50 \pm 0.76 ^{ab}
	<i>Cauda</i>	97.17 \pm 0.31	91.83 \pm 0.47 ^a	89.17 \pm 0.60 ^{ab}	87.33 \pm 0.76 ^{ab}

Los datos están expresados como la media \pm EEM, ($n = 6/\text{grupo de tratamiento}$). ^a $p < 0.05$ Ctrl vs grupos con tratamiento de Cd; ^b $p < 0.05$ Cd 0.125 vs Cd 0.25 y 0.5 mg/kg; ^c $p < 0.05$ Cd 0.25 vs 0.5 mg/kg.

4.6. Efecto del Cd en la distribución de los carbohidratos

4.6.1. Patrones de distribución de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en espermatozoides

Los residuos de los carbohidratos N-acetilglucosamina y/o ácido siálico fueron identificados en la membrana plasmática de los espermatozoides de las tres regiones del epidídimo de los machos tratados con las diferentes dosis de Cd y de los machos del grupo Ctrl mediante el marcaje con la lectina WGA-FITC. Se identificaron 4 patrones de distribución, los cuales se muestran en las fotomicrografías de la figura 8. En el patrón 1, se observó la distribución de los residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico situados a todo lo largo de la membrana del espermatozoide, abarcando desde la región de la cabeza, hasta la región distal del flagelo, marcando la pieza media y principal, esta distribución se hizo más visible en la cabeza y vaina mitocondrial del espermatozoide. En el patrón 2, la distribución de los residuos se observó particularmente en la región de la cabeza del espermatozoide. En el patrón 3 el marcaje se observó en la región de la cabeza y la pieza principal del espermatozoide. En el patrón 4, los espermatozoides, no mostraron alguna marca de unión con la lectina de WGA, por lo que fueron denominados sin fluorescencia (figura 8).

4.6.2. Porcentajes de los patrones de distribución de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en espermatozoides

Los porcentajes de los patrones de distribución de la unión de la lectina de WGA a los carbohidratos N-acetilglucosamina y/o ácido siálico se presentan en la figura 9. Observamos que el patrón 1 obtuvo los porcentajes más bajos entre todos los patrones de distribución, así como en todos los grupos con tratamientos de Cd y en todas las regiones del epidídimo, sin embargo, en la región del *caput* únicamente los grupos con dosis de 0.25 y 0.5 mg/kg tuvieron diferencias significativas con respecto al grupo Ctrl ($p < 0.05$), en la región del *corpus* los valores de los porcentajes de distribución permanecieron similares, pero aumentaron las diferencias significativas, al tener todos los grupos administrados con las diferentes dosis de Cd diferencias significativas contra el grupo Ctrl ($p < 0.05$), en la región de la *cauda* se mantuvieron las diferencias significativas entre todos los grupos administrados con las dosis de Cd contra el grupo Ctrl ($p < 0.05$).

En el caso del patrón 2, se distinguió que fue el patrón dominante entre todos los descritos previamente, al ser el que presentó los porcentajes más altos entre todos los grupos tratados con las dosis de Cd, así como en el grupo Ctrl, a lo largo de las tres regiones del epidídimo. En la región del *caput* todos los grupos tratados con Cd tuvieron diferencias significativas con el grupo Ctrl ($p < 0.05$), asimismo, se observó que había una diferencia significativa entre el grupo con la dosis de Cd 0.125

mg/kg contra el grupo de la dosis de 0.5 mg/kg ($p < 0.05$). En la región del *corpus* se mantuvieron las diferencias significativas entre todos los grupos tratados con dosis de Cd y el grupo Ctrl ($p < 0.05$), aunado al hecho de que el grupo con la dosis de Cd 0.125 mg/kg presentó diferencias significativas con respecto a los grupos con las dosis de Cd 0.25 y 0.5 mg/kg ($p < 0.05$). En la región de la *cauda* únicamente se mantuvieron las diferencias significativas entre todos los grupos con tratamiento de Cd contra el grupo Ctrl ($p < 0.05$).

En los porcentajes de distribución del patrón número 3 en la región del *caput* no se mostraron diferencias significativas entre los grupos tratados con las dosis de Cd contra el grupo Ctrl, mientras que en la región del *corpus* se determinó que únicamente el grupo con la dosis de Cd 0.5 mg/kg mostró una diferencia significativa al hacer la comparación con el grupo Ctrl ($p < 0.05$), y en la región de la *cauda* se observó que todos los grupos tratados con las diferentes dosis de Cd fueron significativamente diferentes al grupo Ctrl ($p < 0.05$).

En los porcentajes de distribución del patrón número 4, que fue en el que no se observó fluorescencia, se distinguió que en todos los grupos tratados con las dosis de Cd los valores fueron mayores a los que se registraron para el grupo Ctrl, asimismo, observamos que los valores de los porcentajes en los grupos con administración de Cd, tenían una relación dependiente con la dosis administrada. En la región del *caput* observamos que todos los grupos tratados con las dosis de Cd tuvieron diferencias significativas con el grupo Ctrl ($p < 0.05$), por otra parte, y la dosis de Cd 0.125 mg/kg tuvo una diferencia significativa con la dosis de Cd 0.5 mg/kg ($p < 0.05$). En la región del *corpus* se mantuvieron las diferencias significativas entre los grupos tratados con Cd y el grupo Ctrl ($p < 0.05$), asimismo, se siguió presentando la diferencia significativa entre las dosis de Cd 0.125 y 0.5 mg/kg ($p < 0.05$). En la región de la *cauda* se mantuvieron las diferencias significativas entre todos los grupos con tratamientos de Cd y el grupo Ctrl ($p < 0.05$), además, la dosis de Cd 0.125 mg/kg mostro diferencias significativas contra las dosis de Cd 0.25 y 0.5 mg/kg ($p < 0.05$).

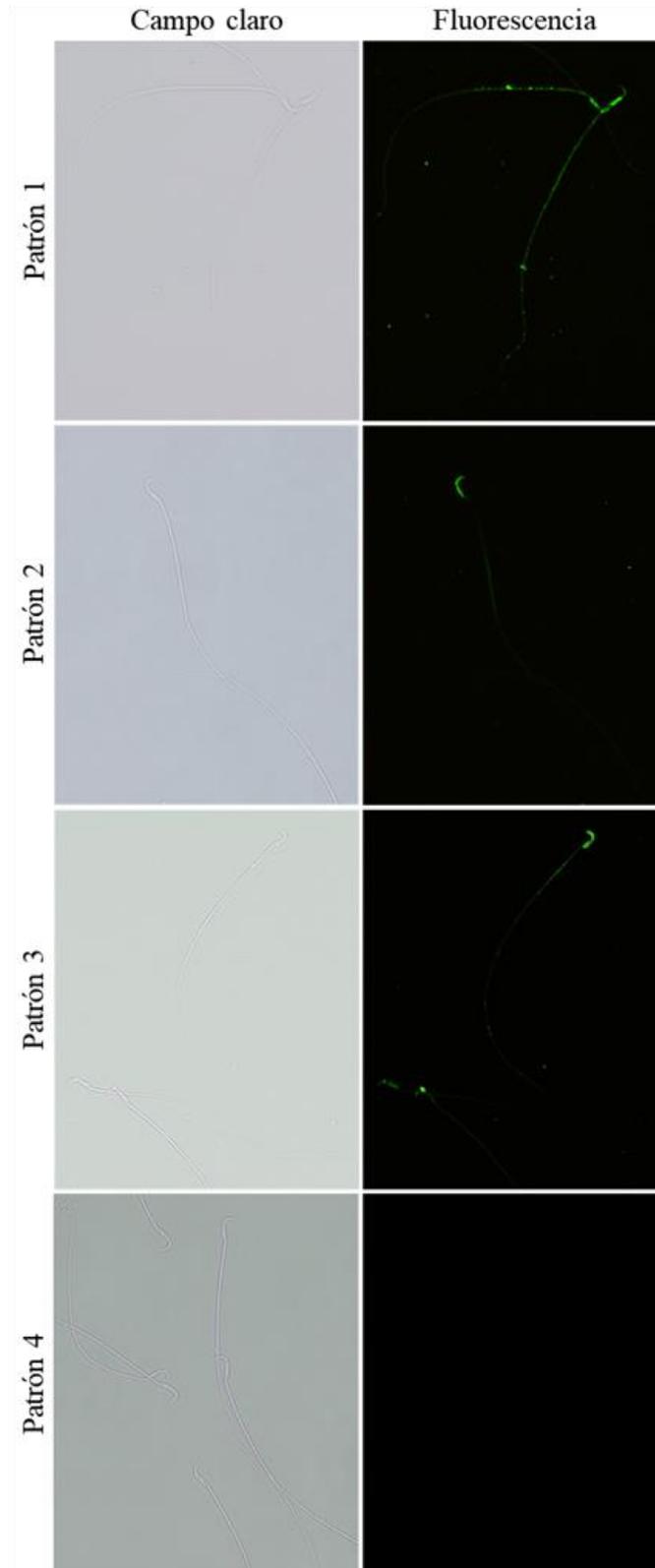


Figura 8. Micrografías de patrones de distribución de fluorescencia de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en espermatozoides. Microscopía de campo claro y fluorescencia, 20X.

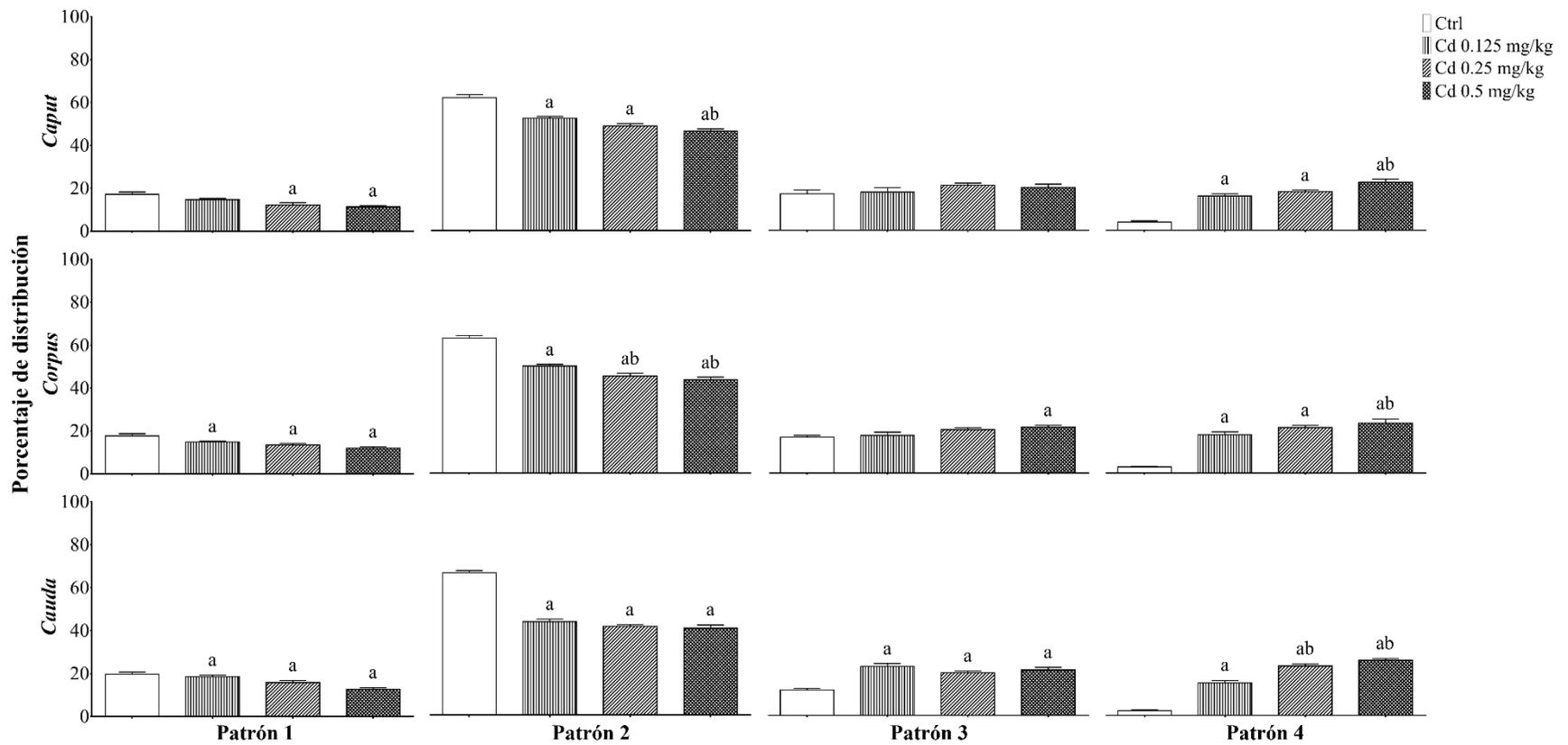


Figura 9. Porcentajes de distribución de patrones de fluorescencia de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en la membrana de los espermatozoides de las tres regiones del epidídimo. Los datos están expresados como la media \pm EEM, (n = 6). ^ap < 0.05 Ctrl vs grupos con tratamiento de Cd; ^bp < 0.05 Cd 0.125 vs Cd 0.25 y 0.5 mg/kg.

4.6.3. Índice de fluorescencia de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico

El índice de fluorescencia de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico de los espermatozoides de los grupos tratados con las diferentes dosis de Cd y del grupo Ctrl en cada región del epidídimo, se muestra en la figura 10. Hallamos que en el índice de fluorescencia de los grupos administrados con las diferentes dosis de Cd disminuyeron los valores en cada región del epidídimo en comparación con el grupo Ctrl correspondiente, mostrando diferencias significativas al compararlos ($p < 0.001$), por el contrario, no se observaron, diferencias significativas entre los grupos tratados con Cd. En el *caput*, los índices de fluorescencia del grupo Ctrl y los tratados con las dosis de Cd 0.125 y 0.25 mg/kg tuvieron los valores más bajos. En el *corpus* se registraron los valores más altos, manteniéndose las diferencias entre los grupos expuestos a Cd contra el grupo Ctrl ($p < 0.001$). En la *cauda*, el índice de fluorescencia de todos los grupos analizados disminuyó, particularmente en el grupo de Cd 0.5 mg/kg, sin embargo, solo hubo diferencias significativas entre los grupos con Cd y el grupo Ctrl ($p < 0.001$).

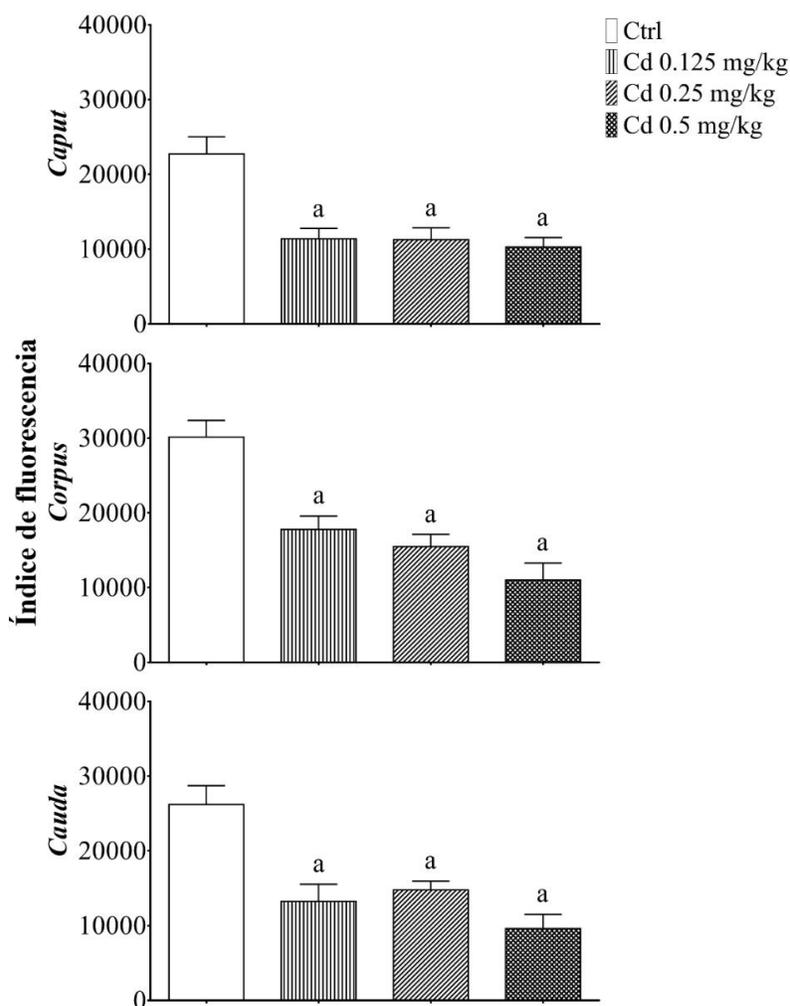


Figura 10. Índices de fluorescencia de los N-acetilglucosamina y/o ácido siálico. Los datos están expresados como la media \pm EEM, ($n = 6$). ^a $p < 0.001$ Ctrl vs grupos con tratamiento de Cd.

4.6.4. Patrones de distribución de manosa en espermatozoides

El carbohidrato manosa se identificó en la membrana plasmática de los espermatozoides de las tres regiones del epidídimo de los machos tratados con las diferentes dosis de Cd y de los machos del grupo Ctrl mediante el marcaje con la lectina aglutinina de Con-A. Tras haber realizado el marcaje de los espermatozoides, se pudieron reconocer 4 patrones de la distribución de manosa, los cuales se muestran en las fotomicrográficas de la figura 11. En el patrón 1, se observó que la distribución de manosa estuvo principalmente en el flagelo del espermatozoide y fue ligera en la región de la cabeza. En el patrón 2, la distribución de manosa solo se identificó en la cabeza del espermatozoide. En el patrón 3, manosa se observó a lo largo de la región de la cabeza y en la pieza principal del espermatozoide. En el patrón 4, los espermatozoides, no mostraron alguna marca de la unión con la lectina de Con-A, por lo que fueron denominados sin fluorescencia (figura 11).

4.6.5. Porcentajes de los patrones de distribución de la fluorescencia de manosa

Los porcentajes de los patrones de distribución de manosa en la membrana plasmática de los espermatozoides se presentan en la figura 12. En el patrón de distribución número 1 los promedios de los valores de los porcentajes estuvieron entre 24.67-30.25 en el *caput*, 22.5-26.67 en el *corpus* y 23-24.33 en la *cauda* y no mostraron diferencias significativas ninguno de los grupos.

Los porcentajes en el patrón de distribución número 2 tuvieron valores un poco mayores a los mostrados por el patrón número 1, los promedios de los valores fueron de 26.5-33 en el *caput* y se mostraron diferencias significativas entre el grupo Ctrl (33.0) con los grupos tratados con las dosis de Cd de 0.25 (\bar{X} 27.67) y 0.5 mg/kg (\bar{X} 27.0) ($p < 0.05$), sin embargo, en el *corpus* el promedio de los valores que estuvo entre 26.17-30.83 y en la *cauda* cuyo promedio fue de 27-29.17 no hubo diferencias significativas.

Observamos que el patrón de distribución número 3 presentó los porcentajes más altos en los grupos tratados con Cd y el grupo Ctrl en las tres regiones del epidídimo, el valor promedio de los porcentajes registrados entre los grupos evaluados estuvieron entre los 31.83-37.17 en el *caput*, entre 30-46.5 en el *corpus* y entre 30.33-47.83 en la *cauda*, en el *caput* los grupos tratados con Cd tuvieron diferencias significativas con el grupo Ctrl ($p < 0.05$), en el *corpus* se mantuvieron las diferencias significativas entre los porcentajes de los grupos tratados con Cd y el grupo Ctrl, además que el promedio del grupo con dosis de Cd 0.125 mg/kg (\bar{X} 39.50) tuvo diferencias significativas al compararlo con el grupo de la dosis de Cd 0.5 mg/kg (\bar{X} 30.0) ($p < 0.05$), en la *cauda* permanecieron las diferencias significativas entre los promedios de los grupos tratados con Cd y el grupo Ctrl (\bar{X}

47.83), y surgieron diferencias significativas entre todos los grupos tratados con Cd, el valor promedio de los porcentajes de los grupos tratados con Cd fue de 38.25 para la dosis de 0.125 mg/kg, 34.17 para la dosis de 0.25 mg/kg y de 30.33 para la dosis 0.5 mg/kg ($p < 0.05$).

Los porcentajes del patrón de distribución número 4 fueron los más bajos encontrados, sin embargo, mostraron el mayor número de diferencias. En el *caput* todos los grupos tratados con Cd tuvieron diferencias significativas con el grupo Ctrl (\bar{X} 3.2), asimismo la dosis de Cd 0.125 (\bar{X} 8.5) tuvo diferencias significativas con las dosis de 0.25 y 0.5 mg/kg (\bar{X} 11.0 y 16.5, respectivamente) ($p < 0.05$). En la región del *corpus* se mantuvieron las diferencias significativas descritas para la región del *caput* ($p < 0.05$), de tal manera que en el grupo Ctrl se registró un valor \bar{X} 2.67 y en los grupos tratados con Cd el porcentaje fue de \bar{X} 38.25 para la dosis de 0.125 mg/kg, \bar{X} 34.17 para la dosis de 0.25 mg/kg y de \bar{X} 30.33 para la dosis 0.5 mg/kg, en la región de la *cauda* hubo diferencias significativas entre todos los grupos ($p < 0.05$), el valor que se registró entre los porcentajes fue de \bar{X} 2.0 para el grupo Ctrl, \bar{X} 9.75 en el grupo con la dosis de Cd 0.125 mg/kg, \bar{X} 13.83 en el grupo con la dosis de 0.25 mg/kg y de \bar{X} 17.17 para el grupo con la dosis de 0.5 mg/kg.

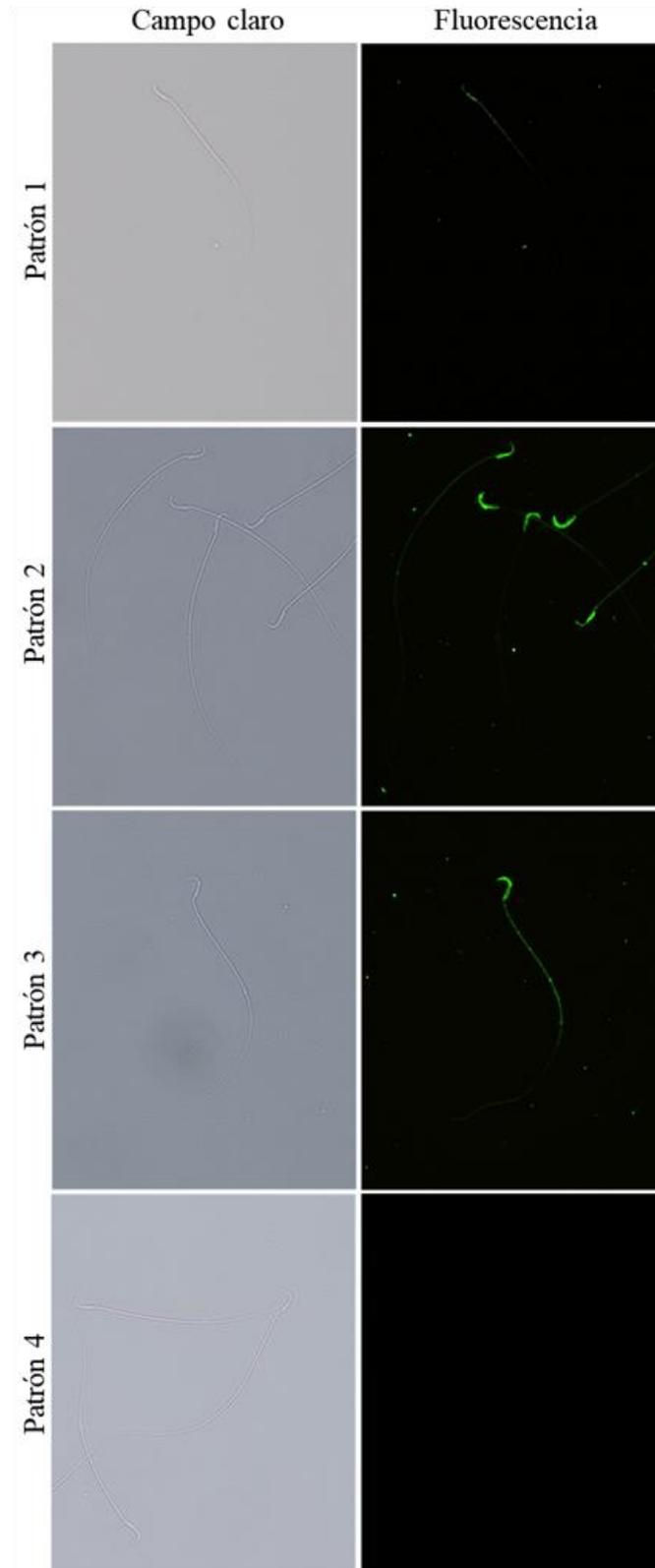


Figura 11. Micrografías de patrones de distribución de fluorescencia de manosa en espermatozoides. Microscopía de campo claro y fluorescencia, 20X.

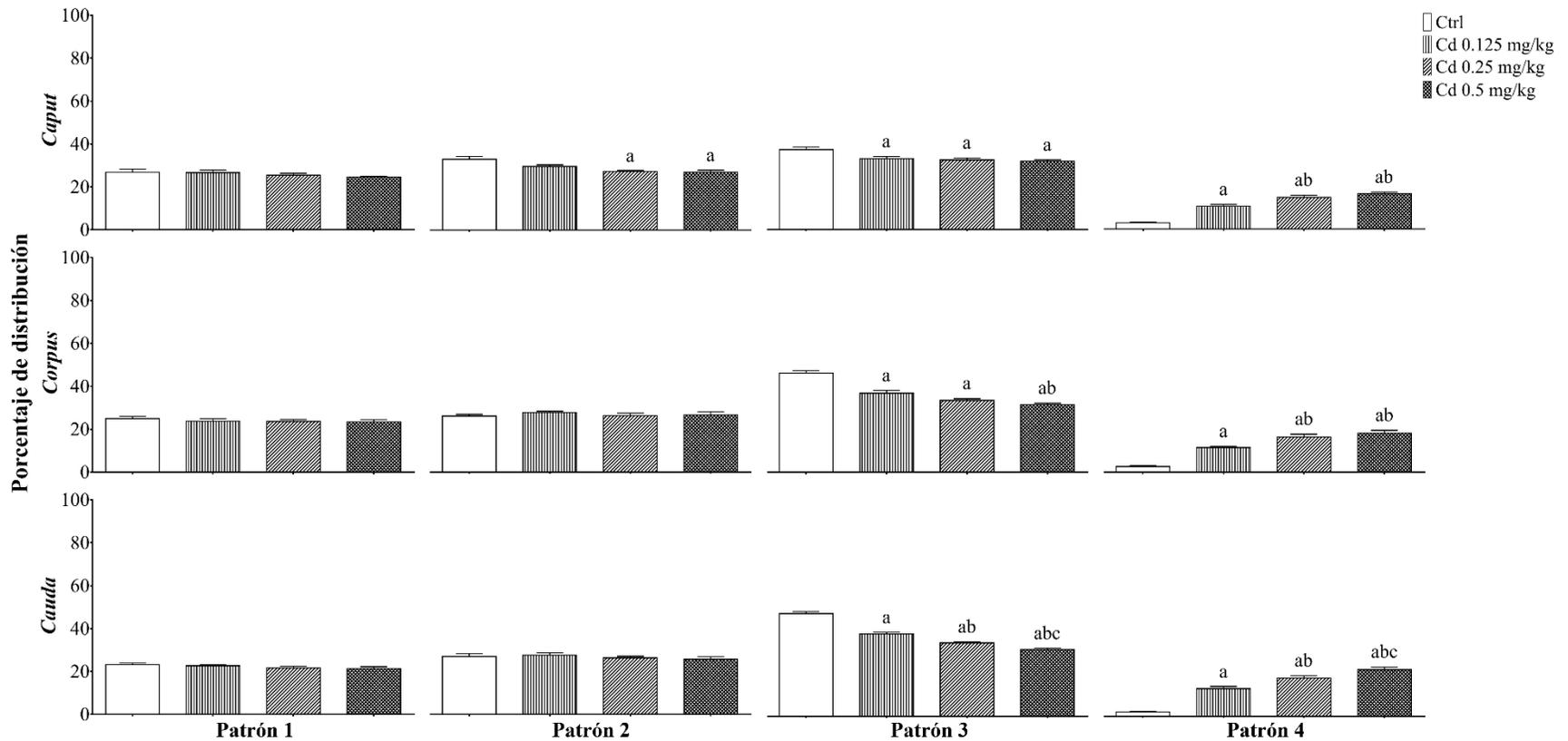


Figura 12. Porcentajes de distribución de patrones de fluorescencia de manosa en la membrana de los espermatozoides de las tres regiones del epidídimo. Los datos están expresados como la media \pm EEM, (n = 6). ^ap < 0.05 Ctrl vs grupos con tratamiento de Cd; ^bp < 0.05 Cd 0.125 vs Cd 0.25 y 0.5 mg/kg; ^cp < 0.05 Cd 0.25 vs 0.5 mg/kg.

4.6.6. Índice de fluorescencia de manosa

El índice de fluorescencia de manosa en los espermatozoides de cada región del epidídimo de los grupos tratados con las diferentes dosis de Cd y del grupo Ctrl se muestra en la figura 13. Encontramos que el Cd provocó una disminución significativa en los valores de los índices de fluorescencia de los espermatozoides de los grupos administrados con Cd con respecto a los valores de los índices de fluorescencia de los espermatozoides del grupo Ctrl en cada región del epidídimo ($p < 0.001$). Aunque entre los grupos administrados con las dosis de Cd no encontramos alguna diferencia significativa. En la región del *caput* los grupos Ctrl y dosis de Cd 0.125 y Cd 0.5 mg/kg, fueron los más bajos. Los índices de fluorescencia más altos de todos los grupos experimentales se registraron en la región del *corpus*. En la región de la *cauda* los índices de fluorescencia disminuyeron respecto al *corpus*, sin haber cambios en las diferencias significativas entre los grupos con dosis de Cd y el grupo Ctrl ($p < 0.001$).

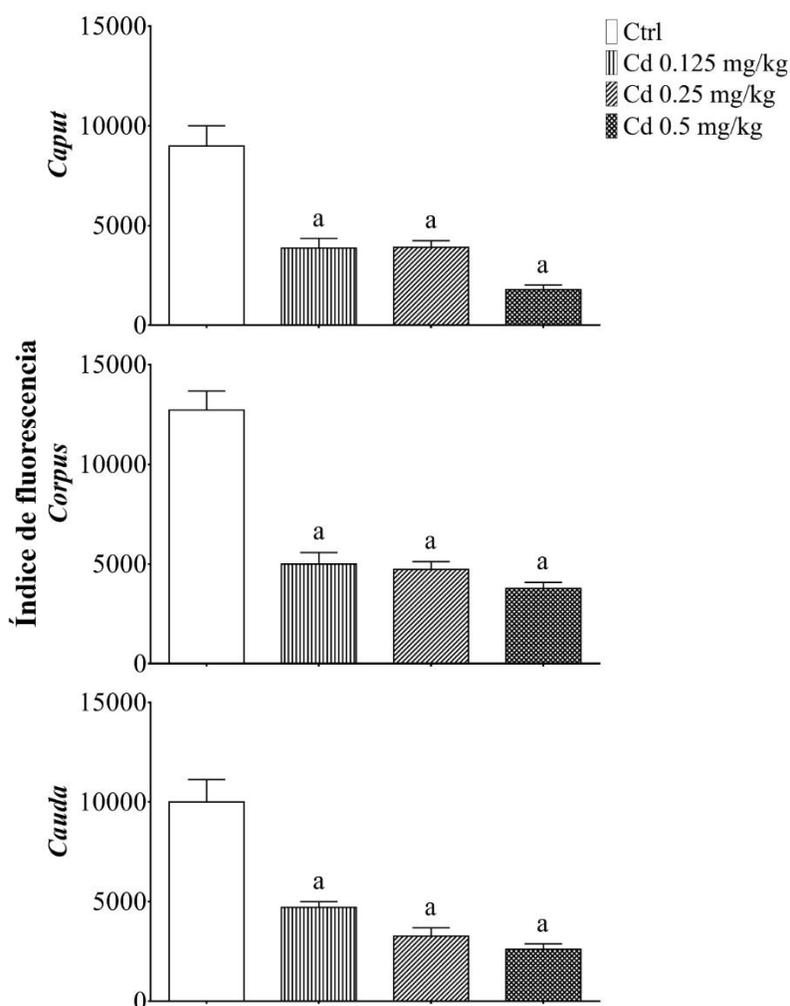


Figura 13. Índices de fluorescencia de manosa. Los datos están expresados como la media \pm EEM, (n = 6). ^a $p < 0.001$ Ctrl vs grupos con tratamiento de Cd.

4.6.7. Índice de fluorescencia de fucosa

Posterior a la incubación de los espermatozoides de cada una de las regiones del epidídimo de todos los grupos tratados con las diferentes dosis de Cd y del grupo Ctrl, con la lectina UEA, no fue posible detectar la distribución de fucosa en la membrana plasmática de los espermatozoides por medio de microscopia de epifluorescencia, asimismo, por medio de microscopia de campo claro se verifico la existencia de espermatozoides en las muestras analizadas para este carbohidrato, por lo que no fue posible que estableciéramos patrones de su distribución en la membrana plasmática de dichos espermatozoides.

Al mismo tiempo, se corrieron los análisis por medio de citometría de flujo, con lo que se pudo determinar la presencia de fucosa en los espermatozoides de cada una de las regiones del epidídimo de los machos tratados con las diferentes dosis de Cd y de los machos del grupo Ctrl, para así poder calcular el índice de fluorescencia que se muestra en la figura 14. Encontramos que el Cd mantuvo una reducción significativa en todos los índices de fluorescencia de fucosa de los espermatozoides de cada una de las regiones del epidídimo de los grupos administrados con diferentes dosis de Cd, al hacer la comparación con los índices de fluorescencia de los espermatozoides del grupo Ctrl de cada región del epidídimo correspondiente ($p < 0.001$), sin embargo, entre los grupos administrados con las diferentes dosis de Cd no se encontraron diferencias significativas. En la región del *caput* los índices de fluorescencia de fucosa registraron los valores más bajos en cada uno de los grupos analizados, incluyendo al grupo Ctrl, hacia la región del *corpus* el valor de los índices de fluorescencia incremento en todos los grupos analizados, siendo más evidente el aumento en los grupos Ctrl y Cd 0.125 mg/kg, no obstante, en todos los grupos con la administración de las dosis de Cd se mantuvieron únicamente las diferencias significativas contra el grupo Ctrl ($p < 0.001$). En la región de la *cauda*, el índice de fluorescencia de fucosa se mantuvo con valores similares a los de la región del *corpus*, y únicamente los grupos con administración de las dosis de Cd tuvieron diferencias significativas al ser comparados con el grupo Ctrl ($p < 0.001$).

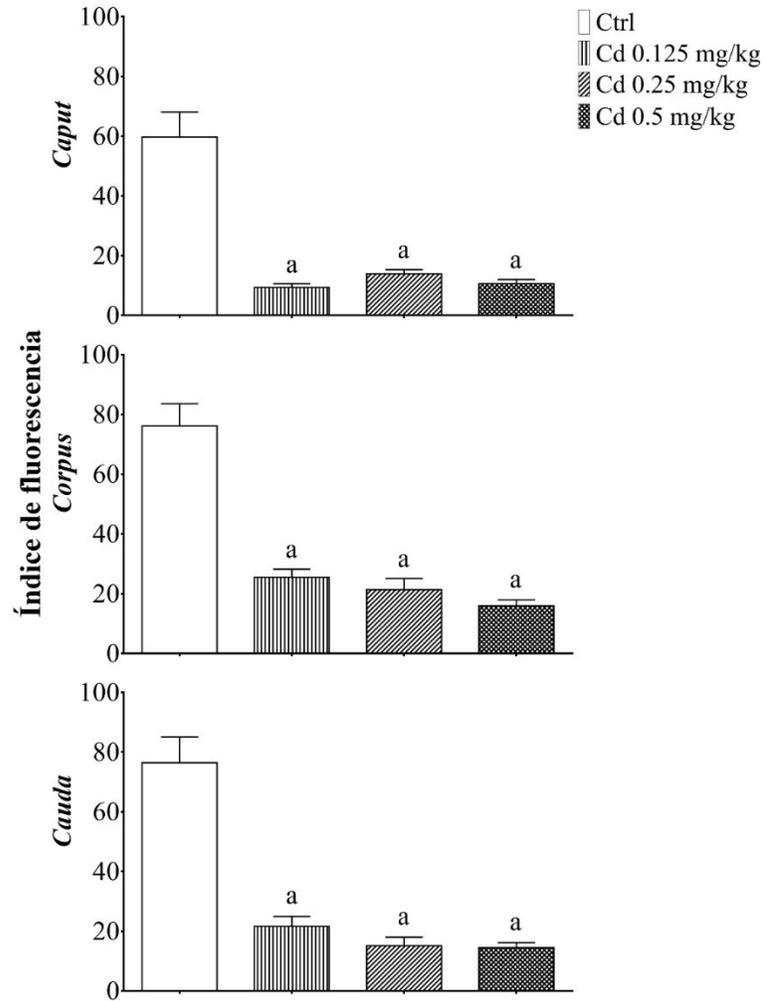


Figura 14. Índices de fluorescencia de fucosa. Los datos están expresados como la media \pm EEM, (n = 6). ^ap < 0.001 Ctrl vs grupos con tratamiento de Cd.

5. DISCUSIÓN

El Cd es un agente tóxico presente en el medio ambiente que se deriva de actividades antropogénicas. Es bien sabido que este metal pesado puede tener impactos negativos tanto en la salud humana como animal. El Cd se puede encontrar en el agua y los alimentos, incluidas semillas, verduras y mariscos (Bashir, Manoharav y Prabu, 2014), no tiene funciones biológicas favorables para el organismo (Khan *et al.*, 2017). Puede bioacumularse significativamente en el cuerpo humano debido a su lenta tasa de excreción a través de la orina (Arain *et al.*, 2015). El Cd tiene una vida media notablemente larga estimada entre 20 a 40 años; por lo tanto, la exposición puede conducir a una bioacumulación significativa en organismos (Marettová *et al.*, 2015). La exposición al Cd tiene consecuencias para el desarrollo sexual masculino y la fertilidad debido a sus efectos negativos sobre el funcionamiento del eje HHT (Lafuente, 2013) y otros órganos reproductores, incluida la próstata, las vesículas seminales y el epidídimo (Sengupta, 2014). Este estudio verificó la bioacumulación de Cd de manera dosis-dependiente en las tres regiones del epidídimo de ratas macho mediante la administración de este metal desde el nacimiento hasta el final de la pubertad, cuantificando las cantidades que persistieron en el DPN 90. Nuestros resultados concuerdan con los de Lacorte *et al.* (2013), quienes reportaron concentraciones más altas de Cd en la sangre y el epidídimo de las ratas macho expuestas. La presencia de Cd en la sangre es un buen indicador del nivel de exposición al que se ha estado expuesto por periodos breves de semanas o incluso por varios meses (Zeng *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2016), si bien en nuestro estudio los grupos tratados con Cd difieren significativamente del Ctrl. El análisis estadístico mostró que el nivel de Cd en la sangre de los grupos tratados correspondía con la dosis administrada; es decir que hay una correlación positiva entre la dosis de cadmio y la concentración de Cd presente en sangre. Las alteraciones que podrían estarse presentando en las células sanguíneas son debidas, por un lado, al desbalance entre las capacidades oxidativas y antioxidantes que conducen a la lipoperoxidación por un incremento de radicales libres. Estas alteraciones pueden afectar la integridad de la membrana de las células sanguíneas, pues el Cd puede modificar el contenido de fosfolípidos y proteínas causando fluidez en la membrana (Al-Fartosi *et al.*, 2010; Matović *et al.*, 2015), y por otra lado, en las funciones de las células sanguíneas relacionadas con la pérdida de átomos de hierro en la hemoglobina, además de, una deficiencia en la oxigenación de los tejidos, fuga de hemoglobina al plasma y una tendencia a la hemólisis intravascular y una reducción en los niveles de Zn (Demir y Öner, 1995; Matović *et al.*, 2015). También, las alteraciones en las células sanguíneas se han relacionado con la hematotoxicidad que causa el Cd *per se*, pues en trabajos como el de Al-Fartosi *et al.* (2010) y el de Matović *et al.*, (2013; 2015) se emplea al acetato de Cd como xenobiótico, y se encontraron daños equivalentes a los que produce en células sanguíneas por la exposición a CdCl₂. Debido al hecho de que el Cd puede unirse a proteínas como

la albúmina y la transferrina (Li *et al.*, 2020), esto le permite llegar a varios órganos diana, como es el caso del epidídimo en el que observamos una acumulación relacionada con la dosis de Cd administrada. La entrada de este metal a las células del epitelio epididimario se debe a que el Cd altera las interacciones célula-célula y a las uniones estructurales que constituyen a la barrera hematoepididimaria (Adamkovicova *et al.*, 2014), y aunque son pocos los estudios que examinan la capacidad de las células del epitelio epididimario para desintoxicar a este órgano de contaminantes ambientales como metales pesados, se ha establecido que es importante el entendimiento en la regulación y la actividad que presentan las metalotioneínas en los tejidos reproductivos, debido a que estas proteínas ricas en residuos de cisteína pueden captar metales como Zn, Cu y Cd (Ohta *et al.*, 2019). Al respecto, los trabajos de Cyr *et al.* (2001) y de Tang (2007) nos ayudan a comprender por qué en nuestros análisis; además de encontrar una mayor bioacumulación de Cd en el epidídimo en comparación con la sangre, siendo la región más distal de este órgano donde se presentaron los valores más altos de bioacumulación de Cd en los tres grupos experimentales. Cyr *et al.* (2001) encontraron que la exposición a una dosis de 5 $\mu\text{mol/kg}$ de Cd incrementa los niveles de RNAm de las isoformas I, II y III de las metalotioneínas en las regiones proximales del epidídimo, en comparación con la región distal donde el nivel de los RNAm llegó a disminuir significativamente, por su parte Tang (2007) señala que al evaluar la expresión de la isoforma I por *Western blot*, esta disminuye tras el tratamiento de 2 mg/kg de Cd por 10 días, en estos trabajos por medio de inmunohistoquímica se halló que la localización de estas proteínas sucede en células basales y en células claras de forma natural, sin embargo, el Cd al modificar la síntesis de metalotioneínas por efectos directos en dichas células y porqué disminuye la concentración de T de la cual la síntesis de estas proteínas es dependiente, podríamos proponer que las diferencias en la acumulación de Cd en las diferentes regiones del epidídimo están vinculadas con la pérdida progresiva de la capacidad de las metalotioneínas para mantener libres a las células de Cd, y que esto lleve a la alteración en el proceso de maduración espermática debido a que los espermatozoides que son almacenados en la *cauda* son un blanco para los xenobióticos, y en consecuencia la presencia de Cd en el epidídimo se pueda asociar con algunas de las causas de infertilidad masculina (Gregory y Cyr, 2014), entre ellas por ejemplo, que en los seres humanos el Cd alcaliniza el fluido presente en el lumen del epidídimo e inhibe la función de la H-ATPasa que es crucial para el almacenamiento y la maduración de los espermatozoides (Nnadi y Ngozi, 2018). Asimismo, el Cd afecta la fisiología del testículo de mamíferos al causar severos daños estructurales que disrumpen la barrera hematotesticular, esto provoca graves alteraciones tanto en las células del epitelio seminífero como en las del compartimento intersticial entre las cuales las células de Leydig son afectadas debido a que altera la regulación del ambiente que es necesario para su desarrollo, por lo que el Cd dificulta su crecimiento y puede inducir

tumores (Zhu *et al.*, 2020). Además de aumentar su apoptosis al activar vías de señalización que están reguladas por la actividad de caspasas 3 y 9 e inducir estrés oxidativo que daña al DNA de las células de Leydig (Wang *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2020), por lo que se reduce su número y se inhibe su actividad, lo que causa una disminución en la síntesis de T (Wu *et al.*, 2017; Tariba-Lovaković, 2020). En el presente estudio se cuantificó la concentración de T en el suero de ratas adultas y se comprobó que estos valores disminuyeron de manera dosis-dependiente en los grupos tratados con Cd. Yari *et al.* (2016) obtuvieron resultados similares, reportaron que después de la administración de Cd, la concentración de T disminuyó con respecto a su grupo Ctrl. Esto se puede explicar haciendo referencia a los informes que demuestran que la síntesis de T en células de Leydig está regulada tanto por una vía de señalización compleja, por una red de transporte de esteroides y por la función de diversas enzimas biosintéticas, además la producción de T está regulada desde el eje HHT, debido a que la LH que es secretada desde la hipófisis requiere de unirse a su receptor presente en las células de Leydig, sin embargo se ha descrito que el Cd afecta los tres niveles del eje y genera alternaciones en sus funciones (Lafuente *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2017), a la par se sabe que el Cd reduce el nivel de expresión de genes esteroideogénicos y la producción de sus proteínas como StAR, regula a la baja el nivel de las enzimas citocromo P450_{SCC} y P450_{17β}, 3β-HSD (Ji *et al.*, 2010; Alkhedaide *et al.*, 2016) y 17β-HSD (Knazicka *et al.*, 2015), respecto a la disminución de la actividad testicular de StAR, y de las 3β y 17β-HSD se ha descrito por Ujah *et al.* (2017) que el tratamiento con 5 mg/kg de CdCl₂ por cuatro semanas incrementa la concentración testicular de colesterol debido a la disminución de su transporte al interior de las células de Leydig y esto reduce la disponibilidad del sustrato para las enzimas encargadas de la biosíntesis de T.

En nuestro trabajo, el epitelio de las tres regiones del epidídimo mostró diferencias en la altura y en el área de las células principales de los grupos tratados con Cd, lo que podría estar relacionado con las bajas concentraciones de T que registraron, debido a que este órgano es andrógeno-dependiente para el desarrollo y mantenimiento de su estructura (O'Hara *et al.*, 2011; Kerkhofs *et al.*, 2012). Observamos que la altura de las células principales del epidídimo en la región del *caput* aumentó, especialmente en el grupo de Cd 0.5 mg/kg, y que esto se acompañó de una disminución de la luz del lumen en comparación con el grupo Ctrl. Esto es similar a los resultados de Lamas *et al.* (2017), quienes aplicaron una dosis de 1.2 mg/kg de Cd durante 50 días. Consideramos que este cambio se debe al elevado número de alteraciones que se produjeron en el citoplasma de las células principales y al aumento de la vacuolización en los tres grupos tratados con Cd, debido a que se ha determinado que el Cd puede alterar las uniones celulares y a la barrera hematoepididimaria (Dubé y Cyr, 2013), por lo que una exposición subcrónica causa el engrosamiento del epitelio y origina cambios en el tamaño y forma de la luz del túbulo, al respecto Adamkovicova *et al.* (2014) observaron

cambios estructurales en el epitelio epididimario en la región del *caput* y la *cauda* de ratas adultas luego de la administración subcrónica de Cd en dosis de 30 mg/L por vía oral. Asimismo, enfatizan que, en estas regiones, en el lumen del túbulo se presentó un aumento de espermatozoides que mostraron un considerable número de gotas citoplásmicas adheridas a los flagelos, similar a lo que hemos descrito en nuestras observaciones, pero con dosis de 0.25 y 0.5 mg/kg de Cd principalmente, razón por la que se ha considerado que los efectos de disrupción al epitelio epididimario pueden ser valorados como un indicador sensible de la deficiencia en la maduración y movilidad de los espermatozoides (Dubé y Cyr, 2013).

Otra posible explicación de los cambios observados en el epitelio del epidídimo sugiere que el Cd entra en las células epiteliales de la misma forma que penetra en otros tipos de células; es decir, imitando a metales divalentes como el calcio (Ca^{2+}) a través del canal dependiente de voltaje o los transportadores de zinc (Zn) (familia ZIP; Zrt, Irt proteínas relacionadas), especialmente la proteína ZIP-8 (Arteaga-Silva *et al.*, 2021). También hay informes de que este metal puede inducir estrés oxidativo y la formación de EROs, debido a que puede inhibir indirectamente la actividad de enzimas antioxidantes (Hamada, Tanimoto y Sasaguri, 1997; Wang *et al.*, 2019), esto se debe a que el Cd interfiere con la homeostasis de metales esenciales y afecta la estructura y función de proteínas antioxidantes al sustituir al Zn, Cu y Fe, como es en el caso de SOD en la que el Cd desplaza al Zn de su sitio catalítico (Polykretis *et al.*, 2019; Bovio *et al.*, 2021), lo mismo ocurre en el caso de CAT al desplazar a Cu y Fe lo que inhibe su función (Wang *et al.*, 2015) y en el caso de GPx que se apoya del selenio (Se) para su actividad catalítica, se forman complejos químicos entre Cd y Se en el sitio activo de GPx que afectan su actividad (Messaoudi *et al.*, 2009), también, el Cd al desplazar metales de su unión a proteínas causa un incremento en la concentración de metales redox como Fe o Cu, que pueden participar en reacciones tipo Fenton produciendo radicales hidroxilos (OH^{\cdot}) que favorecen disturbios metabólicos y al desencadenamiento del estrés oxidativo (Valko *et al.*, 2016). Estos cambios a nivel bioquímico en el epitelio del epidídimo podrían estar asociados con modificaciones de la expresión, secreción y actividad de las proteínas implicadas en la maduración y almacenamiento de espermatozoides (O'Hara *et al.*, 2011; Kerkhofs *et al.*, 2012) y podrían en consecuencia resultar en la infertilidad masculina (Zhao *et al.*, 2017).

Con respecto a la evaluación espermática realizada en este estudio, los espermatozoides obtenidos del *caput* y del *corpus*, incluso con la dosis más baja de Cd que se administró (0.125 mg/kg) registraron también una disminución en la concentración y en la vitalidad como se observó en la región de la *cauda*, la reducción en los valores de ambos parámetros en nuestros grupos expuestos a

Cd además de concordar con los resultados de los análisis a los espermatozoides de la región de la *cauda* de ratas adultas expuestas a 1 mg/kg de Cd que fueron realizado por Asadi *et al.*, (2013) y Yari *et al.*, (2010; 2016), señalan que todas las regiones del epidídimo son susceptibles a los efectos que reducen los parámetros de la calidad espermática. Estudios realizados por Benoff *et al.* (2009) y por Li *et al.* (2016) en eyaculados de humanos informan que existe una relación entre la baja concentración de espermatozoides y la presencia de Cd en la sangre y en el plasma seminal, la disminución en el conteo y vitalidad de espermatozoides se debe a la toxicidad causada por el Cd que promueve cambios degenerativos en varios tejidos incluyendo al testículo, por lo que además de inducir una disminución en la concentración de T también disminuye la presencia de antioxidantes e induce estrés oxidativo que incrementa la expresión de marcadores asociados a la apoptosis de células de Sertoli y células germinales (Alkhedaide *et al.*, 2016), entre las células que causa apoptosis el Cd se encuentran los espermatocitos primarios y secundarios e igualmente reduce la población y vitalidad de espermatogonias debido a que se modifica el medio en el que se encuentran (Asadi *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2020), también como se mencionó anteriormente, debido a que el Cd ocasiona un aumento en la permeabilidad de la barrera hematotesticular causa alteraciones en las uniones entre las células que la integran y origina necrosis en las células de Sertoli y las células germinales (Marettová *et al.*, 2015), por lo que el Cd al altera la homeostasis testicular y reducir la población de las células presentes en los túbulos seminíferos causa problemas de fertilidad relacionados con la disminución en la concentración y la vitalidad de los espermatozoides debido a fallas en la espermatogénesis (Skolarczyk *et al.*, 2018). Los bajos valores que obtuvimos en la evaluación de los espermatozoides después de la exposición al Cd también se podrían relacionar con la entrada de este metal al epitelio del epidídimo, debido a que cada tipo celular contribuye favorablemente al establecimiento y regulación de un ambiente luminal único que beneficia al mantenimiento de la concentración, vitalidad, maduración y almacenamiento de los espermatozoides (Souza *et al.*, 2017), sin embargo la alteración y mal diferenciación del epitelio epididimario repercuten en los parámetros espermáticos y en la fertilidad (Carvajal *et al.*, 2018) como ha sido observado en investigaciones dónde se administró Cd y se observaron alteraciones en espermatozoides y en el epitelio epididimario (Asadi *et al.*, 2013; Adamkovicova *et al.*, 2014).

Los cambios en la membrana del espermatozoide durante el tránsito a través del epidídimo son de gran importancia para el proceso de fertilización (Gervasi y Visconti, 2017). Estas modificaciones incluyen la glicosilación y la modificación y/o eliminación de carbohidratos (Teclé y Gagneux, 2015) para formar el glicocáliz de la membrana del espermatozoide, que es necesario para que el

espermatozoide penetre en el *cumulus oophorus*, reconozca la zona pelúcida y fertilice el ovocito (Cheon y Kim, 2015).

Hasta ahora, no se sabía, si el Cd afecta el proceso de glicosilación durante la maduración de los espermatozoides del epidídimo. El marcaje de carbohidratos mediante su unión específica con lectinas y la citometría de flujo permiten explorar la composición del glicocáliz espermático (Xin *et al.*, 2016). En este trabajo, reportamos los efectos del Cd en la maduración de los espermatozoides del epidídimo considerando los cambios en los carbohidratos de membrana (N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa) revelados por marcaje con lectinas específicas. Pudimos observar los patrones de carbohidratos, determinar sus índices de fluorescencia y documentar los cambios en su distribución en la membrana del espermatozoide durante el tránsito a través del epidídimo. Informes referentes a la membrana de los espermatozoides afirman que el carbohidrato N-acetilglucosamina juega varios papeles porque es necesario para la adquisición de la movilidad del espermatozoide (Tourzani *et al.*, 2018), el reconocimiento de gametos (González-Santos *et al.*, 2019), el inicio de la reacción acrosomal y en la unión espermatozoide-ovocito (Wu y Sampson, 2014; Teclé y Gagneux, 2015). Mientras tanto, el ácido siálico proporciona la carga negativa a la membrana del espermatozoide para ayudarlo a llegar al sitio de fertilización (Ma *et al.*, 2016; Fernández-Fuentes *et al.*, 2018). En nuestros resultados, N-acetilglucosamina y ácido siálico estaban presentes en todos los grupos, principalmente en la cabeza del espermatozoide, un hallazgo que concuerda con estudios previos (Cortés *et al.*, 2004; Long, 2014; Wu y Sampson, 2014; Ma *et al.*, 2016). En las muestras de espermatozoides de los grupos tratados con Cd, observamos una disminución de aproximadamente un 30% en la presencia de carbohidratos, acompañada de alteraciones en la distribución en la membrana plasmática del espermatozoide, especialmente en las muestras del *corpus*. Una disminución que también se observó fue en el índice de fluorescencia de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico de las muestras de espermatozoides de los tres grupos tratados con Cd. En estudios previos, Tulsiani (2003; 2006) señaló que los residuos de N-acetilglucosamina se agregan a la membrana del espermatozoide por la enzima N-acetilglucosamintransferasa, que tiene mayor actividad entre la región distal del *caput* y la región proximal de la *cauda*, ambas regiones flanquean al *corpus*. El ácido siálico es añadido por la enzima sialiltransferasa, que es más activa en el *caput* proximal pero menos en la región distal de la *cauda* cerca del *corpus*. Estos hallazgos corroboran nuestros resultados, donde se obtuvieron índices de fluorescencia más altos para N-acetilglucosamina y ácido siálico en muestras del *corpus*, aunque los cambios en los grupos tratados con Cd no fueron significativos en todas las regiones del epidídimo. Los índices de fluorescencia obtenidos de las muestras de los grupos tratados con Cd podrían explicarse por la disminución en la concentración de

T y las alteraciones de las células epiteliales del epidídimo causadas por Cd, como se muestra en la histología de las tres regiones epididimarias, ya que se sabe que la glicosilación en el epidídimo depende de hormonas esteroides como la T (Lee, 2018), de forma directa no se ha evaluado y aclarado el mecanismo preciso por el cual el Cd afecta la adición de carbohidratos como N-acetilglucosamina y ácido siálico a la superficie de los espermatozoides por lo que aún es necesario analizar con mayor detalle estos efectos, lo que si ha sido observado en el caso del ácido siálico es que al surgir diferencias cualitativas y cuantitativas en su presencia se observan afecciones en la salud, en diferentes etapas de crecimiento celular, diferenciación, envejecimiento y transformación maligna (Schauer, 2004), en el estudio de Aktaş *et al.* (2010) evaluaron el efecto del Cd en el metabolismo del ácido siálico en diferentes tejidos de especímenes de *Cyprinus carpio* expuestos a concentraciones de 0.1, 0.5 and 1.0 ppm de Cd en 100 litros de agua por siete días y observaron que modificaba la concentración de ácido siálico de acuerdo con la dosis, no obstante no se ha evaluado los mecanismos y vías afectadas por estos cambios, tanto en la salud general del organismo como la de los tejidos estudiados, únicamente se ha relacionado esta causa con el incremento de los efectos tóxicos del Cd.

Los residuos de manosa se agregan a la membrana de los espermatozoides durante la espermatogénesis y se modifican a medida que maduran en el epidídimo (Jiménez *et al.*, 2003; Aliabadi *et al.*, 2013). Manosa es un carbohidrato importante en la capacitación, la reacción acrosomal (Aliabadi *et al.*, 2013) y en la unión a la zona pelúcida del ovocito en diferentes especies, incluidos los humanos (Jiménez *et al.*, 2006). De acuerdo con Gamzu *et al.* (2002) y Sharma *et al.* (2014), se encuentran residuos de manosa en la membrana del espermatozoide. En nuestro trabajo, los resultados obtenidos para el grupo Ctrl confirman la presencia de manosa en diferentes regiones de la membrana espermática; sin embargo, los hallazgos registrados en los grupos tratados con Cd muestran que la manosa estaba ausente en al menos el 25% de los espermatozoides analizados. Por lo tanto, es posible considerar que el Cd interfiera o modifique la actividad de manosiltransferasa, que es la enzima necesaria para agregar manosa durante el tránsito de los espermatozoides a través del epidídimo (Sharma *et al.*, 2014). Mediante citometría de flujo, observamos que el índice de fluorescencia de las muestras del grupo Ctrl en las tres regiones del epidídimo presentó el patrón reportado para presencia de manosa por Hall y Killian (1987), donde el mayor contenido de manosa en la membrana del espermatozoide se encontró entre las regiones del *caput* y el *corpus*, con una disminución en la *cauda*. En las muestras de nuestros grupos tratados con Cd observamos una disminución en el índice de fluorescencia en todas las regiones del epidídimo, aunque no fueron significativas al comparar entre si a los grupos tratados. Respecto a la participación de manosa en la inducción de la reacción acrosomal, se ha visto por Benoff *et al.* (1997) que en espermatozoides de humanos la disminución

de la expresión de sus receptores inhibe la reacción acrosomal, mientras que Méndez *et al.* (2011) señalan que la incubación de espermatozoides de eyaculados humanos *in vitro* en concentraciones de 2 y 4 ppm de CdCl₂ causa una reducción en el porcentaje de reaccionados, aunque sin diferencias significativas marcadas, por lo que es bueno analizar el efecto de la exposición a Cd en modelos *in vivo* como el que realizamos, para evaluar si la modificación de manosa durante la glicosilación de la membrana plasmática repercute en la reacción acrosomal de los espermatozoides maduros y asimismo comprender los efectos del Cd en la glicosilación de otros tipos celulares y órganos involucrados en procesos reproductivos, al respecto, Díaz *et al.* (2017) informaron que la administración de Cd a ratas hembras gestantes a una dosis de 10 µg/g de peso corporal tuvo un efecto perjudicial sobre el patrón de glicosilación de la placenta y reduce la unión de la lectina Con-A a manosa. Algo similar puede haber ocurrido en nuestro estudio en donde observamos una menor unión de la lectina de Con-A a manosa, pues como lo señala Díaz y colaboradores (2017) el Cd interfiere en los factores genéticos que dan pie a la formación de la estructura final de las glicoproteínas y es posible que el Cd induzca varios cambios epigenéticos que afecten los patrones de glicosilación, sin embargo esto se ha evaluado en una dosis mayor a las que administramos, por lo que está pendiente realizar estos análisis a menores dosis y en una correlación entre la unión lectina-carbohidrato y la actividad de glicosiltransferasas y glicosidasas como las que tiene relación con la presencia de manosa en espermatozoides.

La fucosa es un carbohidrato que facilita la unión de los espermatozoides a las proteínas de la zona pelúcida (Tulsiani y Abou-Haila, 2011) e interviene en la reacción acrosomal (Wu y Sampson, 2014). No se detectó la distribución de fucosa en la membrana del espermatozoide por microscopía de fluorescencia, pero por citometría de flujo se identificó un índice de fluorescencia, en valores más bajos que en los otros carbohidratos analizados. El índice de fluorescencia de fucosa en las muestras del grupo Ctrl fue mayor en el *corpus* que en el *caput* o *cauda*, mientras que los valores del índice en las muestras de los grupos tratados con Cd mostraron disminuciones en todas las regiones del epidídimo. En este sentido, Tulsiani (2003) encontró fucosilación en la membrana de los espermatozoides del epidídimo usando fucosa radiomarcada ([¹⁴C] fucosa) y visualizando glicopéptidos radiomarcados por autorradiografía descubrió que la mayor adición de [¹⁴C] fucosa a la membrana se produjo en los espermatozoides del *caput* distal (cerca del *corpus*), y que la actividad de la fucosiltransferasa en el epidídimo aumentó en el *caput* distal, pero disminuyó en la *cauda* (Ram *et al.*, 1989). Nuestros resultados se integran a esos hallazgos, ya que la mayor presencia de fucosa se encontró en los espermatozoides del *corpus*, una región inmediata al *caput* distal. Estos resultados dan pie a explorar más a detalle el hallazgo de Wu y Sampson (2014) en el que se señala que la

presencia de fucosa al igual que de manosa y N-acetilglucosamina en los espermatozoides de la *cauda* del epidídimo es necesaria para poder comenzar la reacción acrosomal, sin embargo, se ha descrito que el Cd interfiere en este proceso tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (Oliveira *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2017), por lo que aún hace falta estudios que relacionen la exposición a Cd con la presencia de fucosa u otros carbohidratos y la proporción de espermatozoides que tienen reacción. Es importante conjuntamente considerar que el Cd pudo haber causado las diferencias observadas en la concentración de fucosa en las muestras de espermatozoides de las tres regiones del epidídimo tras haber sido afectadas la síntesis y/o el funcionamiento de la enzima fucosiltransferasa, que está regulada por parte del epitelio epididimario (Ram *et al.*, 1989; Domino *et al.*, 2001) para su presencia en el líquido luminal (Tulsiani 2006). Sin embargo, la actividad de esta enzima no se midió en este estudio, y tampoco existen antecedentes directos, dado que los efectos y las consecuencias de la modificación en la presencia y concentración de fucosa en la membrana plasmática de espermatozoides por efecto de la exposición a Cd no han sido estudiados a profundidad hasta la fecha, sin embargo, en otros estudios se ha evaluado la participación que tiene la exposición de residuos de fucosa en la membrana de otras células, como en el caso de eritrocitos de rata en los que Ponomareva *et al.* (2005) observaron mediante estudios *in vitro* que el Cd incrementaba la lipoperoxidación tras favorecer el reconocimiento de fucosa por diferentes lectinas, por otra parte en el caso de células vegetales del tallo de *Medicago sativa*, Gutsch *et al.* (2019) observaron que tras la exposición prolongada a Cd se generaban cambios en la composición y la estructura de los polisacáridos de la pared celular, sin embargo aunque a partir del análisis de monosacáridos como manosa y fucosa no se encontraron diferencias significativas con su respectivo control, si se observó un incremento de proteínas de superficie relacionadas con la defensa de la planta las cuales eran ricas en polisacáridos, y que se pueden relacionar con que la presencia de fucosa no disminuya totalmente; consideramos que las diferencias en la composición de fucosa y de otros carbohidratos explorados en la superficie de los distintos tipos celulares expuestos a la toxicidad del Cd, se debe a que en el caso de células somáticas desde su interior se pueden generar respuestas de protección o adaptación para su supervivencia, mientras que los espermatozoides al ser células silenciadas transcripcionalmente dependen de la protección y de los cambios que les ofrecen órganos como el epidídimo para su supervivencia y el mantenimiento de las características que los hacen ser competentes.

Con base a los resultados obtenidos en este estudio, podemos proponer un mecanismo que explique el efecto que ocasiona el Cd sobre el proceso de glicosilación de la membrana espermática durante el paso por el epidídimo. El Cd suele ser transportado a través del torrente sanguíneo a diferentes órganos blanco, como es el caso del testículo y el epidídimo, en el testículo el Cd afectó a

los diferentes tipos celulares presentes, entre ellos a las células de Leydig en las que se sintetiza a la T así como a las células de Sertoli y a las germinales dentro de los túbulos seminíferos por lo que se afectó la concentración de espermatozoides, en el caso de las células del epitelio epididimario se ha descrito que el Cd puede entrar por medio de canales de Ca^{2+} y de transportadores de Zn, lo que ocasiono que se pudiera acumular entre sus tres regiones, esto indujo diversos daños a nivel histológico que en conjunto con la disminución en la concentración de T y los efectos de la entrada de Cd a las células del epidídimo, se pudieron haber afectado a las enzimas con actividad de glicosilación, lo que repercutió en la presencia y en la distribución de los carbohidratos analizados en la membrana plasmática de los espermatozoides de los grupos tratados con las distintas dosis de CdCl_2 a lo largo de las tres regiones del epidídimo, como se muestra en el modelo de la figura 15.

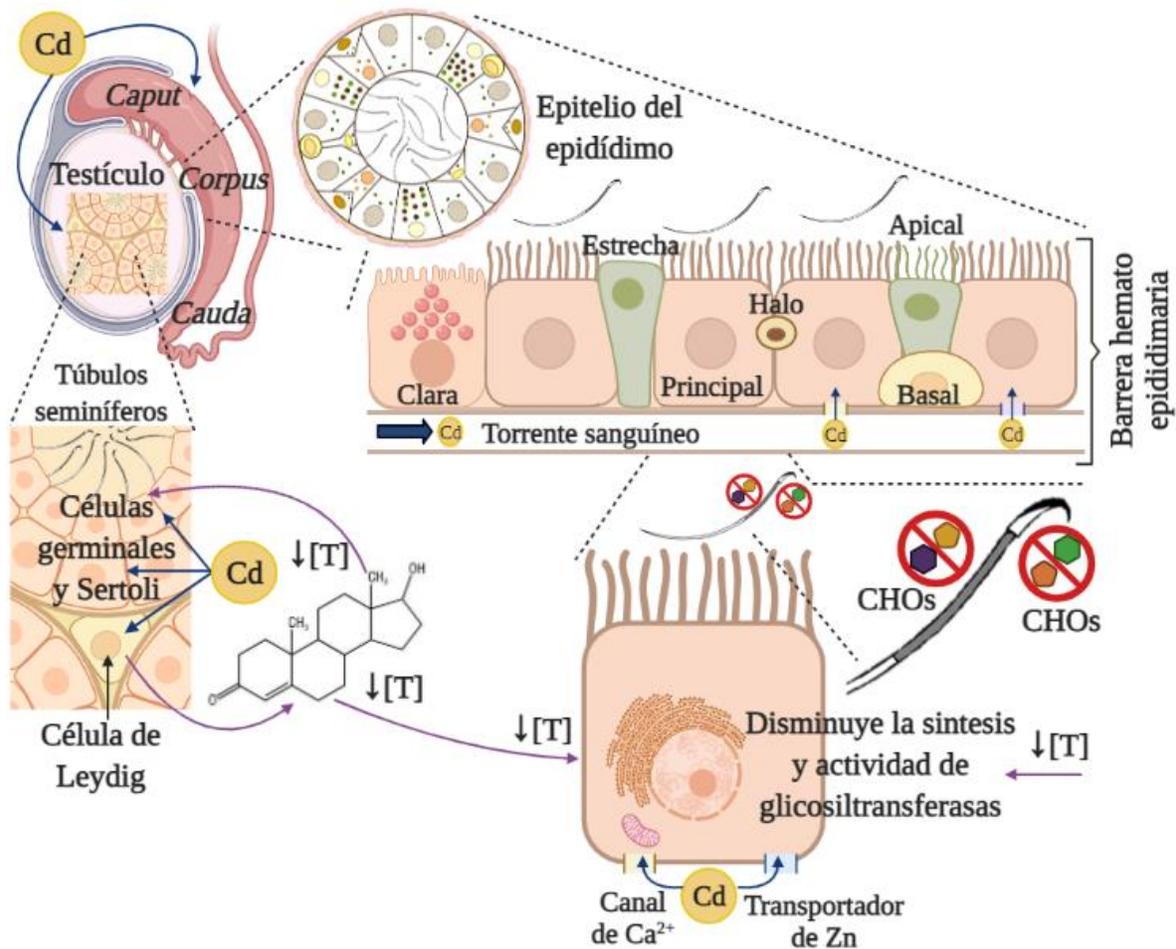


Figura 15. Modelo esquemático del mecanismo propuesto para explicar el efecto que genera el Cd sobre el proceso de glicosilación durante la maduración espermática epididimaria de la rata Wistar. El Cd afecta al epitelio del testículo y reduce la concentración y vitalidad de espermatozoides y la concentración de T, mientras que en el epidídimo afecta a las células del epitelio y a la adición de

carbohidratos (CHOs) que se incorporan en el proceso de glicosilación de la membrana plasmática de los espermatozoides durante la maduración espermática.

6. CONCLUSIONES

1. El Cd se bioacumula en las tres regiones del epidídimo aún después de ser administrado en dosis bajas.

2. El Cd altera la distribución y concentración de los carbohidratos analizados en la membrana plasmática de los espermatozoides en el epidídimo.

3. La exposición al Cd en estadios posnatales tempranos provoca una disminución de la concentración de T en ratas adultas.

4. El Cd provoca alteraciones en el epitelio epididimario que pueden afectar la funcionalidad del epidídimo.

5. El Cd modifica los procesos de glicosilación de la membrana plasmática del espermatozoide durante su tránsito y maduración por el epidídimo, ésta podría ser una de las causas de infertilidad idiopática en hombres expuestos.

7. PERSPECTIVAS

Las alteraciones observadas por el efecto del Cd en la presencia y patrones de distribución de los carbohidratos N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa en la membrana del espermatozoide durante su tránsito por el epidídimo, podrían ser causadas por la baja concentración de T, la acumulación de Cd y sus repercusiones en la funcionalidad de las células epiteliales del epidídimo, las cuales son altamente dependientes de la acción de los andrógenos y estrógenos (Robaire y Hamzeh, 2011). Otro aspecto importante a considerar es la síntesis y actividad de las enzimas con actividad de glicosilación que se encuentran presentes en el lumen del epidídimo (Carvelli *et al.*, 2014, Teclé y Gagneux, 2015), cuya síntesis es dependiente de la concentración de hormonas esteroides (Hermo *et al.*, 2019), por lo que su presencia puede verse afectada por el Cd. Por esta razón, consideramos que es importante que en futuros estudios se analicen la relación entre el Cd y la síntesis y actividad de las enzimas con actividad de glicosilación, asimismo que se correlacione la formación de EROs y la actividad de los sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos presentes en el epidídimo, la concentración de T y la presencia su receptor, ya que esto puede aportar más argumentos y causas de como el Cd tiene un efecto importante en la infertilidad masculina.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamkovicova, M., Toman, R., Cabaj, M., Massanyi, P., Martiniakova, M., Omelka, R., Krajcovicova, V., & Duranova, H. (2014). Effects of subchronic exposure to cadmium and diazinon on testis and epididymis in rats. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 632581. <https://doi.org/10.1155/2014/632581>

Adamkovicova, M., Toman, R., Martiniakova, M., Omelka, R., Babosova, R., Krajcovicova, V., Grosskopf, B., & Massanyi, P. (2016). Sperm motility and morphology changes in rats exposed to cadmium and diazinon. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 14(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0177-6>

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

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

Akintayo, A., & Stanley, P. (2019). Roles for Golgi Glycans in Oogenesis and Spermatogenesis. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 98. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00098>

Aktaç, T., Bakar, E., & Guner, U. (2010). The effects of short-term exposure to cadmium and copper on sialic acid in carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Fresenius Environmental Bulletin*. 19(3). 432-437.

Al-Fartosi, K.G., Al-Taae, H.I., Al-Haider, M.N., Hussein, K.A., Sachit, F., & Rashid, L. (2010). Cadmium acetate induced hematotoxicity, sperm abnormality and mutagenicity in rats. *Journal Thi-Qar of Science*, 2(1), 20-28. <https://www.jsci.utq.edu.iq/index.php/main/article/view/389>

Aliabadi, E., Karimi, F., & 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., & Attia, H. (2016). Protective effect of grape seed extract against cadmium-induced testicular dysfunction. *Molecular medicine reports*, 13(4), 3101–3109. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4928>

Anway, M. D., Cupp, A. S., Uzumcu, M., & Skinner, M. K. (2005). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5727), 1466–1469. <https://doi.org/10.1126/science.1108190>

Arain, M. B., Kazi, T. G., Baig, J. A., Afridi, H. I., Sarajuddin, Brehman, K. D., Panhwar, H., & Arain, S. S. (2015). Co-exposure of arsenic and cadmium through drinking water and tobacco smoking: risk assessment on kidney dysfunction. *Environmental science and pollution research international*, 22(1), 350–357. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3339-0>

Arenas-Ríos E., León-Galván M.A., Mercado P.E., & Rosado A. (2005). Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase during epididymal maturation and prolonged storage of spermatozoa in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Can. J. Zool.* 83, 1556–1565. <https://doi.org/10.1139/z05-152>

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 Antonio Violin Pereira, Eds. IntechOpen: 41-66. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/34558>

Arteaga-Silva, M., Arenas-Rios, E., Bonilla-Jaime, H., Damian-Matzumura, P., Limon-Morales, O., Hernandez-Rodriguez, J., & Marquez-Aguiluz, D. (2021). Neuroendocrine effects of cadmium exposure on male reproductive functions. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 26, 286–326. <https://doi.org/10.2741/4895>

Asadi, M. H., Zafari, F., Sarveasad, A., Abbasi, M., Safa, M., Koruji, M., Yari, A., & Alizadeh Miran, R. (2013). Saffron improves epididymal sperm parameters in rats exposed to cadmium. *Nephro-urology monthly*, 6(1), e12125. <https://doi.org/10.5812/numonthly.12125>

Ashraf, M. W. (2012). Levels of heavy metals in popular cigarette brands and exposure to these metals via smoking. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 729430. <https://doi.org/10.1100/2012/729430>

Bashir, N., Manoharav, V., & Prabu, S.M. (2014). Cadmium Toxicity: Oxidative Stress and Organ Dysfunction, *Research & Reviews: A Journal of Toxicology*. 4(2), 1–19.

Benoff, S., Hauser, R., Marmar, J. L., Hurley, I. R., Napolitano, B., & 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 (Cambridge, Mass.)*, 15(7-8), 248–262. <https://doi.org/10.2119/molmed.2008.00104>

Benoff, S., Hurley, I. R., Mandel, F. S., Cooper, G. W., & Hershlag, A. (1997). Induction of the human sperm acrosome reaction with mannose-containing neoglycoprotein ligands. *Molecular human reproduction*, 3(10), 827–837. <https://doi.org/10.1093/molehr/3.10.827>

Björndahl, L., Söderlund, I., & Kvist, U. (2003). Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human reproduction (Oxford, England)*, 18(4), 813–816. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg199>

Bovio, F., Sciandrone, B., Urani, C., Fusi, P., Forcella, M., & Regonesi, M. E. (2021). Superoxide dismutase 1 (SOD1) and cadmium: A three models approach to the comprehension of its neurotoxic effects. *Neurotoxicology*, 84, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.03.007>

Cardona-Maya, W. D., & Cadavid, A. P. (2005). Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N-acetilglucosamina [Evaluation of the role of the monosaccharides, mannose and N-acetylglucosamine in the induction of the acrosome reaction in human spermatozoa]. *Actas urológicas españolas*, 29(7), 676–684. [https://doi.org/10.1016/s0210-4806\(05\)73318-0](https://doi.org/10.1016/s0210-4806(05)73318-0)

Carvajal, G., Brukman, N.G., Weigel Muñoz, M. et al. (2018). Impaired male fertility and abnormal epididymal epithelium differentiation in mice lacking CRISP1 and CRISP4. *Sci Rep* 8, 17531. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35719-3>

Carvelli, L., Bannoud, N., Aguilera, A. C., Sartor, T., Malossi, E., & Sosa, M. A. (2014). Testosterone influences the expression and distribution of the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor in rat epididymis. Implications in the distribution of enzymes. *Andrologia*, 46(3), 224–230. <https://doi.org/10.1111/and.12065>

Castillo-Villanueva, A., & Abdullaev, F. (2005). Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer [Plant lectins and their effects on cancer]. *Revista de investigación clínica; órgano del Hospital de Enfermedades de la Nutrición*, 57(1), 55–64.

Cervantes, M. I., Arenas-Rios, E., León-Galván, M. A., López-Wilchis, R., Ambriz, D., & Rosado, A. (2008). Spermatozoa epididymal maturation in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Systems biology in reproductive medicine*, 54(4-5), 196–204. <https://doi.org/10.1080/19396360802334466>

Chandra, A., Srinivasan, K. R., Jamal, F., Mehrotra, P. K., Singh, R. L., & 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 (Cambridge, England)*, 135(6), 761–770. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0525>

Chen, C., Wang, N., Nie, X., Han, B., Li, Q., Chen, Y., Zhai, H., Zhu, C., Chen, Y., Xia, F., Lu, M., Lin, D., & Lu, Y. (2016). Blood Cadmium Level Associates with Lower Testosterone and Sex Hormone-Binding Globulin in Chinese men: from SPECT-China Study, 2014. *Biological trace element research*, 171(1), 71–78. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0526-x>

Cheon, Y. P., & Kim, C. H. (2015). Impact of glycosylation on the unimpaired functions of the sperm. *Clinical and experimental reproductive medicine*, 42(3), 77–85. <https://doi.org/10.5653/cerm.2015.42.3.77>

Cichy, B., Jaroszek, H. y Pasezek, A. 2014. Cadmium in phosphate fertilizers; ecological and economical aspects, *CHEMIK*, 68(10): 837-842.

Cortés, P. P., Orihuela, P. A., Zúñiga, L. M., Velásquez, L. A., & Croxatto, H. B. (2004). Sperm binding to oviductal epithelial cells in the rat: role of sialic acid residues on the epithelial surface and sialic acid-binding sites on the sperm surface. *Biology of reproduction*, 71(4), 1262–1269. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.027474>

Cui, X., Jing, X., Wu, X., & 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. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5840>

Cyr, D. G., Dufresne, J., & Gregory, M. (2018). Cellular junctions in the epididymis, a critical parameter for understanding male reproductive toxicology. *Reproductive toxicology* (Elmsford, N.Y.), 81, 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.08.013>

Cyr, D. G., Dufresne, J., Pillet, S., Alfieri, T. J., & Hermo, L. (2001). Expression and regulation of metallothioneins in the rat epididymis. *Journal of andrology*, 22(1), 124–135.

Dacheux, J. L., & Dacheux, F. (2013). New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction* (Cambridge, England), 147(2), R27–R42. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0420>

Dacheux, J. L., Belleannée, C., Jones, R., Labas, V., Belghazi, M., Guyonnet, B., Druart, X., Gatti, J. L., & Dacheux, F. (2009). Mammalian epididymal proteome. *Molecular and cellular endocrinology*, 306(1-2), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.03.007>

Damm, O. S., & Cooper, T. G. (2010). Maturation of sperm volume regulation in the rat epididymis. *Asian journal of andrology*, 12(4), 578–590. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.50>

Demir, S., & Öner, G. (1995). The Effects of Cadmium on The Fragility of Red Blood Cell. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*. 8(2), 73-78.

Díaz, M. C., González, N. V., Zanuzzi, C. N., Najle, R., & Barbeito, C. G. (2017). Lectin histochemistry for detecting cadmium-induced changes in the glycosylation pattern of rat placenta. *Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission*, 92(1), 36–45. <https://doi.org/10.1080/10520295.2016.1185668>

Domino, S. E., Zhang, L., Gillespie, P. J., Saunders, T. L., & Lowe, J. B. (2001). Deficiency of reproductive tract alpha (1,2) fucosylated glycans and normal fertility in mice with targeted deletions of the FUT1 or FUT2 alpha (1,2) fucosyltransferase locus. *Molecular and cellular biology*, 21(24), 8336–8345. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.24.8336-8345.2001>

Dubé, E., & Cyr, D. G. (2013). The blood-epididymis barrier and human male fertility. *Advances in experimental medicine and biology*, 763, 218–236. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4711-5_11

Fernandez-Fuertes, B., Blanco-Fernandez, A., Reid, C. J., Meade, K. G., Fair, S., & Lonergan, P. (2018). Removal of sialic acid from bull sperm decreases motility and mucus penetration ability but increases zona pellucida binding and polyspermic penetration in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)*, 155(6), 481–492. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0429>

Fierro, R., Foliguet, B., Grignon, G., Daniel, M., Bene, M. C., Faure, G. C., & Barbarino-Monnier, P. (1996). Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction: modifications judged by electron microscopy/flow cytometry. *Archives of andrology*, 36(3), 187–196. <https://doi.org/10.3109/01485019608987095>

Galicia-García, V., Rojas-López, M., Rojas, R., Olaiz, G., & Ríos, C. (1997). Cadmium levels in maternal, cord and newborn blood in Mexico City. *Toxicology letters*, 91(1), 57–61. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(97\)03869-1](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(97)03869-1)

Gamzu, R., Yogev, L., Amnon, B., Kleiman, S., Hauser, R., Lessing, J. B., Paz, G., & Yavetz, H. (2002). The expression of mannose-ligand receptor is correlated with sperm morphology. *Archives of andrology*, 48(6), 475–480. <https://doi.org/10.1080/01485010290099273>

Gervasi, M. G., & Visconti, P. E. (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology*, 5(2), 204–218. <https://doi.org/10.1111/andr.12320>

González-Santos, J.A., Ávalos-Rodríguez, A., Martínez-García, J.A., Rosales-Torres, A.M., & Herrera-Barragán, J.A. (2019). Sperm Morphophysiology in Different Sections of the Rooster Reproductive Tract. *International Journal of Morphology*, 37(3), 861-866. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022019000300861>

Gregory, M., & Cyr, D. G. (2014). The blood-epididymis barrier and inflammation. *Spermatogenesis*, 4(2), e979619. <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979619>

Gutsch, A., Sargento, K., Keunen, E. *et al.* (2019). ¿La exposición prolongada al cadmio influye en la composición de los polisacáridos pécticos en la pared celular de los tallos de *Medicago sativa*? *BMC Plant Biol* 19, 271. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1859-y>

Hall, J. C., & 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. <https://doi.org/10.1095/biolreprod36.3.709>

Hamada, T., Tanimoto, A., & Sasaguri, Y. (1997). Apoptosis induced by cadmium. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 2(4), 359–367. <https://doi.org/10.1023/a:1026401506914>

Haouem, S., Najjar, M. F., El Hani, A., & 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: official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 59(5), 307–311. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2007.10.002>

Hermo, L., Oliveira, R. L., Smith, C. E., Au, C. E., & Bergeron, J. (2019). Dark side of the epididymis: tails of sperm maturation. *Andrology*, 7(5), 566–580. <https://doi.org/10.1111/andr.12641>

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 proteínacarbohidrato. *REB*, 24(1), 21-27.

Hernández-Rodríguez, J., Montes, S., Arrieta-Cruz, I., Arenas-Ríos, E., Jiménez- Morales, I. y Arteaga-Silva, M. (2019). Efecto de la exposición al cadmio sobre los carbohidratos de la membrana plasmática y la fosforilación de proteínas de espermatozoides epididimarios de la rata Wistar, 193-230. En: Arenas-Ríos, E. & Fuentes-Mascorro, G. (Coordinadoras). *El Espermatozoide: una mirada desde México*. Primera edición, 2019. Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca. ISBN: 978-607-9061-69-2.

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. y Arteaga-Silva, M. 2016. Efecto del cadmio en la maduración espermática epididimaria. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(3): 11-21.

Hewetson, A., Do, H. Q., Myers, C., Muthusubramanian, A., Sutton, R. B., Wylie, B. J., & Cornwall, G. A. (2017). Functional Amyloids in Reproduction. *Biomolecules*, 7(3), 46. <https://doi.org/10.3390/biom7030046>

Huff, J., Lunn, R. M., Waalkes, M. P., Tomatis, L., & Infante, P. F. (2007). Cadmium-induced cancers in animals and in humans. *International journal of occupational and environmental health*, 13(2), 202–212. <https://doi.org/10.1179/oeht.2007.13.2.202>

Hussein M. A, Qater, Al-Nada A. Kanaem, Mohammad O. S. (2020). Relation of Some Heavy Metals with Male Infertility. *Medico Legal Update*, 20(1), 1440-1445. <https://doi.org/10.37506/mlu.v20i1.578>

Ignatz, G. G., Lo, M. C., Perez, C. L., Gwathmey, T. M., & 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. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.6.1806>

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

James, E. R., Carrell, D. T., Aston, K. I., Jenkins, T. G., Yeste, M., & Salas-Huetos, A. (2020). The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian Reproduction. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5377. <https://doi.org/10.3390/ijms21155377>

Järup L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin*, 68, 167–182. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032>

Järup, L., & Akesson, A. (2009). Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and applied pharmacology*, 238(3), 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.04.020>

Jenardhanan, P., Panneerselvam, M., & Mathur, P. P. (2016). Effect of environmental contaminants on spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, 59, 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.03.024>

Ji, Y. L., Wang, H., Liu, P., Wang, Q., Zhao, X. F., Meng, X. H., Yu, T., Zhang, H., Zhang, C., Zhang, Y., & Xu, D. X. (2010). Pubertal cadmium exposure impairs testicular development and spermatogenesis via disrupting testicular testosterone synthesis in adult mice. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 29(2), 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.10.014>

Jiménez, I., Fierro, R., González-Márquez, H., Mendoza-Hernández, G., Romo, S., & 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(6), 455–462. <https://doi.org/10.1080/01485010600694690>

Jiménez, I., González-Márquez, H., Ortiz, R., Herrera, J. A., Garcíá, A., Betancourt, M., & Fierro, R. (2003). Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 59(5-6), 1171–1180. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01175-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01175-5)

Kerkhofs, S., Dubois, V., De Gendt, K., Helsen, C., Clinckemalie, L., Spans, L., Schuit, F., Boonen, S., Vanderschueren, D., Saunders, P. T., Verhoeven, G., & Claessens, F. (2012). A role for selective androgen response elements in the development of the epididymis and the androgen control of the 5 α reductase II gene. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(10), 4360–4372. <https://doi.org/10.1096/fj.11-202283>

Khan, M. A., Khan, S., Khan, A., & Alam, M. (2017). Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. *The Science of the total environment*, 601-602, 1591–1605. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.030>

Knazicka, Z., Forgacs, Z., Lukacova, J., Roychoudhury, S., Massanyi, P., & Lukac, N. (2015). Endocrine disruptive effects of cadmium on steroidogenesis: human adrenocortical carcinoma cell line NCI-H295R as a cellular model for reproductive toxicity testing. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, 50(4), 348–356. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.987520>

Lacorte, L. M., Rinaldi, J. C., Justulin, L. A., Jr, Delella, F. K., Moroz, A., & Felisbino, S. L. (2015). Cadmium exposure inhibits MMP2 and MMP9 activities in the prostate and testis. *Biochemical and biophysical research communications*, 457(4), 538–541. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.019>

Lacorte, L. M., Seiva, F. R., Rinaldi, J. C., Delella, F. K., Moroz, A., Sarobo, C., Godinho, A. F., Fávaro, W. J., Fernandes, A. A., & Felisbino, S. L. (2013). Caffeine reduces cadmium accumulation in the organism and enhances the levels of antioxidant protein expression in the epididymis. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 35, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.10.009>

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: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 59, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.024>

Lamas, C. A., Cuquetto-Leite, L., do Nascimento da Silva, E., Thomazini, B. F., Cordeiro, G., Predes, F. S., Gollücke, A., & Dolder, H. (2017). Grape juice concentrate alleviates epididymis and sperm damage in cadmium-intoxicated rats. *International journal of experimental pathology*, 98(2), 86–99. <https://doi.org/10.1111/iep.12227>

Lee, J.H. (2018). Morphological changes of cauda epididymis, sperm infiltration into cauda epididymis, sperm storage and sperm disappearance of cauda epididymis in *Rhinolophus ferrumequinum korai* (Chiroptera: Rhinolophidae), *The European Zoological Journal*, 85(1), 118-127. doi:10.1080/24750263.2018.1445786.

Li, Y., Huang, Y. S., He, B., Liu, R., Qu, G., Yin, Y., Shi, J., Hu, L., & Jiang, G. (2020). Cadmium-binding proteins in human blood plasma. *Ecotoxicology and environmental safety*, 188, 109896. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109896>

Li, Y., Wu, J., Zhou, W., & Gao, E. (2016). Association between environmental exposure to cadmium and human semen quality. *International journal of environmental health research*, 26(2), 175–186. <https://doi.org/10.1080/09603123.2015.1061115>

Long, J.A. (2014). Applied andrology in chickens and Turkeys, In: *Animal Andrology: Theories and Applications*. P.J. Chenoweth, S.P. Lorton, Eds. London, UK: CABI. 197-225. <http://dx.doi.org/10.1079/9781780643168.0197>

Lucio, R.A., Tlachi, J.L., López, A.A., Zempoalteca, R. and Velázquez-Moctezuma, J. (2009). Analysis of the parameters of the ejaculate in the laboratory Wistar rat: technical description. *Veterinaria México*, 40(4), 405-415.

Ma, X., Pan, Q., Feng, Y., Choudhury, B. P., Ma, Q., Gagneux, P., & Ma, F. (2016). Sialylation Facilitates the Maturation of Mammalian Sperm and Affects Its Survival in Female Uterus. *Biology of reproduction*, 94(6), 123. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.137810>

Manna, P., Sinha, M., & Sil, P. C. (2008). Cadmium induced testicular pathophysiology: prophylactic role of taurine. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 26(3-4), 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.09.009>

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. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.018>

Marettová, E., Mareta, M., & Legáth, J. (2015). Toxic effects of cadmium on testis of birds and mammals: a review. *Animal reproduction science*, 155, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.01.007>

Matović V., Đukić-Ćosić D., Buha A., Bulat Z. (2013). Route, dose and duration of exposure to cadmium-relevance to oxidative stress induction. Bogaert L., Coppens N. (Eds.), *Peroxidases: Biochemical Characteristics, Functions and Potential Applications*, Nova Science Publishers, Inc, New York , pp. 159-175

Matović, V., Buha, A., Bulat, Z., & Đukić-Ćosić, D. (2011). Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 62(1), 65–76. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-62-2011-2075>

Matović, V., Buha, A., Đukić-Ćosić, D., & Bulat, Z. (2015). Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 78, 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.011>

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

Méndez, Y., Báez, F., & Villamediana, P. (2011). Efecto de la exposición in vitro de espermatozoides humanos a cadmio (CdCl₂). *Perinatol Reprod Hum*, 25(4), 198-204.

Messaoudi, I., El Heni, J., Hammouda, F., Saïd, K., & Kerkeni, A. (2009). Protective effects of selenium, zinc, or their combination on cadmium-induced oxidative stress in rat kidney. *Biological trace element research*, 130(2), 152–161. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8324-y>

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

National Institute of Health's (NIH). (2011). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council (US), Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington (DC): National Academies Press (US).

Neto, F. T., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S., & Goldstein, M. (2016). Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in cell & developmental biology*, 59, 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.04.009>

Nnadi, & Ngozi, N. (2018). Effects of Lead and Cadmium Concentration on Blood and Semen of Male Patients Consulting Fertility Clinic, Abakiliki, South-East Nigeria. *International Journal of Progressive Sciences and Technologies*, 7(1), 127-134. <http://dx.doi.org/10.52155/ijpsat.v7.1.357>

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. (2001). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio, Diario oficial de la Federación.

O'Donnell L. (2015). Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis*, 4(2), e979623. <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979623>

O'Hara, L., Welsh, M., Saunders, P. T., & 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. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0928>

Ohta, H., Qi, Y., Ohba, K., Toyooka, T., & Wang, R. S. (2019). Role of metallothionein-like cadmium-binding protein (MTLcDBP) in the protective mechanism against cadmium toxicity in the testis. *Industrial health*, 57(5), 570–579. <https://doi.org/10.2486/indhealth.2018-0177>

Oliveira, H., Spanò, M., Santos, C., & Pereira, M. (2009). Adverse effects of cadmium exposure on mouse sperm. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 28(4), 550–555. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.08.001>

Palma, C y Vinay, J.C. (2014). Infertilidad masculina, *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(1): 122-128.

Pant, N., Upadhyay, G., Pandey, S., Mathur, N., Saxena, D. K., & Srivastava, S. P. (2003). Lead and cadmium concentration in the seminal plasma of men in the general population: correlation

with sperm quality. *Reproductive toxicology* (Elmsford, N.Y.), 17(4), 447–450. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(03\)00036-4](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(03)00036-4)

Park, Y. J., Battistone, M. A., Kim, B., & Breton, S. (2017). Relative contribution of clear cells and principal cells to luminal pH in the mouse epididymis. *Biology of reproduction*, 96(2), 366–375. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.144857>

Pirard, C., Compere, S., Firquet, K., & Charlier, C. (2018). The current environmental levels of endocrine disruptors (mercury, cadmium, organochlorine pesticides and PCBs) in a Belgian adult population and their predictors of exposure. *International journal of hygiene and environmental health*, 221(2), 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.10.010>

Polykretis, P., Cencetti, F., Donati, C., Luchinat, E., & Banci, L. (2019). Cadmium effects on superoxide dismutase 1 in human cells revealed by NMR. *Redox biology*, 21, 101102. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101102>

Ponomareva, E. G., Bucharskaya, A. B., Kireev, R. A., & Nikitina, V. E. (2005). In vitro effect of fucose-specific lectins on rat erythrocyte membranes under normal conditions and during toxic stress. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 140(4), 413–415. <https://doi.org/10.1007/s10517-005-0506-9>

Povey, A. C., & Stocks, S. J. (2010). Epidemiology and trends in male subfertility. *Human fertility (Cambridge, England)*, 13(4), 182–188. <https://doi.org/10.3109/14647273.2010.515700>

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

Ram, P. A., Cardullo, R. A., & Millette, C. F. (1989). Expression and topographical localization of cell surface fucosyltransferase activity during epididymal sperm maturation in the mouse. *Gamete research*, 22(3), 321–332. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120220309>

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

Robaire, B., & Hamzeh, M. (2011). Androgen action in the epididymis. *Journal of andrology*, 32(6), 592–599. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.014266>

Roberts, K.P. & Chauvin, T.R. (2018). Molecular mechanisms of testosterone action on the testis. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 6, 29-33. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.03.003>

Rodríguez Tobón, A., Fierro, R., León Galván, M. A., Rosado, A., Cortés Barberena, E., & Arenas Ríos, E. (2021). Changes in membrane carbohydrates distribution associated to epididymal sperm maturation during the prolonged sperm storage period of *Corynorhinus mexicanus* bat (Chiroptera: Vespertilionidae). *ACTA ZOOLOGICA MEXICANA* (N.S.), 36(1), 1-12. <https://doi.org/10.21829/azm.2020.3612245>

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(6): 45-51.

Schauer R. (2004). Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology* (Jena, Germany), 107(1), 49–64. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2003.10.002>

Sengupta P. (2014). Metals and male reproduction: The possible mechanisms. *Advanced biomedical research*, 3, 129. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.133253>

Shalet S. M. (2009). Normal testicular function and spermatogenesis. *Pediatric blood & cancer*, 53(2), 285–288. <https://doi.org/10.1002/pbc.22000>

Sharma, V., Ichikawa, M., & Freeze, H. H. (2014). Mannose metabolism: more than meets the eye. *Biochemical and biophysical research communications*, 453(2), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.021>

Shum, W.W., Da Silva, N., Brown, D., & Breton, S. (2009). Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *The Journal of experimental biology*, 212(Pt 11), 1753–1761. <https://doi.org/10.1242/jeb.027284>

Siu, E.R., Mruk, D. D., Porto, C. S., & Cheng, C. Y. (2009). Cadmium-induced testicular injury. *Toxicology and applied pharmacology*, 238(3), 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.01.028>

Skolarczyk J., Budzyński M., Pekar J., Małecka-Massalska T., Skórzyńska-Dziduszko K. (2018). The impact of cadmium on male infertility. *Journal of Elementology*, 23(1), 35-44. doi:10.5601/jelem.2017.22.2.1320.

Sostaric, E., Aalberts, M., Gadella, B. M., & Stout, T. A. (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. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.011>

Souza, A.P., Schorr-Lenz, Â.M., Lucca, F., & Bustamante-Filho, I.C. (2017). The epididymis and its role on sperm quality and male fertility. *Animal reproduction*. 14(1), 1234–1244. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR955>.

Spiro R. G. (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 12(4), 43R–56R. <https://doi.org/10.1093/glycob/12.4.43r>

Sullivan, R. & Belleannée, C. (2018). Cell biology of the epididymis. In: Encyclopedia of Reproduction, 2nd edn (eds B Jegou & M Skinner), 286– 291. Elsevier, New York, NY, USA.

Sullivan, R. y Miesusset, R. 2016. The human epididymis: its function in sperm maturation, *Human Reproduction Update*, 22(5): 574–587. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw015>

Taha, E. A., Sayed, S. K., Ghandour, N. M., Mahran, A. M., Saleh, M. A., Amin, M. M., & 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. <https://doi.org/10.5173/cej.2013.01.art28>

Tajiri, S., Fukui, T., Sawaguchi, A., & 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(4), 141–146. <https://doi.org/10.2535/ofaj.88.141>

Tang, Zilue (2007) Cadmium Effects of Metallothionein Expression in Epididymal Epithelium of Rat. Master's Thesis, University of Pittsburgh. (Unpublished) <http://d-scholarship.pitt.edu/8115/>

Tariba-Lovaković, B. (2020). Cadmium, arsenic, and lead: elements affecting male reproductive health. *Current Opinion in Toxicology*, 19, pp.7-14. doi:10.1016/j.cotox.2019.09.005.

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(2): 40-48.

Teclé, E., & Gagneux, P. (2015). Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycoalyx. *Molecular reproduction and development*, 82(9), 635–650. <https://doi.org/10.1002/mrd.22500>

Tourzani, D. A., Paudel, B., Miranda, P. V., Visconti, P. E., & Gervasi, M. G. (2018). Changes in Protein O-GlcNAcylation During Mouse Epididymal Sperm Maturation. *Frontiers in cell and developmental biology*, 6, 60. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00060>

Toyonaga, M., Kaihara, A., & 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. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0052>

Tulsiani D. R. (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(1), 18–27. <https://doi.org/10.1002/jemt.10313>

Tulsiani D. R. (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(1-2), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.025>

Tulsiani, D. R., & Abou-Haila, A. (2011). Molecular events that regulate mammalian fertilization. *Minerva ginecologica*, 63(2), 103–118.

Ujah, G. A., Nna, V. U., Agah, M. I., Omue, L. O., Leku, C. B., & Osim, E. E. (2017). Effect of quercetin on cadmium chloride-induced impairments in sexual behaviour and steroidogenesis in male Wistar rats. *Andrologia*, 50(2), 10.1111/and.12866. <https://doi.org/10.1111/and.12866>

Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C. J., Kuča, K., & Musílek, K. (2016). Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of toxicology*, 90(1), 1–37. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1579-5>

Wang, H. F., Chang, M., Peng, T. T., Yang, Y., Li, N., Luo, T., Cheng, Y. M., Zhou, M. Z., Zeng, X. H., & Zheng, L. P. (2017). Exposure to Cadmium Impairs Sperm Functions by Reducing CatSper in Mice. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 42(1), 44–54. <https://doi.org/10.1159/000477113>

Wang, J., Zhang, H., Zhang, T., Zhang, R., Liu, R., & Chen, Y. (2015). Molecular mechanism on cadmium-induced activity changes of catalase and superoxide dismutase. *International journal of biological macromolecules*, 77, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.037>

Wang, L., Xu, T., Lei, W. W., Liu, D. M., Li, Y. J., Xuan, R. J., & Ma, J. J. (2013). Correction: Cadmium-induced oxidative stress and apoptotic changes in the testis of freshwater crab, *Sinopotamon henanense*. *PLoS One*. 2013; 8(1): 10.1371/annotation/bae9fc08-fbfa-45b5-9d1d-0b8254d6efd5.

Wang, S., Ren, X., Hu, X., Zhou, L., Zhang, C., & Zhang, M. (2019). Cadmium-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated mitochondrial oxidative stress and the JNK signaling pathway in TM3 cells, a model of mouse Leydig cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 368, 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.02.012>

Wijesekara, G. U., Fernando, D. M., Wijerathna, S., & Bandara, N. (2015). Environmental and occupational exposures as a cause of male infertility. *The Ceylon medical journal*, 60(2), 52–56. <https://doi.org/10.4038/cmj.v60i2.7090>

Wong, E. W., & Cheng, C. Y. (2011). Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends in pharmacological sciences*, 32(5), 290–299. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.01.001>

World Health Organization (WHO). (2020). Infertility is a global public health issue. [ONLINE] Available at: <https://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/en/>

World Health Organization (WHO). (2021). WHO Manual for the Laboratory Examination and Processing of Human Semen. sixth edition. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 292 pp.

Wu, L., & Sampson, N. S. (2014). Fucose, mannose, and β -N-acetylglucosamine glycopolymers initiate the mouse sperm acrosome reaction through convergent signaling pathways. *ACS chemical biology*, 9(2), 468–475. <https://doi.org/10.1021/cb400550j>

Wu, X., Guo, X., Wang, H., Zhou, S., Li, L., Chen, X., Wang, G., Liu, J., Ge, H. S., & Ge, R. S. (2017). A brief exposure to cadmium impairs Leydig cell regeneration in the adult rat testis. *Scientific reports*, 7(1), 6337. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06870-0>

Xin, A., Cheng, L., Diao, H., Wu, Y., Zhou, S., Shi, C., Sun, Y., Wang, P., Duan, S., Zheng, J., Wu, B., Yuan, Y., Gu, Y., Chen, G., Sun, X., Shi, H., Tao, S., & Zhang, Y. (2016). Lectin binding of human sperm associates with DEFB126 mutation and serves as a potential biomarker for subfertility. *Scientific reports*, 6, 20249. <https://doi.org/10.1038/srep20249>

Xu, D. X., Shen, H. M., Zhu, Q. X., Chua, L., Wang, Q. N., Chia, S. E., & 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*, 534(1-2), 155–163. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(02\)00274-7](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(02)00274-7)

Yari, A., Asadi, M. H., Bahadoran, H., Dashtnavard, H., Imani, H., & Naghii, M. R. (2010). Cadmium toxicity in spermatogenesis and protective effects of L-carnitine in adult male rats. *Biological trace element research*, 137(2), 216–225. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8577-5>

Yari, A., Sarveazad, A., Asadi, E., Raouf Sarshoori, J., Babahajian, A., Amini, N., Amidi, F., Bahadoran, H., Joghataei, M. T., Asadi, M. H., & Shams, A. (2016). Efficacy of *Crocus sativus* L. on reduction of cadmium-induced toxicity on spermatogenesis in adult rats. *Andrologia*, 48(10), 1244–1252. <https://doi.org/10.1111/and.12568>

Zeng, X., Jin, T., Buchet, J. P., Jiang, X., Kong, Q., Ye, T., Bernard, A., & Nordberg, G. F. (2004). Impact of cadmium exposure on male sex hormones: a population-based study in China. *Environmental research*, 96(3), 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.02.004>

Zhao, H., Yu, C., He, C., Mei, C., Liao, A., & Huang, D. (2020). The Immune Characteristics of the Epididymis and the Immune Pathway of the Epididymitis Caused by Different Pathogens. *Frontiers in immunology*, 11, 2115. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02115>

Zhao, L. L., Ru, Y. F., Liu, M., Tang, J. N., Zheng, J. F., Wu, B., Gu, Y. H., & Shi, H. J. (2017). Reproductive effects of cadmium on sperm function and early embryonic development in vitro. *PloS one*, 12(11), e0186727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186727>

Zhou, W., De Iuliis, G. N., Dun, M. D., & Nixon, B. (2018). Characteristics of the Epididymal Luminal Environment Responsible for Sperm Maturation and Storage. *Frontiers in endocrinology*, 9, 59. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00059>

Zhu, Q., Li, X., & Ge, R. S. (2020). Toxicological Effects of Cadmium on Mammalian Testis. *Frontiers in genetics*, 11, 527. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00527>

PUBLICACIONES GENERADAS Y EN COLABORACIÓN DURANTE EL DOCTORADO

Hernández-Rodríguez, J., Arenas-Ríos, E., Jiménez-Morales, I., Cortés-Barberena, E., Montes, S., Viguera-Villaseñor, R. M., & Arteaga-Silva, M. (2021). Postnatal cadmium administration affects the presence and distribution of carbohydrates in the sperm membrane during maturation in the epididymis in adult Wistar rats. *Reproduction, fertility, and development*, 33(5), 349–362. <https://doi.org/10.1071/RD20167>

Hernández-Rodríguez, J., López, A. L., Montes, S., Bonilla-Jaime, H., Morales, I., Limón-Morales, O., Ríos, C., Hernández-González, M., Viguera-Villaseñor, R. M., & Arteaga-Silva, M. (2021). Delay in puberty indices of Wistar rats caused by Cadmium. Focus on the redox system in reproductive organs. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 99, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.11.010>

Arteaga-Silva, M., Arenas-Ríos, E., Bonilla-Jaime, H., Damian-Matzumura, P., Limón-Morales, O., Hernández-Rodríguez, J., & Márquez-Aguiluz, D. (2021). Neuroendocrine effects of cadmium exposure on male reproductive functions. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 26, 286–326. <https://doi.org/10.2741/4895>

Grael-Amador, M. A., Torres-Rodríguez, H. F., Jiménez-Andrade, J. M., Hernández-Rodríguez, J., Arteaga-Silva, M., & Montes, S. (2021). Cadmium exposure negatively affects the microarchitecture of trabecular bone and decreases the density of a subset of sympathetic nerve fibers innervating the developing rat femur. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 34(1), 87–96. <https://doi.org/10.1007/s10534-020-00265-x>

Arteaga-Silva, M., Limón-Morales, O., Flores-Mancilla, L., Hernández-Rodríguez, J., Rojas-Castañeda, J.C., Viguera-Villaseñor, R.M., Montes-López, S. y Bonilla-Jaime, H. 2017. La influencia de los metales pesados en la función reproductiva: alteraciones vinculadas al plomo, mercurio y cadmio. En Medina-Fragoso, A.C., Hernández-González, M., Amezcua-Gutiérrez, C. & Guevara-Pérez, M.A. (Eds.), *Psicobiología conductual y cognitiva*. 139-181 pp. Ciudad de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México. ISBN: 978-607-02-8732-9.

Hernández-Rodríguez, J., Togno-Peirce, C., Bonilla-Jaime, H., Montes-López, S., Damián-Matzumura, P., Guzmán García, X. y Arteaga-Silva, M. 2018. Efecto del cadmio en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo. En: Galar-Martínez, M., Ramírez-Romero, P., Gasca-Pérez, E., Gómez-Oliván, L.M., Zavala-Aguirre, J.L., Arzate-Cárdenas, M.A., Rico-Martínez, R. (Eds.), *Contribuciones al*

conocimiento de la ecotoxicología y química ambiental en México, volumen 2. 242-271. Ciudad de México, México: Instituto Politécnico Nacional.

Limón-Morales, O., Togno-Peirce, C., Hernández-Rodríguez, J., Bonilla-Jaime, H. y Arteaga-Silva, M. 2018. Efectos de la toxicidad por cadmio sobre la red neuroinmunoendocrina. En: Contreras-Gómez, A. (Ed.), *Acercamientos a la ciencia*, 129-152. Universidad Autónoma de Guerrero, Guerrero México. ISBN: 978-607-9440-45-9.

Hernández-Rodríguez Joel, Montes-López Sergio, Arrieta-Cruz Isabel, Arenas-Ríos Edith, Jiménez-Morales Irma, Arteaga-Silva Marcela. Efecto de la exposición al cadmio sobre los carbohidratos de la membrana plasmática y la fosforilación de proteínas de espermatozoides epididimarios de la rata Wistar. *El espermatozoide: una mirada desde México*. ACEPTACION: 2018/07/01. PUBLICACION: 2019/01/01. PAG. INICIAL: 193. PAG. FINAL: 230. PAIS: México. IDIOMA: español. Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca Primera edición, 2019 ISBN versión electrónica: 978-607-9061-69-2 ISBN versión impresa: 978-607-9061-68-5. Coordinadoras: Arenas-Ríos Edith y Fuentes-Mascorro Gisela.

9. ANEXOS

Postnatal cadmium administration affects the presence and distribution of carbohydrates in the sperm membrane during maturation in the epididymis in adult Wistar rats

Joel Hernández-Rodríguez^A, Edith Arenas-Ríos^B, Irma Jiménez-Morales^C,
Edith Cortés-Barberena^C, Sergio Montes^D, Rosa María Viguera-Villaseñor^E and
Marcela Arteaga-Silva^{B,F}

^ADoctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Av. San Rafael Atlixco 186, C.P. 09340, Ciudad de México, México.

^BDepartamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, C.P. 09340, Ciudad de México, México.

^CDepartamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, C.P. 09340, Ciudad de México, México.

^DDepartamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez, Insurgentes Sur 3877, Col. La Fama, C.P. 14269, Ciudad de México, México.

^EInstituto Nacional de Pediatría, Calzada México Xochimilco No. 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, C.P. 14370, Ciudad de México, México.

^FCorresponding author. Email: asm@xanum.uam.mx

Abstract. Cadmium (Cd) is a heavy metal related to a decrease in sperm parameters. The transit of spermatozoa through the epididymis is necessary to generate changes in the sperm membrane, such as the assembly of various carbohydrates that are added to the spermatozoan's surface to prepare it for successful fertilisation of the oocyte. No studies have yet analysed whether Cd alters the presence and distribution of these carbohydrates. We aimed to evaluate the changes induced by Cd in the distribution pattern of *N*-acetylglucosamine, sialic acid, mannose and fucose on the sperm membrane in the epididymis (e.g. caput, corpus, cauda) and if it alters the epididymal epithelium. Male Wistar pups were treated with Cd doses (0.125, 0.25 and 0.5 mg/kg) on postnatal days 1–49. At postnatal day 90, they were humanely killed, sperm samples were obtained from the epididymis and tissue samples were taken for histological analysis. Cd concentrations in the blood and epididymis increased in proportion to the dose administered and decreased the serum testosterone levels and sperm quality. Histological analysis revealed alterations in the epithelium in all Cd-treated groups. Cd altered the distribution patterns of carbohydrates and fluorescence indices. All these alterations affected the structure and functioning of sperm.

Keywords: cadmium, infertility, sperm epididymal maturation, membrane carbohydrates, testosterone.

Received 25 June 2020, accepted 14 January 2021, published online 19 February 2021

Introduction

Human infertility has increased (Durairajanayagam 2018) in recent decades and is now a health problem that affects otherwise healthy young couples who have failed to achieve clinical pregnancy after 12 months of regular unprotected sexual intercourse (WHO 2020a). As a result, more couples are seeking assisted reproduction methods to conceive and give birth to live children (Farquhar and Marjoribanks 2018). Various epidemiological reports suggest that ~40% of infertility problems are due to male factors (Kumar and Singh 2015; Cui *et al.* 2016), where fertility is assessed by parameters of the semen that include sperm concentration, viability, motility and morphology. An alteration in one or

more of these parameters is considered a cause of infertility (Sharma 2017). In 40% of cases, however, these parameters are normal, but the sperm still shows suboptimal fertilisation capacity. Such undetermined causes of infertility are called idiopathic (Povey and Stocks 2010; Arrota *et al.* 2012). Several studies have demonstrated that fertility, both human and animal, can be altered by exposure to environmental chemicals (Carré *et al.* 2017). Numerous chemical pollutants have toxic effects on the endocrine system that can alter sperm production (Sengupta 2012; Nateghian and Aliabadi 2019), interfering with the function of the epididymis, where the spermatozoa are transformed into fertilisation-competent cells (Naiho *et al.* 2018).

Cadmium (Cd) is a heavy metal that affects male fertility (Badr and El-Habit 2018). Cd concentrations in the environment have increased because it is present in fossil fuels, incinerated waste and tobacco smoke, and is widely used in the iron and steel industry and in the manufacture of batteries, among many other products (Sharma *et al.* 2015). For example, the Cd in phosphate fertilisers and pesticides can pass through the trophic chain (Cichy *et al.* 2014); therefore, populations that consume contaminated agricultural products can suffer deleterious health effects and are at risk for many serious diseases (Agency for Toxic Substances and Disease Registry 2012). At the neuroendocrine level, Cd has adverse effects on the functioning of the hypothalamus–pituitary–testis (HPT) axis that impede the synthesis and/or regulation of gonadotropin-releasing hormone, luteinising hormone and follicle-stimulating hormone (Darbre 2003; Henson and Chedrese 2004), in addition to inhibiting the steroidogenic enzymes necessary for the steroidogenesis of testosterone (Wu *et al.* 2017; Li *et al.* 2019). Testosterone is important in the development and functioning of androgen-dependent reproductive organs such as the prostate, seminal vesicles and epididymis (Dohle *et al.* 2015). Cd causes cellular degeneration in the prostate and reduces the weight of the seminal vesicles in rats and mice and the epididymis in rabbits (Alaee *et al.* 2014).

The postnatal epididymal development in rats is divided into three major stages: (a) the undifferentiated period (postnatal days [PNDs] 1–15), characterised by an epithelium composed only of columnar cells; (b) the differentiation period (PND 15–49), when all cells differentiate into the adult cells and (c) the expansion period (after PND 49), characterised by growth of the duct and the appearance of spermatozoa in the lumen (Robaire and Hinton 2015). In adulthood, the epididymis is a single, coiled tubule composed of three regions: caput, corpus and cauda (Arrotia *et al.* 2012). Each region consists of a lumen covered by a pseudostratified epithelium that secretes and absorbs various molecules (proteins, glycoproteins, carbohydrates and electrolytes, among others) that modify the surface of the sperm membrane (Robaire and Hinton 2015). The transit of spermatozoa through the epididymis is necessary to generate the biochemical and physiological changes that allow the sperm cells to acquire motility and then recognise and penetrate the pellucid zone to fertilise an oocyte (Sullivan and Miesusset 2016). To achieve this, the components of the sperm membrane (i.e. proteins, lipids and carbohydrates) must be modified. The carbohydrate changes in the spermatozoa membrane are particularly important for their physiological properties (Gervasi and Visconti 2017). The carbohydrates that are added to the sperm membrane (*N*-acetylglucosamine and/or sialic acid, mannose, fucose and glycoconjugates) are assembled during development and maturation to form the glycocalyx. The sequence of events involved in this process can be taken as an indicator of the maturation of the epididymis (Tajiri *et al.* 2012; Cornwall 2014). Several studies of carbohydrate distribution in the sperm membrane show that epididymal maturation is associated with an increase or decrease in the bonding of specific lectins (proteins that recognise carbohydrates in specific ways) to the glycocalyx (Inskip and Hammerstedt 1982; Tajiri *et al.* 2012; Cheon and Kim 2015; Teclé and Gagneux 2015; Gervasi and Visconti 2017). In rats, enzymes such as sialyltransferase and fucosyltransferase, which add sialic acid and fucose to the sperm membrane, respectively, show distinct activity from caput to cauda (Tulsiani *et al.* 1993). Although studies

have shown that Cd can cause alterations in the epididymis that affect the parameters of sperm quality (Asadi *et al.* 2013) and alter the structure of the epididymal epithelium (Adamkovicova *et al.* 2014), no research has described whether Cd affects the biochemical changes that occur on the sperm membrane. Thus, the aim of the present study was to evaluate whether Cd causes alterations in the presence and distribution patterns of the carbohydrates, such as *N*-acetylglucosamine and/or sialic acid, mannose and fucose, on the sperm membrane during epididymal maturation.

Materials and methods

Animals

Gestating Wistar rats were housed individually at the Animal Care Centre of the Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa and maintained under a 12 h light–dark cycle with lights off at 08:00 hours and a temperature of $24 \pm 1^\circ\text{C}$ with *ad libitum* access to water and food (rat chow; Harlan Laboratories). Handling and all experimental procedures complied with the international regulations (National Institutes of Health 2011) and Mexico's Official Mexican Standard (NOM-062-ZOO-1999, Government of Mexico 2001) for the handling and care of laboratory animals. Newborn male rats were randomly assigned to one of four treatment groups, each with six pups, under the care of a surrogate mother ($n = 6$ pups/mother). After PND 1, the groups were treated as follows: the three experimental groups received intraperitoneal (i.p.) injections daily for 49 days of 0.125, 0.25 and 0.5 mg/kg according to bodyweight of cadmium chloride (CdCl_2 ; Sigma-Aldrich) diluted in saline solution. The control (Ctrl) group received 100 μL i.p. of saline solution. Based on earlier studies, we considered 49 days as the development period of the epididymal epithelium (Robaire and Hinton 2015). At day 21 (50 g of bodyweight), all pups were weaned and housed in the same groups of six according to their respective treatments.

Experimental procedure

At PND 90, the rats were euthanased by decapitation under anaesthesia. Peripheral blood samples were collected in two metal-free vacutainer tubes. The Cd blood concentrations were analysed by atomic absorption spectrophotometry from vacutainer tubes containing dipotassium EDTA (K2-EDTA). Blood serum was recovered by centrifugation to determine testosterone levels by radioimmunoassay (RIA), according to the manufacturer's instructions (Coat-A-Count[®] Total Testosterone; Siemens Healthcare Diagnostics).

The epididymides were dissected bilaterally and sectioned into their three anatomical regions: caput, corpus and cauda. The regions from the right epididymis were used to quantify Cd by atomic absorption spectrophotometry and to obtain tissue samples for fixing in Karnovsky's solution before histological analysis. The left epididymis provided the sperm cells to evaluate several parameters: concentration and viability by lectin labelling and the distribution patterns of *N*-acetylglucosamine and/or sialic acid, mannose and fucose by measuring the fluorescence index using fluorescein isothiocyanate-labelled lectins (FITC).

Cd concentrations in the blood and regions of the epididymis

Approximately 3 mL of peripheral blood samples were kept in vacutainer tubes containing K2-EDTA at 4°C until use. Tissue

samples of ~100 mg from each region of the epididymis were stored in polypropylene tubes at -20°C until analysis. Briefly, 200 μL of each blood sample were added to an 800- μL mixture of nitric, perchloric and sulfuric acids (5:2:1), while the tissue samples were added to 500 μL of concentrated nitric acid (Suprapur; Merck). After 7 days of immersion in these acid solutions, the samples were analysed in an Analyst 600 atomic absorption spectrophotometer (Perkin-Elmer) equipped with a graphite furnace and auto-sampler (AS800; Perkin-Elmer) with a hollow Cd cathode lamp adjusted to a wavelength of 228.8 nm. For each analysis, calibration curves were constructed using aqueous Cd reference standards (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 $\mu\text{g/L}$) (GFAA stock mixed standard; Perkin-Elmer). To optimise and validate the measurements, Cd measurements were performed at the beginning and end of each quality control analysis by analysing a previously digested standard solution of bovine liver (SRM 1577b – Bovine Liver, NIST). Concentrations in the blood samples were expressed as Cd $\mu\text{g/mL}$ and those in the tissue samples as Cd $\mu\text{g/g}$. Before each analysis, the glassware was cleaned by soaking in 3% nitric acid followed by several rinses with distilled water (Galicia-García *et al.* 1997).

Testosterone assay

Testosterone levels were measured by RIA using the Coat-A-Count Total Testosterone PITKTT-8 kit (Siemens Healthcare Diagnostics), which has a detection limit of 4 ng/dL. This kit has been validated in rodent models (mice, rats) by the Ligand Assay and Core Analysis Laboratory at the Center for Research in Reproduction at the University of Virginia, as described by Pirard *et al.* (2018). The testosterone antibody used here has a cross reactivity of 3.3% with 5α -dihydrotestosterone, 0.5% with other androgens, 0.01% with glucocorticoids and 0.02% with oestradiol. Average inter- and intra-assay coefficients of variation (CV) were calculated from a group of seven samples within the range of 0.2–8 ng/mL, which is the normal testosterone value in the plasma of adult male rats. The mean inter- and intra-assay CV values were 7.9 and 8.6%, respectively. Evaluations of the samples and standards were performed in duplicate using a gamma counter, following the manufacturer's instructions. The results were also estimated following those specifications.

Processing of epididymal tissue for histological analysis

The samples from the three regions of the epididymis were fixed in Karnovsky's solution, postfixed with 1% OsO_4 and processed for inclusion in EPON 812 (Ted Pella). Semi-thin, 1- μm -thick sections of the processed samples were obtained with an ultramicrotome Leica UCT (Leica), stained with 5% toluidine blue and mounted on slides. Histological analysis was performed by a single observer with an Olympus BX 51 optical microscope. For each group, 30 regions of the epididymal epithelium were analysed. The epididymal cell height and the area of the principal cells (the cell type that predominates in all three regions) were determined with Image-Pro[®] Plus (version 5.1; Media Cybernetics).

Epididymis dissection and sperm recovery

All procedures were performed at 36°C . The epididymides were isolated and cleared of fat and connective tissue. After

identifying the three regions (caput, corpus, cauda) they were dissected following the technique of Arenas-Ríos *et al.* (2005) and Cervantes *et al.* (2008). Each region was minced in 500 μL of Ringer's solution and maintained under slight stirring to allow sperm recovery. The sperm cells were collected with a Pasteur pipette and filtered through a fine mesh (98% nylon/polyamide, 2% lycra/elastane). The filtered cells were rinsed and centrifuged at 500g for 5 min. The resulting pellet was resuspended in 1000 μL of Ringer's solution. The cells from each epididymal region were evaluated and a final concentration was immersed in 1 mL of Ringer's solution.

Sperm evaluation

At the beginning of each analysis, the spermatozoa from each of the three regions of the epididymis were evaluated by a blinded observer. To assess the concentration ($10^6/\text{mL}$), 10 μL of the diluted samples of spermatozoa were placed in each of two Neubauer haemocytometer grids, and were observed with a $\times 40$ objective, counting the spermatozoa of five specific squares. The viability percentage was evaluated by eosin-nigrosin test. Briefly, 10 μL of the sample of spermatozoa were placed on a slide and mixed with 10 μL of the colorant. We observed 200 spermatozoa with a $\times 40$ objective. Stained spermatozoa were considered as dead and those not stained were considered as alive. Both parameters were evaluated following the criteria established by the World Health Organisation (2020b), adapted for the rat by Lucio *et al.* (2009).

Carbohydrate distribution and fluorescence index

Approximately 3×10^6 sperm cells from each region were incubated with FITC (Sigma) to recognise specific carbohydrates on the sperm membrane. The lectins used were *Triticum vulgare* agglutinin (WGA), *Canavalia ensiformis* agglutinin (Con-A) and *Ulex europaeus* agglutinin (UEA), which recognise sialic acid and/or *N*-acetylglucosamine, D-mannose and L-fucose, respectively. Each sample was incubated with 5 μL of the lectins previously diluted to 1:50 in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min at 36°C , and washed twice under centrifugation at 500g for 5 min with Ringer's solution. The pellet produced was fixed in 1% para-formaldehyde for 1 h at room temperature and washed again with PBS before analysis.

Carbohydrate distribution by epifluorescence microscopy

The sperm samples were examined with an epifluorescence microscope (Olympus BX51) using a specific filter for FITC (460 nm excitation, 490 nm fluorescence and 520 nm barrier filters). After identifying the different patterns of carbohydrate residues on the sperm membrane by lectin labelling, 100 spermatozoa were counted and classified according to the identified patterns. A fluorescence control was prepared for each sample (Fierro *et al.* 1996). Briefly, each lectin was incubated with its target carbohydrate (0.3 M) for 30 min, treated as described above and observed under the epifluorescence microscope.

Fluorescence index by flow cytometry

The sperm cell samples with 1×10^6 cells previously incubated with lectins were analysed in a flow cytometer (FACScan;

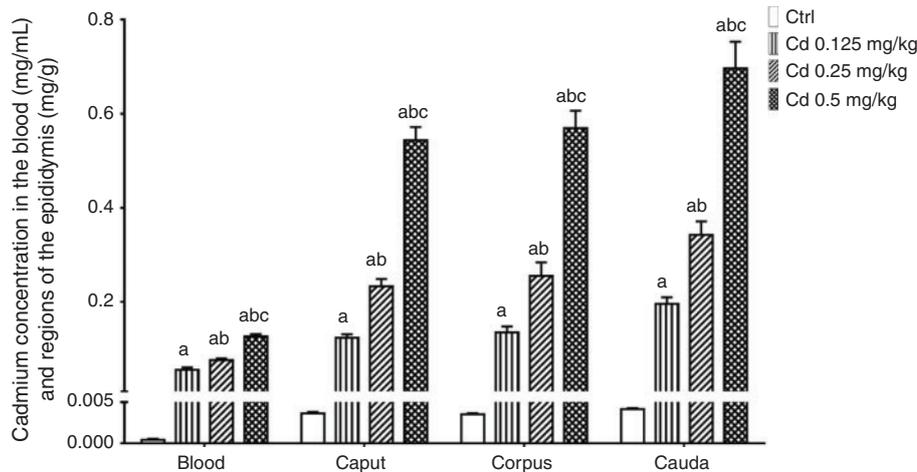


Fig. 1. Cadmium (Cd) concentrations in the blood and regions of the epididymis of rats. The data are expressed as mean \pm s.e.m ($n = 6$ /treatment group). ^a $P < 0.05$ Ctrl vs Cd-treated groups; ^b $P < 0.05$ Cd 0.125 vs Cd 0.25 and 0.5 mg/kg; ^c $P < 0.05$ Cd 0.25 vs 0.5 mg/kg.

Becton Dickinson Immunocytometry Systems). At least 10 000 events were stored and analysed. The fluorescence index of each sample was obtained from fluorescence intensity histograms compared with the number of marked cells. A control sample was prepared for each sample (Fierro *et al.* 1996) by preincubating the lectins with their corresponding inhibitory carbohydrate at 0.3 M for 30 min. The spermatozoa were then added to this solution and 10 000 events were analysed by flow cytometry.

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm s.e.m (standard error of the mean). The D'Agostino-Pearson omnibus test was used to verify the normality of the data. Each parameter was analysed by a one-way analysis of variance followed by a Tukey's test. Values obtained with a $P < 0.05$ were considered statistically significant. Statistical analyses were performed with the software package GraphPad Prism (version 6.01).

Results

Cd concentrations in the blood and regions of the epididymis

Fig. 1 shows the Cd concentrations in the blood and the caput, corpus and cauda of the epididymis for the four groups. Cd concentrations in the blood and all three regions increased in relation to the Cd dose administered to each group ($P < 0.05$). In addition, significant increases in Cd concentrations were found in the blood and epididymal regions when the Cd-treated groups were compared with their respective Ctrl groups ($P < 0.05$). A large increase in the Cd concentration in the cauda ($P < 0.05$) was seen in all treatment groups, with the highest values recorded in the group that received the 0.5 mg/kg dose.

Serum testosterone levels

Table 1 shows the serum testosterone levels at PND 90 for the Cd-treated groups and the Ctrl group. After 49 days of exposure to the different Cd doses, these testosterone levels showed significant decreases compared with the Ctrl group ($P < 0.05$). Serum

Table 1. Serum testosterone levels

Testosterone levels are shown in ng/mL. Data expressed as mean \pm s.e.m for all groups analysed ($n = 6$ /treatment group). ^a $P < 0.05$ Ctrl vs Cd treatment groups; ^b $P < 0.05$ Cd 0.125 vs Cd 0.25 and 0.5 mg/kg; ^c $P < 0.05$ Cd 0.25 vs 0.5 mg/kg. Cd, cadmium; Ctrl, control

Ctrl	Cd 0.125 mg/kg	Cd 0.25 mg/kg	Cd 0.5 mg/kg
2.504 \pm 0.101	1.133 \pm 0.026 ^a	0.755 \pm 0.059 ^{ab}	0.391 \pm 0.022 ^{abc}

testosterone levels also decreased in relation to the Cd dose administered to each group ($P < 0.05$).

Histological analysis of the epididymis

The sections from the Ctrl group showed regular round tubules with an epithelium marked by the presence of various cell types: basal cells, apical cells, clear cells and predominantly, principal cells with their characteristic microvilli and large quantities of epididymosomes. Vacuolisation is characteristic of the principal cells, but its presence decreased in the cauda. Other findings were that the concentration of spermatozoa in the lumen increased from the caput to the cauda (Fig. 2a–c). In the epididymal sections of the 0.125 mg/kg group (Fig. 2d–f), slight alterations were observed in the epithelium, including the presence of aberrant nuclei and increased vacuolisation towards the apical part of the cells in all three regions of the epididymis. In addition, a lower number of spermatozoa were observed in the lumen compared with the Ctrl group. We also noted that several of the spermatozoa preserved their cytoplasmic droplets.

The histological analyses of the epithelium sections from the 0.25 mg/kg group revealed a large amount of apical and basal vacuolisation in the clear cells and principal cells, with an evident presence of aberrant nuclei in the principal cells in the corpus (Fig. 2h) and cauda (Fig. 2i). A decrease in the amount of spermatozoa in the lumen was observed, which was more

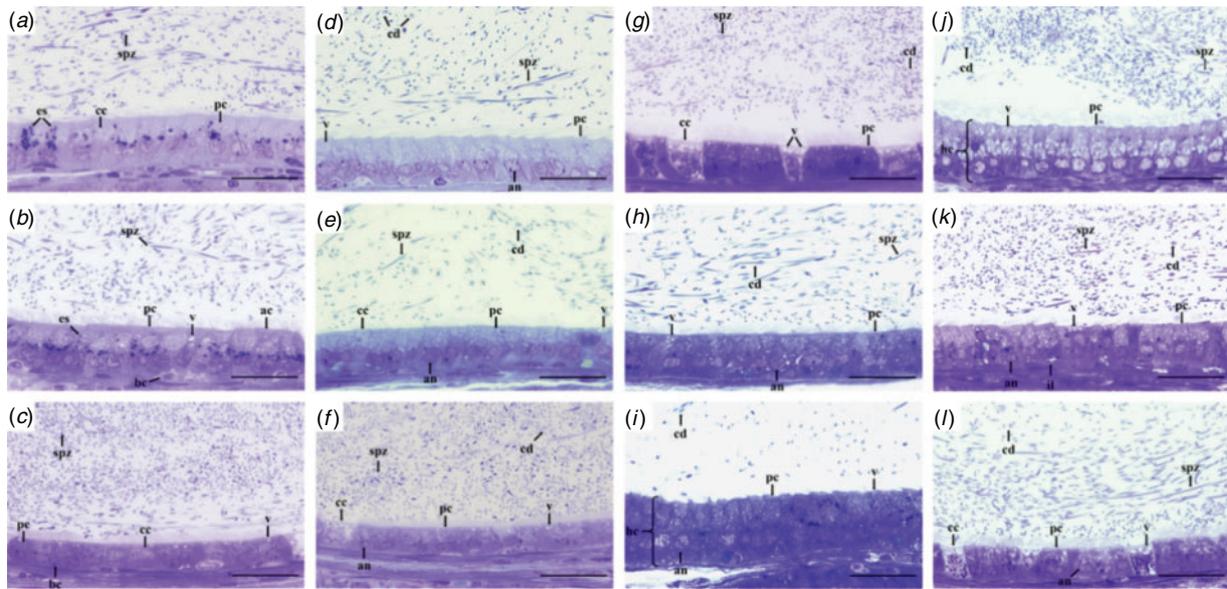


Fig. 2. Light micrographs revealing the alterations in the epithelium histology of the epididymal regions. Ctrl: (a) caput, (b) corpus, (c) cauda; Cd 0.125 mg/kg: (d) caput, (e) corpus, (f) cauda; Cd 0.25 mg/kg: (g) caput, (h) corpus, (i) cauda; Cd 0.5 mg/kg: (j) caput, (k) corpus, (l) cauda. Principal cell (pc); apical cell (ac); basal cell (bc); clear cell (cc); aberrant nucleus (an); cytoplasmic droplets (cd); epididymosomes (es); spermatozoa (spz); cellular hyperplasia (ch); vacuolisation (v); infranuclear lipids (il). Toluidine blue, $\times 60$. Bar 100 μm . Cd, cadmium.

Table 2. Effect of Cd on the epididymal cell height and the area of the principal cells

Data expressed as mean \pm s.e.m for all groups analysed ($n = 6/\text{treatment group}$). ^a $P < 0.05$ Ctrl vs Cd treatment groups; ^b $P < 0.05$ Cd 0.125 vs Cd 0.25 and 0.5 mg/kg; ^c $P < 0.05$ Cd 0.25 vs 0.5 mg/kg. Cd, cadmium; Ctrl, control

		Ctrl	Cd 0.125 mg/kg	Cd 0.25 mg/kg	Cd 0.5 mg/kg
Length (μm)	Caput	83.5 \pm 0.44	69.9 \pm 0.83 ^a	47.4 \pm 0.79 ^{ab}	86.7 \pm 0.86 ^{abc}
	Corpus	70.1 \pm 0.90	60 \pm 0.79 ^a	58.5 \pm 0.36 ^a	63.7 \pm 0.89 ^{abc}
	Cauda	36.8 \pm 1.01	48.6 \pm 1.14 ^a	80.8 \pm 2.47 ^{ab}	42.4 \pm 0.96 ^{abc}
Area (μm^2)	Caput	1853 \pm 23.3	1531 \pm 30.2 ^a	1233 \pm 33.5 ^{ab}	2034 \pm 27.2 ^{abc}
	Corpus	1775 \pm 26.2	1579 \pm 35.9 ^a	1555 \pm 40.6 ^a	1601 \pm 35.2 ^a
	Cauda	603 \pm 12	884 \pm 18.5 ^a	1987 \pm 52.8 ^{ab}	1018 \pm 20.7 ^{abc}

evident in the cauda (Fig. 2i), together with the persistence of cytoplasmic droplets in some spermatozoa. In the 0.5 mg/kg group we found the greatest number of alterations in every region of the epididymis. In the caput (Fig. 2j) and cauda (Fig. 2l), some principal cells and clear cells presented cellular hypertrophy, characterised by increased cell size compared with the Ctrl group and the 0.125 and 0.25 mg/kg groups. A large amount of vacuolisation was also present, which displaced the nuclei towards the base of the cells. The spermatozoa in the lumen of both regions decreased in number with respect to their Ctrl groups, and contained large amounts of cytoplasmic droplets. In the corpus (Fig. 2k), cellular hypertrophy and vacuolisation of the principal cells were observed with the presence of aberrant nuclei. There were also abundant infranuclear lipids located towards the basal region of the principal cells and clear cells. Spermatozoa with a large amount of cytoplasmic droplets were present in the lumen.

Table 2 presents data on the epididymal cell height and the area of the principal cells in the three regions of the epididymis. Both parameters of the principal cells decreased gradually from caput to cauda in the Ctrl group when compared with the Cd-treated groups ($P < 0.05$). In the caput and cauda, significant differences were observed in the epididymal cell height and the area of the principal cells in all three Cd-treated groups ($P < 0.05$). In the corpus, the epididymal cell height of the 0.5 mg/kg group was significantly greater ($P < 0.05$) than that of the 0.125 and 0.25 mg/kg groups. No significant differences were observed in the area of the principal cells in the corpus among the three Cd-treated groups.

Sperm evaluation

The effects of Cd on sperm concentration and viability are shown in Table 3. Cd decreased sperm concentrations

Table 3. Effect of Cd on spermatic evaluation

Data expressed as mean \pm s.e.m for all groups analysed ($n = 6/\text{treatment group}$). ^a $P < 0.05$ Ctrl vs Cd treatment groups; ^b $P < 0.05$ Cd 0.125 vs Cd 0.25 and 0.5 mg/kg; ^c $P < 0.05$ Cd 0.25 vs 0.5 mg/kg. Cd, cadmium; Ctrl, control

		Ctrl	Cd 0.125 mg/kg	Cd 0.25 mg/kg	Cd 0.5 mg/kg
Concentration ($\times 10^6/\text{mL}$)	Caput	68.29 \pm 1.05	50.45 \pm 1.53 ^a	47.57 \pm 1.44 ^a	23.55 \pm 2.11 ^{abc}
	Corpus	54.83 \pm 1.08	40.26 \pm 0.77 ^a	40.03 \pm 1.64 ^a	17.20 \pm 1.91 ^{abc}
	Cauda	74.10 \pm 1.85	53.08 \pm 1.55 ^a	51.19 \pm 1.68 ^a	25.58 \pm 3.37 ^{abc}
Viability (%)	Caput	96.17 \pm 0.31	91.83 \pm 0.40 ^a	89.50 \pm 0.56 ^{ab}	88.17 \pm 0.70 ^{ab}
	Corpus	96.50 \pm 0.43	91.17 \pm 0.60 ^a	89.50 \pm 0.42 ^a	88.50 \pm 0.76 ^{ab}
	Cauda	97.17 \pm 0.31	91.83 \pm 0.47 ^a	89.17 \pm 0.60 ^{ab}	87.33 \pm 0.76 ^{ab}

($P < 0.05$) in the samples from all three regions of the epididymis at the different doses administered (0.125, 0.25 and 0.5 mg/kg) compared with their respective Ctrl groups. The group that received the 0.5 mg/kg dose had the lowest sperm concentrations of the three Cd-treated groups ($P < 0.05$).

The viability percentages of the spermatozoa from the three regions of the epididymis of the Cd-treated and Ctrl groups are shown in Table 3. A significant decrease in this percentage was observed in all samples in a dose-dependent manner in the three epididymal regions of the Cd-treated groups compared with the Ctrl group ($P < 0.05$). Viability percentages in the caput, corpus and cauda were lower in the Cd-treated groups than in their respective Ctrl groups ($P < 0.05$). The 0.125 mg/kg group had higher viability in the caput and cauda than the groups exposed to Cd at 0.25 and 0.5 mg/kg ($P < 0.05$).

N-acetylglucosamine and/or sialic acid on the sperm membrane

Using lectin WGA allowed us to identify *N*-acetylglucosamine and/or sialic acid residues on the membrane of the spermatozoa obtained from the three epididymal regions of the Cd-treated and Ctrl groups. Four patterns of *N*-acetylglucosamine and/or sialic acid distribution were found (Fig. 3). In pattern 1, the *N*-acetylglucosamine and/or sialic acid covered the sperm membrane from the head to the distal region of the flagellum. The middle and principal pieces were also labelled. In pattern 2, the predominant labelling occurred in the head zone, while in pattern 3, labelling was observed in the head and the middle piece. There was no labelling in pattern 4; therefore, no fluorescence was observed (Fig. 3).

Fig. 4 shows the percentages of the distribution patterns for the labelling of *N*-acetylglucosamine and/or sialic acid with lectin WGA in the three epididymal regions. Pattern 1 had the lowest distribution percentages in all three regions in the Cd-treated groups. The caput and corpus showed significant decreases ($P < 0.05$) in the 0.25 and 0.5 mg/kg groups compared with their respective Ctrl groups. The cauda also showed a significant decrease ($P < 0.05$) in the distribution percentage in the Cd-treated groups compared with the Ctrl group. The dominant pattern in the Cd and Ctrl group samples was number 2, where there was a significant decrease in the percentage in the caput, corpus and cauda in the Cd-treated and Ctrl groups ($P < 0.05$). The caput of the 0.125 mg/kg group showed a

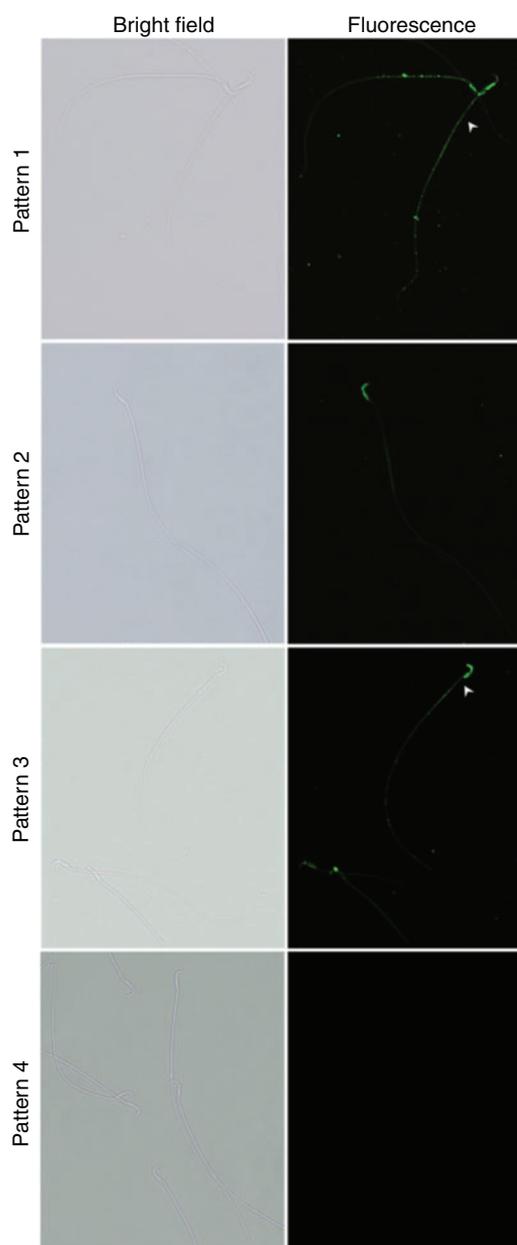


Fig. 3. Micrographs of the distribution patterns of the fluorescence of *N*-acetylglucosamine and/or sialic acid in spermatozoa. Bright-field and fluorescence microscopy, $\times 20$.

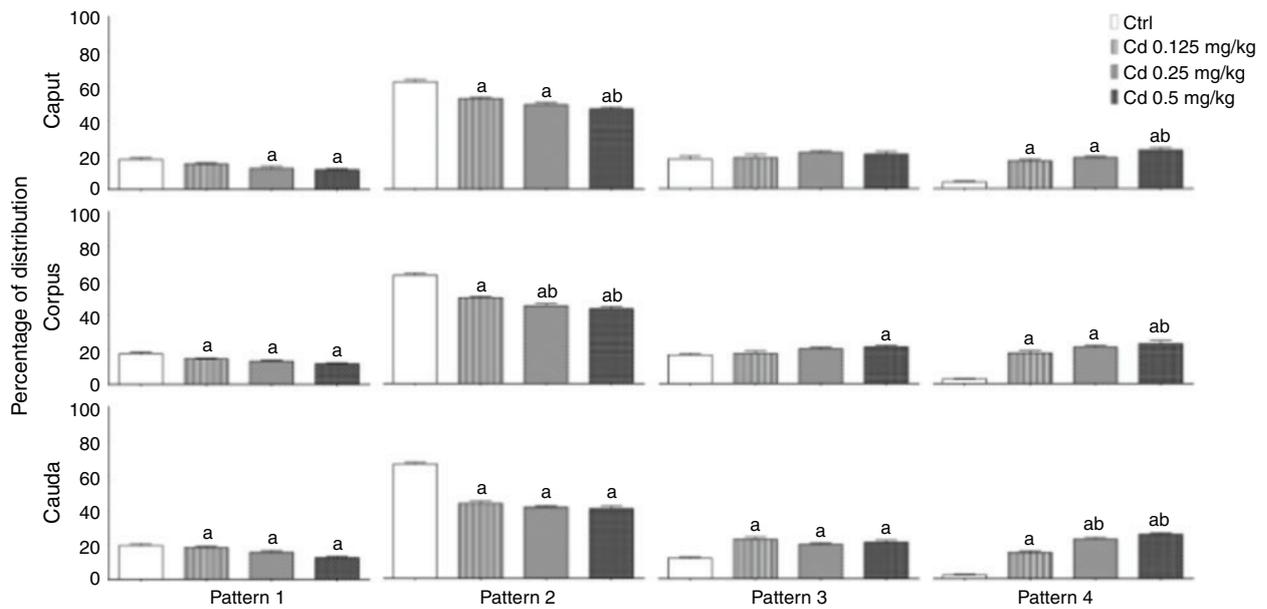


Fig. 4. Percentages of the distribution patterns of the fluorescence of *N*-acetylglucosamine and/or sialic acid in the membrane of spermatozoa from the three epididymal regions. The data are expressed as mean \pm s.e.m, $n = 6$ /treatment group. ^a $P < 0.05$ Ctrl vs Cd-treated groups; ^b $P < 0.05$ Cd 0.125 vs Cd 0.25 and 0.5 mg/kg; ^c $P < 0.05$ Cd 0.25 vs 0.5 mg/kg. Cd, cadmium.

significant increase in the distribution percentage with respect to the 0.5 mg/kg group ($P < 0.05$). Analyses of the corpus revealed a significant increase in the distribution percentage in the 0.125 mg/kg group compared with the other two treatment groups ($P < 0.05$). The samples from the cauda of the Cd-treated groups showed a significant decrease in the distribution percentage compared with their respective Ctrl groups ($P < 0.05$). For pattern 3, the percentage of distribution in the samples from the caput showed no significant differences between the Cd-treated and Ctrl group samples. In the samples from the corpus, only the 0.5 mg/kg group had a significant decrease in the distribution percentage compared with the Ctrl group ($P < 0.05$), while the cauda from all three Cd-treated groups showed significant increases compared with their Ctrl groups ($P < 0.05$).

The distribution percentage of pattern 4 (no fluorescence) increased in a dose-dependent manner in all samples from the Cd-treated groups ($P < 0.05$). The caput of the 0.125 and 0.25 mg/kg groups showed a significant decrease compared with the 0.5 mg/kg group ($P < 0.05$). The corpus also showed a significant decrease in the distribution percentage between the 0.125 mg/kg and 0.5 mg/kg groups ($P < 0.05$). Similarly, the cauda had a significant decrease in the distribution percentage in the 0.125 mg/kg group compared with the other two treatment groups ($P < 0.05$).

N-acetylglucosamine and/or sialic acid fluorescence index

Fig. 5 shows the fluorescence index of the spermatozoa labelled with WGA for *N*-acetylglucosamine and/or sialic acid from the three epididymal regions of the Cd-treated and Ctrl groups. The fluorescence indices of the treatment groups from all three epididymal regions showed significant decreases compared

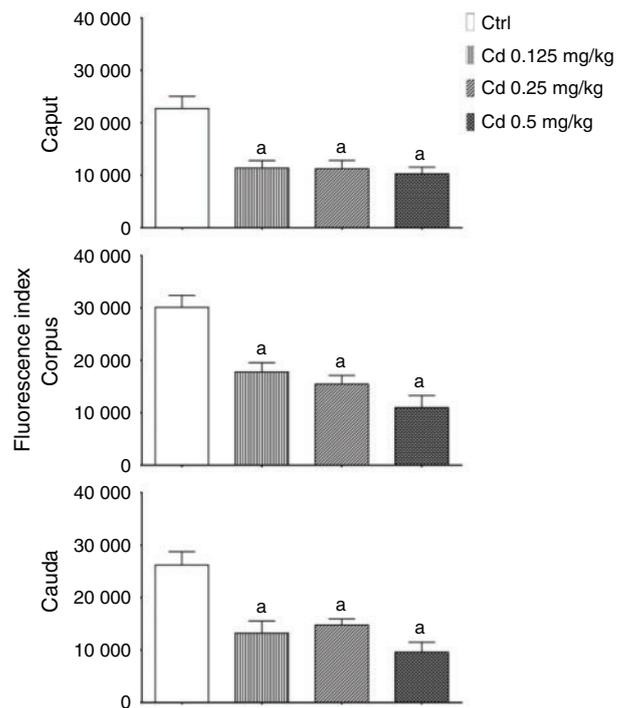


Fig. 5. Fluorescence index of *N*-acetylglucosamine and/or sialic acid in spermatozoa from the three epididymal regions. The data are expressed as mean \pm s.e.m, $n = 6$ /treatment group. ^a $P < 0.001$ Ctrl vs Cd-treated groups. Cd, cadmium.

with their respective controls ($P < 0.001$), but there were no significant differences among the three treatment groups. Compared with the corpus and cauda, the fluorescence index of

the samples of the caput from the Ctrl group and the 0.125 and 0.25 mg/kg groups presented the lowest values. The samples from the corpus had the highest fluorescence index in all three treatment groups. The Cd-treated groups also presented significant decreases compared with the Ctrl group ($P < 0.001$). The fluorescence index for the cauda decreased in all analysed samples, especially in the 0.5 mg/kg group, but significant decreases were apparent in all three Cd-treated groups compared with the Ctrl group ($P < 0.001$).

Mannose distribution on the sperm membrane

Mannose was identified using the lectin Con-A in all spermatozoa from the three epididymal regions in the Cd-treated and Ctrl groups. Once again, four distribution patterns were recognised (Fig. 6). In pattern 1, mannose was distributed mainly over the flagellum and only slightly on the head. Pattern 2 was characterised by distribution on the head, while in pattern 3, mannose was present on the head and middle piece. Pattern 4 showed no fluorescence of Con-A (Fig. 6). The percentages of the distribution patterns of mannose are shown in Fig. 7. In pattern 1, there were no significant differences in any epididymal region. Pattern 2 showed a significant decrease in the distribution percentages in the caput between the 0.25 and 0.5 mg/kg treatments compared with the Ctrl group ($P < 0.05$), but no significant differences in the corpus or cauda. Pattern 3 had the highest distribution percentages of the four study groups, as all samples from the caput, corpus and cauda showed significant decreases compared with their Ctrl groups. The corpus also showed a significant decrease between the 0.125 and 0.5 mg/kg groups ($P < 0.05$) and the cauda had significant decreases in all Cd-treated and Ctrl groups ($P < 0.05$). Pattern 4 presented the lowest distribution percentages of all the samples. In the caput, all Cd-treated groups showed significant increases compared with the Ctrl group samples ($P < 0.05$). The 0.125 mg/kg group had a significant decrease compared with the 0.25 and 0.5 mg/kg groups ($P < 0.05$). Finally, in the cauda, there were significant increases in all Cd-treated and Ctrl groups ($P < 0.05$).

Mannose fluorescence index

Fig. 8 shows the labelled spermatozoa fluorescence index for mannose from the three epididymal regions of the Cd-treated and Ctrl groups. Compared with the Ctrl group samples, those from the Cd-treated groups showed significant decreases in the fluorescence indices in all epididymal regions ($P < 0.001$). In this case, there were no significant differences among the three treatment groups. The sperm samples from the corpus region of the Cd-treated and Ctrl groups had the highest fluorescence indices, but no significant differences were found among the three Cd-treated samples. The fluorescence index of the spermatozoa from the samples of the cauda was lower than that of the samples from the corpus.

Fucose distribution and fluorescence index

After sperm incubation with UEA, no fucose fluorescence distribution patterns were detected on the sperm membrane of any sample by fluorescence microscopy, although the bright-field technique revealed the presence of cells. In this case, we used

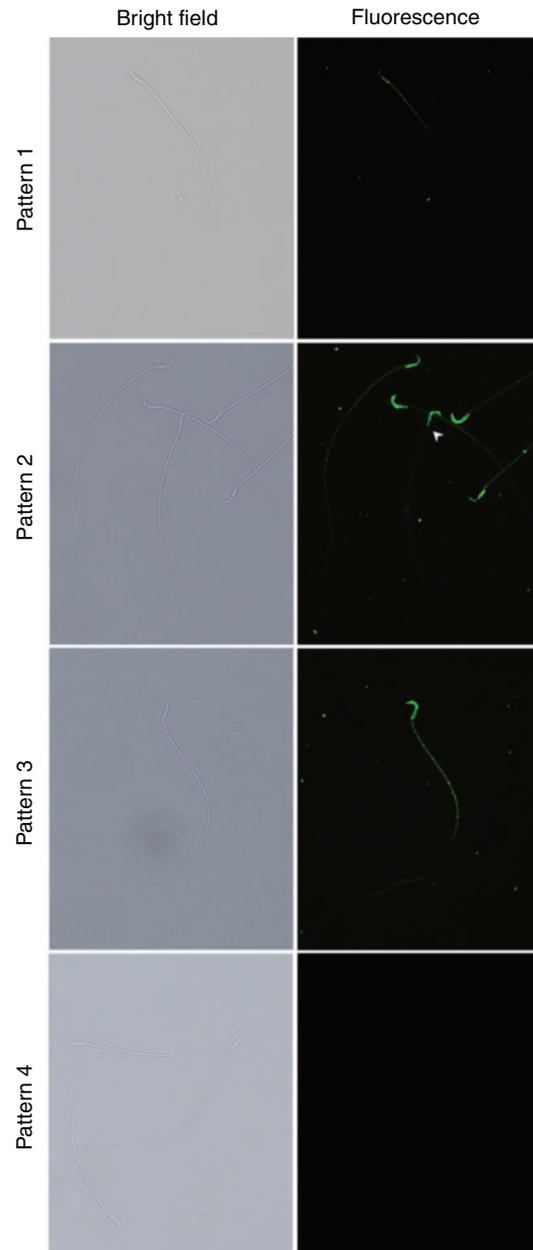


Fig. 6. Micrographs of the distribution patterns of the fluorescence of mannose in the spermatozoa. Bright-field and fluorescence microscopy, $\times 20$.

flow cytometry to quantify the fluorescence indices of the Cd-treated and Ctrl groups from each epididymal region (Fig. 9). Observations showed that each region had a decrease in the fluorescence index in the samples from the treatment groups compared with their Ctrl groups ($P < 0.001$), though there were no significant differences among the Cd-treated samples from each region. The lowest fluorescence index was obtained from the caput of the Cd-treated and Ctrl group samples. A slight increase was seen in the fluorescence index of all samples from the corpus. The highest fluorescence index was found in the corpus of the 0.125 mg/kg and Ctrl group samples.

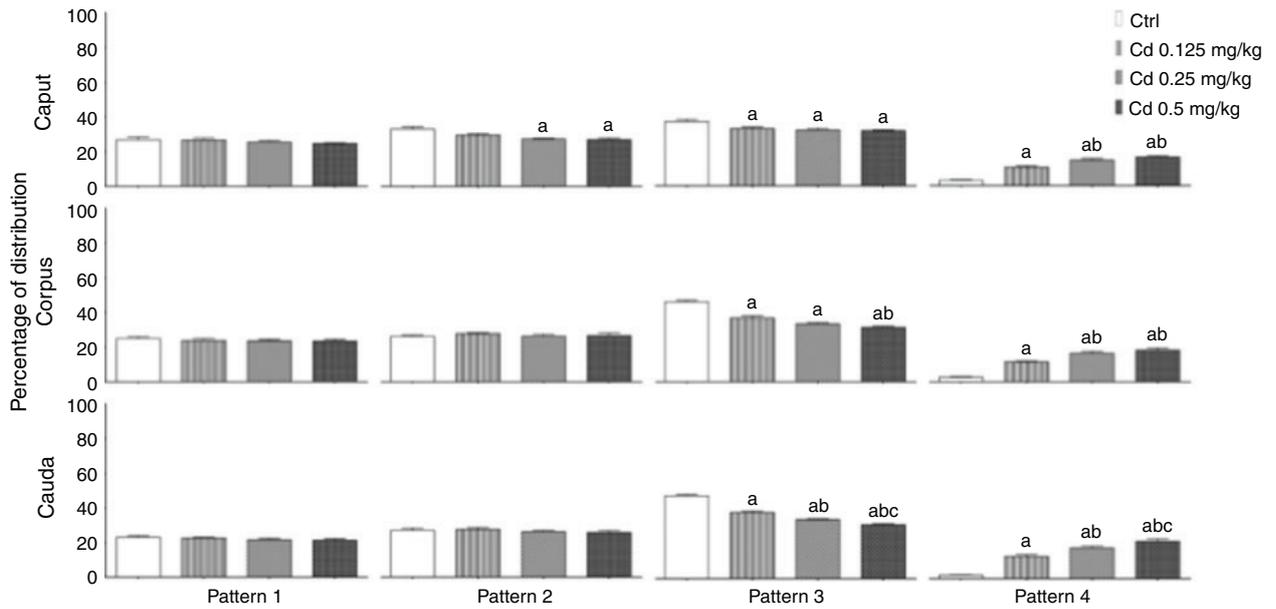


Fig. 7. Percentages of the distribution patterns of the fluorescence of mannose in the membrane of spermatozoa from the three epididymal regions. The data are expressed as mean \pm s.e.m, $n = 6$ /treatment group. ^a $P < 0.05$ Ctrl vs Cd-treated groups; ^b $P < 0.05$ Cd 0.125 vs Cd 0.25 and 0.5 mg/kg; ^c $P < 0.05$ Cd 0.25 vs 0.5 mg/kg. Cd, cadmium.

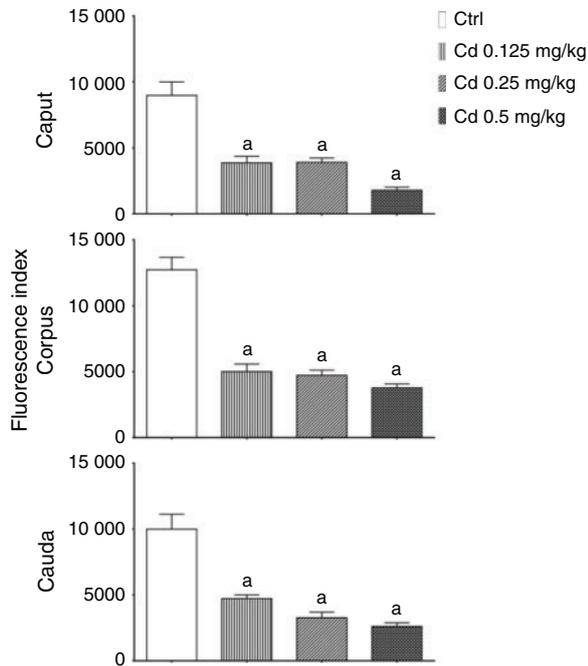


Fig. 8. Fluorescence index of mannose in spermatozoa from the three epididymal regions. The data are expressed as mean \pm s.e.m, $n = 6$ /treatment group. ^a $P < 0.001$ Ctrl vs Cd-treated groups. Cd, cadmium.

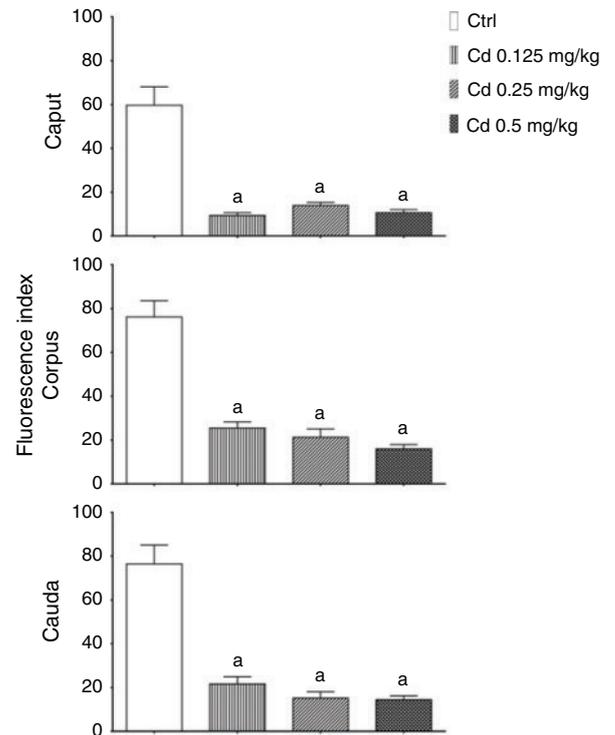


Fig. 9. Fluorescence index of fucose in spermatozoa from the three epididymal regions. The data are expressed as mean \pm s.e.M, $n = 6$ /treatment group. ^a $P < 0.001$ Ctrl vs Cd-treated groups. Cd, cadmium.

Discussion

Anthropogenic activities lead to Cd, a toxic agent, being present in the environment. It is well known that this heavy metal can have negative effects on both human and animal health. Cd can be found in water and food, including seeds, vegetables and seafood (Bashir *et al.* 2014), but has no biological functions (Khan *et al.* 2017). However, it can bioaccumulate significantly in the human body due to its slow rate of excretion in the urine (Arain *et al.* 2014). Cd also has a remarkably long half-life estimated at 20–40 years; therefore, exposure can lead to significant bioaccumulation in organisms (Marettová *et al.* 2015). Cd exposure has consequences for male sexual development and fertility because of its negative effects on the functioning of the HPT axis (Lafuente 2013) and other reproductive organs, including the prostate, seminal vesicles and epididymis (Sengupta 2014). This study verified the bioaccumulation of Cd in a dose-dependent manner in all three regions of the epididymis of male rats after administering this metal up to the end of puberty and then quantifying the amounts that persisted at PND 90. Our results concur with those of Lacorte *et al.* (2013), who reported higher Cd concentrations in the blood and epididymis of exposed males. The fact that Cd bonds to proteins such as albumin and transferrin (Li *et al.* 2020) allows it to reach several target organs. For example, in humans, Cd alkalis the luminal fluid in the epididymis and inhibits the H-ATPase function that is crucial for sperm storage and maturation (Nnadi and Ngozi 2018). Likewise, Cd affects the physiology of the testicle, increases apoptosis of Leydig cells and decreases testosterone synthesis (Wu *et al.* 2017; Tariba Lovaković 2020). The present study also quantified testosterone levels in the serum of adult rats, determining that these values decreased in a dose-dependent manner in the Cd-treated groups. Yari *et al.* (2016) obtained similar results; that is, they reported that after Cd administration, testosterone levels decreased with respect to a Ctrl group. This can be explained by referring to reports that Cd inhibits the expression of proteins such as StAR, cytochrome P450, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (Knazicka *et al.* 2015) and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, all of which are steroidogenic enzymes (Ji *et al.* 2010; Alkheddaide *et al.* 2016).

In our work, the epithelium of the three regions of the epididymis showed differences in height and the area of the principal cells in the Cd-treated groups, which could be related to the low testosterone levels found, because this organ is androgen-dependent (O'Hara *et al.* 2010; Kerkhofs *et al.* 2012). We observed that the epididymal cell height in the caput increased, especially in the Cd 0.5 mg/kg group, and that this was accompanied by a decrease in the lumen compared with the Ctrl. This is similar to the results of Lamas *et al.* (2017), who applied a dose of 1.2 mg/kg of Cd for 50 days. We consider that this change is due to the high number of alterations that occurred throughout the cytoplasm of the principal cells and the increase in vacuolisation in all three of our Cd-treated groups. Adamkovicova *et al.* (2014) also observed structural changes in the epididymal epithelium in the caput and cauda of adult rats following subchronic peroral administration of Cd at 30 mg/L. They emphasised the increase in the lumen and the presence of spermatozoa in these regions that showed a considerable

number of cytoplasmic droplets had adhered to the flagella, similar to our observations, but at lower Cd doses.

Another possible explanation of the changes seen in the epididymal epithelium is that Cd enters the epididymal cells in the same way as it penetrates other cell types; that is, by mimicking divalent metals such as calcium across the voltage-gated channel or Zn transporters (ZIP family; Zrp, Irt-related proteins), especially the ZIP-8 protein (Arteaga-Silva *et al.* 2021). There are also reports that Cd can induce oxidative stress and the formation of reactive oxygen species, which could indirectly inhibit the activity of antioxidant enzymes and proteins (Hamada *et al.* 1997; Wang *et al.* 2019). These changes in the epididymal epithelium could be associated with modifications of the expression and secretion of the proteins involved in sperm maturation and storage (O'Hara *et al.* 2010; Kerkhofs *et al.* 2012) and could consequently result in male infertility (Zhao *et al.* 2017).

With respect to the sperm evaluation performed in this study, the spermatozoa obtained from the caput and corpus, even at the lowest dose of Cd tested (0.125 mg/kg), showed decreases in both concentration and viability in all three epididymal regions. Similar results were obtained with the spermatozoa from the cauda region of adult rats exposed to 1 mg/kg of Cd by Asadi *et al.* (2013) and Yari *et al.* (2009, 2016). Other studies of human ejaculates (Benoff *et al.* 2009; Li *et al.* 2015) have reported a positive relationship between low sperm concentrations and the presence of Cd in the blood and seminal plasma. Low sperm concentrations after Cd exposure might also be explained by the entry of this metal into the epididymal epithelium, as mentioned above, or by the increasing permeability of the blood–testis barrier that would alter the cell gap junctions and the blood–epididymal barrier (Dubé and Cyr 2013), causing necrosis of Sertoli and germ cells (Marettová *et al.* 2015). This would affect sperm concentrations and viability because of failures in spermatogenesis (Skolarczyk *et al.* 2017).

The changes on the sperm membrane during transit through the epididymis are of great importance for the fertilisation process (Gervasi and Visconti 2017). These modifications include glycosylation and carbohydrate modification and/or removal (Teclé and Gagneux 2015) to form the glycocalyx of the sperm membrane, which is required for the sperm to penetrate the cumulus oophorus, recognise the pellucid zone and fertilise the oocyte (Cheon and Kim 2015).

Up to now, we did not know whether Cd affects the glycosylation process during epididymal sperm maturation. Lectin labelling and flow cytometry are among the best tools available for exploring the composition of the sperm glycocalyx (Xin *et al.* 2016). In this work, we report the effects of Cd on epididymal sperm maturation, considering the changes in membrane carbohydrates revealed by labelling (*N*-acetylglucosamine and/or sialic acid, mannose, and fucose) with specific lectins. We were able to observe the carbohydrate patterns, determine their fluorescence indices and document changes in their distribution on the sperm membrane during transit through the epididymis. Reports on the sperm membrane affirm that the carbohydrate *N*-acetylglucosamine plays various roles necessary for the acquisition of sperm motility (Tourzani *et al.* 2018), gamete recognition (González-Santos *et al.* 2019), the onset of

the acrosomal reaction (Wu and Sampson 2013) and sperm-oocyte binding (Wu and Sampson 2013; Tecle and Gagneux 2015). Meanwhile, sialic acid provides the negative charge on the sperm membrane to help it reach the fertilisation site (Ma *et al.* 2016; Fernandez-Fuertes *et al.* 2018). In our results, *N*-acetylglucosamine and sialic acid were present in all groups, mainly on the sperm head, a finding that concurs with previous studies (Cortés *et al.* 2004; Wu and Sampson 2013; Long 2014; Ma *et al.* 2016). In the sperm samples from the Cd-treated groups, we observed a decrease of ~30% in the presence of carbohydrates, accompanied by alterations in their distribution on the sperm membrane, especially in the samples from the corpus. A decrease was also observed in the fluorescence index of *N*-acetylglucosamine and/or sialic acid of the sperm samples from the three Cd-treated groups. In previous studies, Tulsiani (2003, 2006) pointed out that *N*-acetylglucosamine residues are added to the sperm membrane by the enzyme *N*-acetylglucosamine transferase, which has greater activity between the distal region of the caput and the proximal region of the cauda, both of which flank the corpus. Sialic acid is added by the sialyltransferase enzyme, which is more active in the proximal caput but less so in the distal region of the cauda close to the corpus. These findings corroborate our results, where higher fluorescence indices for *N*-acetylglucosamine and sialic acid were obtained in samples from the corpus, though the changes in the Cd-treated groups were not significant throughout the regions of the epididymis. The fluorescence indices obtained from the samples of the Cd-treated groups could be explained by decreases in testosterone levels and alterations of the epithelial cells of the epididymis caused by Cd, as shown in the histology of the three epididymal regions, as it is well known that glycosylation in the epididymis is dependent on steroid hormones such as testosterone (Lee 2018).

Mannose residues are added during spermatogenesis and modified as the epididymis matures (Jiménez *et al.* 2003; Aliabadi *et al.* 2013). This is an important factor in capacitation, the acrosomal reaction (Aliabadi *et al.* 2013) and binding to the pellucid zone of the oocyte in different species, including humans (Jiménez *et al.* 2006). According to Gamzu *et al.* (2002) and Sharma *et al.* (2014), mannose residues are found on the sperm membrane. In our work, the results obtained for the Ctrl group confirmed the presence of mannose in different regions of the sperm membrane; however, the findings from the Cd-treated groups show that mannose was absent in at least 25% of the spermatozoa analysed. Therefore, it is possible that Cd interferes with, or modifies, mannosyltransferase, which is the enzyme necessary for adding mannose during the spermatozoa's transit through the epididymis (Sharma *et al.* 2014). Using flow cytometry, we observed that the fluorescence index of the Ctrl group samples from the three epididymal regions presented the pattern reported for mannose by Hall and Killian (1987), where the highest mannose content on the sperm membrane was found in the caput and corpus regions, with a decrease in the cauda. In the samples of our Cd-treated groups we observed a decrease in the fluorescence index in all epididymal regions, though it was not significant. In this regard, Díaz *et al.* (2017) reported that Cd applied to pregnant dams at a dose of 10 µg/g of bodyweight had a deleterious effect on the

glycosylation pattern of the placenta and reduced the binding of the lectin Con-A to mannose. Something similar may well have occurred in our study.

Fucose is a carbohydrate that facilitates the sperm's union to the proteins of the pellucid zone (Tulsiani and Abou-Haila 2012) and intervenes in the acrosomal reaction (Wu and Sampson 2013). We were unable to detect fucose on the sperm membrane by fluorescence microscopy, but flow cytometry identified it at lower values than the other carbohydrates by fluorescence index. The fluorescence index of fucose in the Ctrl group samples was higher in the corpus than in the caput or cauda, while the index values in the samples from the Cd-treated groups showed decreases in all epididymal regions. In this regard, Tulsiani (2003) found fucosylation on the membrane of epididymal spermatozoa using radiolabelled fucose ($[^{14}\text{C}]$ fucose) and visualising radiolabelled glycopeptides by autoradiography. They found that the highest $[^{14}\text{C}]$ addition of fucose to the membrane occurred on spermatozoa from the distal caput (near the corpus) and that fucosyltransferase activity in the epididymis increased in the distal caput, but decreased in the cauda (Ram *et al.* 1989). Our results complement those findings (Tulsiani 2003), as the highest presence of fucose was found on spermatozoa from the corpus, a region proximal to the distal caput. These results also agree with Wu and Sampson's (2013) finding that the presence of fucose on epididymal spermatozoa was needed to begin the acrosomal reaction. It may well be that Cd caused the differences in the presence of fucose seen in the sperm samples from all three epididymal regions because it affects the expression and/or functioning of the fucosyltransferase enzyme, which is regulated by the epididymal epithelium (Ram *et al.* 1989; Domino *et al.* 2001) and is present in the luminal fluid (Tulsiani 2006). However, the activity of this enzyme was not measured in this study.

The disturbances due to Cd in the presence and distribution patterns of the carbohydrates *N*-acetylglucosamine and/or sialic acid, mannose and fucose on the sperm membrane during transit through the epididymis could be caused by low testosterone levels, the entrance of Cd and its repercussions on the functionality of the epithelial cells of the epididymis, which are highly androgen-dependent (Robaire and Hamzeh 2011). Another important aspect to consider is the synthesis and activity of the enzymes with glycosylation activity that are found along the epididymis (Iusem *et al.* 1984; Carvelli *et al.* 2013), because they are also dependent on androgens (Herme *et al.* 2019) and could be affected by Cd. For this reason, we believe it is important that future studies analyse the effect of Cd on the synthesis and activity of enzymes with glycosylation activity, as this may provide additional arguments to support the proposal that Cd plays an important role in male infertility.

Conclusion

Exposure to Cd in early postnatal stages of rats caused a decrease in testosterone levels and alterations in the epididymal epithelium that affected the structure and functioning of this organ and, in turn, affected glycosylation processes of the sperm membrane during transit.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank the DCBS at the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa for its financial support (CD.CBS.535.2018 and CD.CBS.373.2017) and CONACyT for the funding provided to Joel Hernández-Rodríguez (PhD student, Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, CVU/Becario: 622536/570248). The authors also thank Pedro Medina Granados of the Instituto Nacional de Pediatría for his invaluable support and assistance in processing the samples.

References

- Adamkovicova, M., Toman, R., Cabaj, M., Massanyi, P., Martiniakova, M., Omelka, R., Krajcovicova, V., and Duranova, H. (2014). Effects of Subchronic Exposure to Cadmium and Diazinon on Testis and Epididymis in Rats. *Sci. World J.* **2014**, 632581. doi:10.1155/2014/632581
- 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. pp. 487. Available at: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>.
- Alaee, S., Talaiekhazani, A., Rezaei, S., Alaei, K., and Yousefian, E. (2014). Cadmium and male infertility. *J. Infertil. Reprod. Biol.* **2**, 62–69.
- Aliabadi, E., Karimi, F., and Talaie-Khozani, T. (2013). Effects of L-Carnitine and Pentoxifylline on Carbohydrate Distribution of Mouse Testicular Sperm Membrane. *Iran. J. Med. Sci.* **38**(2), 107–115.
- Alkheldaide, A., Alshehri, Z., Sabry, A., Abdel-Ghaffar, T., Soliman, M., and Attia, H. (2016). Protective effect of grape seed extract against cadmium-induced testicular dysfunction. *Mol. Med. Rep.* **13**(4), 3101–3109. doi:10.3892/MMR.2016.4928
- Arain, M. B., Kazi, T., Baig, J., Afridi, H., Sarajuddin, Brehman, K., Panhwar, H., and Arain, S. (2014). Co-exposure of arsenic and cadmium through drinking water and tobacco smoking: Risk assessment on kidney dysfunction. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **22**(1), 350–357. doi:10.1007/S11356-014-3339-0
- Arenas-Ríos, E., León-Galván, M., Mercado, P., and Rosado, A. (2005). Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase during epididymal maturation and prolonged storage of spermatozoa in the Mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Can. J. Zool.* **83**(12), 1556–1565. doi:10.1139/Z05-152
- Arotia, K., Garcia, P., Barbieri, M., Justino, M., and Violin, L. (2012). The Epididymis: Embryology, Structure, Function And Its Role In Fertilization And Infertility. Embryology: Updates and Highlights on Classic Topics. (Ed. L.A. Violin-Pereira.) pp. 41–66. (InTech). doi:10.5772/35847.
- Arteaga-Silva, M., Arenas-Rios, E., Bonilla-Jaime, H., Damian-Matzumura, P., Limon-Morales, O., Hernandez-Rodriguez, J., and Marquez-Aguiluz, D. (2021). Neuroendocrine effects of cadmium exposure on male reproductive functions. *Front Biosci (Landmark Ed)* **26**, 286–326. doi:10.2741/4895
- Asadi, M. H., Zafari, F., Sarveazad, A., Abbasi, M., Safa, M., Koruji, M., Yari, A., and Alizadeh Miran, R. (2013). Saffron Improves Epididymal Sperm Parameters in Rats Exposed to Cadmium. *Nephrourol. Mon.* **6**(1), e12125. doi:10.5812/NUMONTHLY.12125
- Badr, F., and El-Habit, O. (2018). Heavy Metal Toxicity Affecting Fertility and Reproduction of Males. In 'Bioenvironmental Issues Affecting Men's Reproductive and Sexual Health', pp. 293–304. (Academic Press). doi:10.1016/B978-0-12-801299-4.00018-9.
- Bashir, N., Manoharav, V., and Prabu, S. M. (2014). Cadmium Toxicity: Oxidative Stress and Organ Dysfunction. *RRJoT.* **4**(2), 1–19.
- Benoff, S., Hauser, R., Marmar, J., Hurley, I., Napolitano, B., and Centola, G. (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). *Mol. Med.* **15**(7–8), 248–262. doi:10.2119/MOLMED.2008.00104
- Carré, J., Gatimel, N., Moreau, J., Parinaud, J., and Léandri, R. (2017). Does air pollution play a role in infertility?: a systematic review. *Environ. Health* **16**(1), 82. doi:10.1186/S12940-017-0291-8
- Carvelli, L., Bannoud, N., Aguilera, A., Sartor, T., Malossi, E., and Sosa, M. (2013). Testosterone influences the expression and distribution of the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor in rat epididymis. Implications in the distribution of enzymes. *Andrologia* **46**(3), 224–230. doi:10.1111/AND.12065
- Cervantes, M. I., Arenas-Ríos, E., Miguel Ángel, L., Ricardo, L., Demetrio, A., and Adolfo, R. (2008). Spermatozoa Epididymal Maturation in the Mexican Big-Eared Bat (*Corynorhinus Mexicanus*). *Syst Biol Reprod Med* **54**(4–5), 196–204. doi:10.1080/19396360802334466
- Cheon, Y. P., and Kim, C. (2015). Impact of glycosylation on the unpaired functions of the sperm. *Clin. Exp. Reprod. Med.* **42**(3), 77–85. doi:10.5653/CERM.2015.42.3.77
- Cichy, B., Jaroszek, H., and Paszek, A. (2014). Cadmium in phosphate fertilizers; ecological and economical aspects. *Chemik Science-Technique-Market* **68**(10), 837–842.
- Cornwall, G. A. (2014). Role of posttranslational protein modifications in epididymal sperm maturation and extracellular quality control. In 'Posttranslational Protein Modifications in the Reproductive System. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 759'. (Ed. P. Sutovsky) pp. 159–180. (Springer: New York, NY). doi:10.1007/978-1-4939-0817-2_8.
- Cortés, P. P., Orihuela, P., Zúñiga, L., Velásquez, L., and Croxatto, H. (2004). Sperm Binding to Oviductal Epithelial Cells in the Rat: Role of Sialic Acid Residues on the Epithelial Surface and Sialic Acid-Binding Sites on the Sperm Surface. *Biol. Reprod.* **71**(4), 1262–1269. doi:10.1095/BIOLREPROD.104.027474
- Cui, X., Jing, X., Wu, X., and Yan, M. (2016). Protective effect of resveratrol on spermatozoa function in male infertility induced by excess weight and obesity. *Mol. Med. Rep.* **14**(5), 4659–4665. doi:10.3892/MMR.2016.5840
- Darbre, P. D. (2003). Underarm cosmetics and breast cancer. *J. Appl. Toxicol.* **23**(2), 89–95. doi:10.1002/JAT.899
- Díaz, M. C., González, N., Zanuzzi, C., Najle, R., and Barbeito, C. (2017). Lectin histochemistry for detecting cadmium-induced changes in the glycosylation pattern of rat placenta. *Biotech. Histochem.* **92**(1), 36–45. doi:10.1080/10520295.2016.1185668
- Dohle, G.R., Arver, S., Bettocchi, C., Jones, T.H. and Kliesch, S. (2015). Guidelines on Male Hypogonadism. (European Association of Urology.) Available at <http://uroweb.org/guideline/male-hypogonadism/>.
- Domino, S. E., Zhang, L., Gillespie, P., Saunders, T., and Lowe, J. (2001). Deficiency of Reproductive Tract $\alpha(1,2)$ Fucosylated Glycans and Normal Fertility in Mice with Targeted Deletions of the FUT1 or FUT2 $\alpha(1,2)$ Fucosyltransferase Locus. *Mol. Cell. Biol.* **21**(24), 8336–8345. doi:10.1128/MCB.21.24.8336-8345.2001
- Dubé, E., and Cyr, D. (2013). The blood-epididymis barrier and human male fertility. In 'Biology and Regulation of Blood-Tissue Barriers. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 763'. (Ed. C. Y. Cheng.) pp. 218–236. (Springer: New York, NY). doi:10.1007/978-1-4614-4711-5_11.
- Durairajanayagam, D. (2018). Lifestyle causes of male infertility. *Arab J. Urol.* **16**(1), 10–20. doi:10.1016/J.AJU.2017.12.004
- Farquhar, C., and Marjoribanks, J. (2018). Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database Syst. Rev.* **8**(8), CD010537. doi:10.1002/14651858.CD010537.PUB5
- Fernandez-Fuertes, B., Blanco-Fernandez, A., Reid, C., Meade, K., Fair, S., and Lonergan, P. (2018). Removal of sialic acid from bull sperm decreases motility and mucus penetration ability but increases zona

- pellucida binding and polyspermic penetration *in vitro*. *Reproduction* **155**(6), 481–492. doi:10.1530/REP-17-0429
- Fierro, R., Foliguet, B., Grignon, G., Daniel, M., Bene, M., Faure, G., and Barbarino-monnier, P. (1996). Lectin-Binding Sites on Human Sperm During Acrosome Reaction: Modifications Judged by Electron Microscopy/Flow Cytometry. *Arch. Androl.* **36**(3), 187–196. doi:10.3109/01485019608987095
- Galicia-García, V., Rojas-Lopez, M., Rojas, R., Olaiz, G., and Rios, C. (1997). Cadmium levels in maternal, cord and newborn blood in Mexico city. *Toxicol. Lett.* **91**(1), 57–61. doi:10.1016/S0378-4274(97)03869-1
- Gamzu, R., Yogev, L., Amnon, B., Kleiman, S., Hauser, R., Lessing, J., Paz, G., and Yavetz, H. (2002). The Expression of Mannose-Ligand Receptor is Correlated with Sperm Morphology. *Arch. Androl.* **48**(6), 475–480. doi:10.1080/01485010290099273
- Gervasi, M. G., and Visconti, P. (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology* **5**(2), 204–218. doi:10.1111/ANDR.12320
- González-Santos, J., Ávalos-Rodríguez, A., Martínez-García, J., Rosales-Torres, A., and Herrera-Barragán, J. (2019). Sperm Morphophysiology in Different Sections of the Rooster Reproductive Tract. *Int. J. Morphol.* **37**(3), 861–866. doi:10.4067/S0717-95022019000300861
- Government of Mexico (2001). NOM-062-ZOO-1999: Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. (Government of Mexico).
- Hall, J. C., and Killian, G. (1987). Changes in Rat Sperm Membrane Glycosidase Activities and Carbohydrate and Protein Contents Associated with Epididymal Transit. *Biol. Reprod.* **36**(3), 709–718. doi:10.1095/BIOLREPROD36.3.709
- Hamada, T., Tanimoto, A., and Sasaguri, Y. (1997). Apoptosis induced by cadmium. *Apoptosis* **2**(4), 359–367. doi:10.1023/A:1026401506914
- Henson, M. C., and Chedrese, P. (2004). Endocrine Disruption by Cadmium, a Common Environmental Toxicant with Paradoxical Effects on Reproduction. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **229**(5), 383–392. doi:10.1177/153537020422900506
- Hermo, L., Oliveira, R., Smith, C., Au, C., and Bergeron, J. (2019). Dark side of the epididymis: tails of sperm maturation. *Andrology* **7**, 566–580. doi:10.1111/ANDR.12641
- Inskip, P. B., and Hammerstedt, R. (1982). Changes in Metabolism of Ram Sperm Associated With Epididymal Transit or Induced by Exogenous Carnitine. *Biol. Reprod.* **27**(3), 735–743. doi:10.1095/BIOLREPROD27.3.735
- Iusem, N. D., De Larminat, M., Tezon, J., Blaquier, J., and Belocopitow, E. (1984). Androgen Dependence of Protein N-Glycosylation in Rat Epididymis. *Endocrinology* **114**(4), 1448–1453. doi:10.1210/ENDO-114-4-1448
- Ji, Y. L., Wang, H., Liu, P., Wang, Q., Zhao, X., Meng, X., Yu, T., Zhang, H., Zhang, C., Zhang, Y., and Xu, D. (2010). Pubertal cadmium exposure impairs testicular development and spermatogenesis via disrupting testicular testosterone synthesis in adult mice. *Reprod. Toxicol.* **29**(2), 176–183. doi:10.1016/J.REPROTOX.2009.10.014
- Jiménez, I., González-Márquez, H., Ortiz, R., Herrera, J., García, A., Betancourt, M., and Fierro, R. (2003). Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology* **59**(5–6), 1171–1180. doi:10.1016/S0093-691X(02)01175-5
- Jiménez, I., Fierro, R., González-Márquez, H., Mendoza-Hernández, G., Romo, S., and Betancourt, M. (2006). Carbohydrate affinity chromatography indicates that arylsulfatase-a from capacitated boar sperm has mannose and N-acetylglucosamine/sialic acid residues. *Arch. Androl.* **52**(6), 455–462. doi:10.1080/01485010600694690
- Kerkhofs, S., Dubois, V., De Gendt, K., Helsen, C., Clinckemalie, L., Spans, L., Schuit, F., Boonen, S., Vanderschueren, D., Saunders, P., Verhoeven, G., and Claessens, F. (2012). A role for selective androgen response elements in the development of the epididymis and the androgen control of the 5 α reductase II gene. *FASEB J.* **26**(10), 4360–4372. doi:10.1096/FJ.11-202283
- Khan, M. A., Khan, S., Khan, A., and Alam, M. (2017). Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. *Sci. Total Environ.* **601–602**, 1591–1605. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2017.06.030
- Knazicka, Z., Forgacs, Z., Lukacova, J., Roychoudhury, S., Massanyi, P., and Lukac, N. (2015). Endocrine disruptive effects of cadmium on steroidogenesis: Human adrenocortical carcinoma cell line NCI-H295R as a cellular model for reproductive toxicity testing. *J. Environ. Sci. Health. A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* **50**(4), 348–356. doi:10.1080/10934529.2015.987520
- Kumar, N., and Singh, A. (2015). Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J. Hum. Reprod. Sci.* **8**(4), 191–196. doi:10.4103/0974-1208.170370
- Lacorte, L. M., Seiva, F., Rinaldi, J., Delella, F., Moroz, A., Sarobo, C., Godinho, A., Fávoro, W., Fernandes, A., and Felisbino, S. (2013). Caffeine reduces cadmium accumulation in the organism and enhances the levels of antioxidant protein expression in the epididymis. *Reprod. Toxicol.* **35**, 137–143. doi:10.1016/J.REPROTOX.2012.10.009
- Lafuente, A. (2013). The hypothalamic–pituitary–gonadal axis is target of cadmium toxicity. An update of recent studies and potential therapeutic approaches. *Food Chem. Toxicol.* **59**, 395–404. doi:10.1016/J.FCT.2013.06.024
- Lamas, C. A., Cuquetto-Leite, L., do Nascimento da Silva, E., Thomazini, B. F., Cordeiro, G., Predes, F. S., Gollücke, A., and Dolder, H. (2017). Grape juice concentrate alleviates epididymis and sperm damage in cadmium-intoxicated rats. *Int. J. Exp. Pathol.* **98**(2), 86–99. doi:10.1111/IEP.12227
- Lee, J. (2018). Morphological changes of cauda epididymis, sperm infiltration into cauda epididymis, sperm storage and sperm disappearance of cauda epididymis in *Rhinolophus ferrumequinum korai* (Chiroptera: Rhinolophidae). *Eur. Zool. J.* **85**(1), 118–127. doi:10.1080/24750263.2018.1445786
- Li, Y., Wu, J., Zhou, W., and Gao, E. (2015). Association between environmental exposure to cadmium and human semen quality. *Int. J. Environ. Health Res.* **26**(2), 175–186. doi:10.1080/09603123.2015.1061115
- Li, X., Guo, J., Jiang, X., Sun, J., Tian, L., Jiao, R., Tang, Y., and Bai, W. (2019). Cyanidin-3-O-glucoside protects against cadmium-induced dysfunction of sex hormone secretion via the regulation of hypothalamus-pituitary-gonadal axis in male pubertal mice. *Food Chem. Toxicol.* **129**, 13–21. doi:10.1016/J.FCT.2019.04.033
- Li, Y., Huang, Y., He, B., Liu, R., Qu, G., Yin, Y., Shi, J., Hu, L., and Jiang, G. (2020). Cadmium-binding proteins in human blood plasma. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **188**, 109896. doi:10.1016/J.ECOENV.2019.109896
- Long, J. A. (2014). Applied andrology in chickens and turkeys. In ‘Animal andrology: theories and applications’. (Eds P. Chenoweth and S. Lorton.) pp. 197–225. (CABI)
- Lucio, R. A., Tlachi, J. L., López, A. A., Zempoalteca, R., and Velázquez-Moctezuma, J. (2009). Analysis of the parameters of the ejaculate in the laboratory Wistar rat: technical description. *Vet Mex.* **40**(4), 405–415.
- Ma, X., Pan, Q., Feng, Y., Choudhury, B., Ma, Q., Gagneux, P., and Ma, F. (2016). Sialylation Facilitates the Maturation of Mammalian Sperm and Affects Its Survival in Female Uterus. *Biol. Reprod.* **94**(6), 123. doi:10.1095/BIOLREPROD.115.137810
- Marettová, E., Marettá, M., and Legáth, J. (2015). Toxic effects of cadmium on testis of birds and mammals: A review. *Anim. Reprod. Sci.* **155**, 1–10. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2015.01.007
- Naiho, A., Ekene, E., Ebeye, M., Olowe, G., and Odigie, M. (2018). Cadmium Chloride Reduces Testicular and Epididymal Weights with Degenerative Histoarchitectural Changes in Testis and Gland of Wistar

- Rats. *Journal of Applied Life Sciences International* **18**(1), 1–7. doi:10.9734/JALSI/2018/39956
- Nateghian, Z., and Aliabadi, E. (2019). Aspects of Environmental Pollutants on Male Fertility and Sperm Parameters. *J. Environ. Treat. Tech.* **8**(1), 299–309.
- National Institutes of Health (NIH) (2011). ‘Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council (US), Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.’ (Washington (DC): National Academies Press.)
- Nnadi, and Ngozi, N. (2018). Effects of Lead and Cadmium Concentration on Blood and Semen of Male Patients Consulting Fertility Clinic, Abakiliki, South-East Nigeria. *Int. J. Prog. Sci. Technol.s* **7**(1), 127–134.
- O’Hara, L., Welsh, M., Saunders, P., and Smith, L. (2010). 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. doi:10.1210/EN.2010-0928
- Pirard, C., Compere, S., Firquet, K., and Charlier, C. (2018). The current environmental levels of endocrine disruptors (mercury, cadmium, organochlorine pesticides and PCBs) in a Belgian adult population and their predictors of exposure. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **221**(2), 211–222. doi:10.1016/J.IJHEH.2017.10.010
- Povey, A. C., and Stocks, S. (2010). Epidemiology and trends in male subfertility. *Hum Fertil (Camb)* **13**(4), 182–188. doi:10.3109/14647273.2010.515700
- Ram, P. A., Cardullo, R., and Millette, C. (1989). Expression and topographical localization of cell surface fucosyltransferase activity during epididymal sperm maturation in the mouse. *Gamete Res.* **22**(3), 321–332. doi:10.1002/MRD.1120220309
- Robaire, B., and Hamzeh, M. (2011). Androgen Action in the Epididymis. *J. Androl.* **32**(6), 592–599. doi:10.2164/JANDROL.111.014266
- Robaire, B., and Hinton, B. T. (2015). The Epididymis. In ‘Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction, 4th edn.’ (Eds T.M. Plant, A.J. Zeleznik.) . pp. 619–677. (Elsevier).
- Sengupta, P. (2012). Environmental and occupational exposure of metals and their role in male reproductive functions. *Drug Chem. Toxicol.* **36**(3), 353–368. doi:10.3109/01480545.2012.710631
- Sengupta, P. (2014). Metals and male reproduction: The possible mechanisms. *Adv. Biomed. Res.* **3**(1), 129. doi:10.4103/2277-9175.133253
- Sharma, A. (2017). Male Infertility; Evidences, Risk Factors, Causes, Diagnosis and Management in Human. *Ann. Clin. Lab. Res.* **05**(03), 1–10. doi:10.21767/2386-5180.1000188
- Sharma, V., Ichikawa, M., and Freeze, H. (2014). Mannose metabolism: More than meets the eye. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **453**(2), 220–228. doi:10.1016/J.BBRC.2014.06.021
- Sharma, H., Rawal, N., and Mathew, B. B. (2015). The characteristics, toxicity and effects of cadmium. *Int. J. Nanotechnol. Nanosci.* **3**, 1–9.
- Skolarczyk, J., Pekar, J., Skolarczyk, J., Skórzyńska-Dziduszko, K., Małecka-Massalska, T., and Budzyński, M. (2017). The impact of cadmium on male infertility. *J. Elem.* **2018**(1), 35–44. doi:10.5601/JELEM.2017.22.2.1320
- Sullivan, R., and Mieuisset, R. (2016). The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum. Reprod. Update* **22**(5), 574–587. doi:10.1093/HUMUPD/DMW015
- Tajiri, S., Fukui, T., Sawaguchi, A., and And Yoshinaga, K. (2012). Cell- and region-specific expression of sugar chains in the mouse epididymal epithelium using lectin histochemistry combined with immunohistochemistry. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* **88**(4), 141–146. doi:10.2535/OFAJ.88.141
- Tariba Lovaković, B. (2020). Cadmium, arsenic, and lead: elements affecting male reproductive health. *Curr. Opin. Toxicol.* **19**, 7–14. doi:10.1016/J.COTOX.2019.09.005
- Teclé, E., and Gagneux, P. (2015). Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Mol. Reprod. Dev.* **82**(9), 635–650. doi:10.1002/MRD.22550
- Tourzani, D. A., Paudel, B., Miranda, P., Visconti, P., and Gervasi, M. (2018). Changes in Protein O-GlcNAcylation During Mouse Epididymal Sperm Maturation. *Front. Cell Dev. Biol.* **6**, 60. doi:10.3389/FCCELL.2018.00060
- Tulsiani, D. R. (2003). Glycan modifying enzymes in luminal fluid of rat epididymis: Are they involved in altering sperm surface glycoproteins during maturation? *Microsc. Res. Tech.* **61**(1), 18–27. doi:10.1002/JEMT.10313
- Tulsiani, D. R. (2006). Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: An overview of their potential role in sperm maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **250**(1–2), 58–65. doi:10.1016/J.MCE.2005.12.025
- Tulsiani, D. R., and Abou-Haila, A. (2012). Biological Processes that Prepare Mammalian Spermatozoa to Interact with an Egg and Fertilize It. *Scientifica (Cairo)* **2012**, 607427. doi:10.6064/2012/607427
- Tulsiani, D. R., Skudlarek, M., Nagdas, S., and Orgebin-Crist, M. (1993). Purification and characterization of rat epididymal-fluid α -d-mannosidase: similarities to sperm plasma-membrane α -d-mannosidase. *Biochem. J.* **290**, 427–436. doi:10.1042/BJ2900427
- Wang, S., Ren, X., Hu, X., Zhou, L., Zhang, C., and Zhang, M. (2019). Cadmium-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated mitochondrial oxidative stress and the JNK signaling pathway in TM3 cells, a model of mouse Leydig cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **368**, 37–48. doi:10.1016/J.TAAP.2019.02.012
- World Health Organization (WHO) (2020a). Infertility is a global public health issue. Available at: <https://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/perspective/en/>.
- World Health Organization (WHO) (2020b). ‘WHO Laboratory Manual For The Examination And Processing Of Human Semen.’ Available at: <https://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en>.
- Wu, L., and Sampson, N. (2013). Fucose, Mannose, and β -N-Acetylglucosamine Glycopolymers Initiate the Mouse Sperm Acrosome Reaction through Convergent Signaling Pathways. *ACS Chem. Biol.* **9**(2), 468–475. doi:10.1021/CB400550J
- Wu, X., Guo, X., Wang, H., Zhou, S., Li, L., Chen, X., Wang, G., Liu, J., Ge, H., and Ge, R. (2017). A brief exposure to cadmium impairs Leydig cell regeneration in the adult rat testis. *Sci. Rep.* **7**(1). doi:10.1038/S41598-017-06870-0
- Xin, A., Cheng, L., Diao, H., Wu, Y., Zhou, S., Shi, C., Sun, Y., Wang, P., Duan, S., Zheng, J., Wu, B., Yuan, Y., Gu, Y., Chen, G., Sun, X., Shi, H., Tao, S., and Zhang, Y. (2016). Lectin binding of human sperm associates with DEFBI26 mutation and serves as a potential biomarker for subfertility. *Sci. Rep.* **6**(1), 20249. doi:10.1038/SREP20249
- Yari, A., Asadi, M., Bahadoran, H., Dashtnavard, H., Imani, H., and Naghii, M. (2009). Cadmium Toxicity in Spermatogenesis and Protective Effects of L-Carnitine in Adult Male Rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **137**(2), 216–225. doi:10.1007/S12011-009-8577-5
- Yari, A., Sarveazad, A., Asadi, E., Raouf Sarshoori, J., Babahajian, A., Amini, N., Amidi, F., Bahadoran, H., Joghataei, M., Asadi, M., and Shams, A. (2016). Efficacy of Crocus sativus L. on reduction of cadmium-induced toxicity on spermatogenesis in adult rats. *Andrologia* **48**(10), 1244–1252. doi:10.1111/AND.12568
- Zhao, L. L., Ru, Y., Liu, M., Tang, J., Zheng, J., Wu, B., Gu, Y., and Shi, H. (2017). Reproductive effects of cadmium on sperm function and early embryonic development *in vitro*. *PLoS One* **12**(11), e0186727. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0186727

Handling Editor: Jessica E. M. Dunleavy