



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**“EFECTOS DEL ZINC EN LAS ALTERACIONES HISTOLÓGICAS DEL  
TESTÍCULO Y EPIDÍDIMO PROVOCADAS POR LA EXPOSICIÓN A CADMIO  
EN LA RATA”**

**T E S I S**

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

**P R E S E N T A:**

**BIÓL. SERGIO MARÍN DE JESÚS.**

**2193801573**

**CODIRECTORA: Dra. Marcela Arteaga Silva.**

**CODIRECTORA: Dra. Rosa María Viguera Villaseñor.**

**ASESORA: Dra. Edith Arenas Ríos.**

**Ciudad de México, 20 de mayo del 2022.**

## COMITÉ DE TUTORES:

CODIRECTORA

**Doctora Marcela Arteaga Silva.**

Laboratorio de Neuroendocrinología Reproductiva.  
Área de Biología Conductual y Reproductiva.  
Departamento en Biología de la Reproducción.  
DCBS. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.  
[asm@xanum.uam.mx](mailto:asm@xanum.uam.mx); [arteaga1967@hotmail.com](mailto:arteaga1967@hotmail.com)

CODIRECTORA

**Doctora Rosa María Viguera Villaseñor.**

Laboratorio de Biología de la Reproducción.  
Instituto Nacional de Pediatría.  
[rmviguera@yahoo.com.mx](mailto:rmviguera@yahoo.com.mx)

ASESORA

**Doctora Edith Arenas Ríos**

Laboratorio de Morfofisiología y Bioquímica del Espermatozoide.  
Área de Reproducción Animal Asistida.  
Departamento de Biología de la Reproducción.  
DCBS. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.  
[editharenas2000@yahoo.com.mx](mailto:editharenas2000@yahoo.com.mx)

## MIEMBROS DEL JURADO

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmante aprobaron la tesis titulada: **“EFECTOS DEL ZINC EN LAS ALTERACIONES HISTOLÓGICAS DEL TESTÍCULO Y EPIDÍMIMO PROVOCADAS POR LA EXPOSICIÓN A CADMIO EN LA RATA”** con fecha de examen el día 20 de mayo del 2022.



---

Presidenta

**Doctora Edith Arenas Ríos**

Laboratorio de Morfofisiología y Bioquímica del Espermatozoide.

Área de Reproducción Animal Asistida.

Departamento de Biología de la Reproducción.

D.C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

[editharenas2000@yahoo.com.mx](mailto:editharenas2000@yahoo.com.mx)



---

Secretaria

**Doctora Reyna Carmen Fierro Pastrana**

Laboratorio de Andrología.

Depto. Ciencias de la Salud.

D.C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

[reyna@xanum.uam.mx](mailto:reyna@xanum.uam.mx)



---

Vocal

**Doctora Ofelia Limón Morales**

Laboratorio de Neuroendocrinología Reproductiva.

Departamento en Biología de la Reproducción.

D.C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

[ofelia.limon@yahoo.com](mailto:ofelia.limon@yahoo.com)



---

Vocal

**Doctor Sergio Montes López**

Unidad Académica Multidisciplinaria.

Universidad Autónoma de Tamaulipas

[montesergio@gmail.com](mailto:montesergio@gmail.com)



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00104

Matrícula: 2193801573

Efectos del zinc en las alteraciones histológicas del testículo y epididimo provocadas por la exposición a cadmio en la rata.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 20 del mes de mayo del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. EDITH ARENAS RIOS  
DRA. OFELIA LIMON MORALES  
DR. SERGIO MONTES LOPEZ  
DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: SERGIO MARIN DE JESUS

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


Aprobar

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



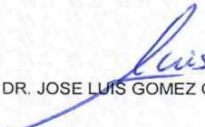

SERGIO MARIN DE JESUS  
ALUMNO

REVISÓ




MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS




DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA




DRA. EDITH ARENAS RIOS

VOCAL



DRA. OFELIA LIMON MORALES

VOCAL



DR. SERGIO MONTES LOPEZ

SECRETARIA



DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

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

El alumno SERGIO MARÍN DE JESÚS recibió apoyo del CONACyT, mediante el otorgamiento de una beca económica durante todo el tiempo de duración de los estudios en el posgrado. Número de registro CVU: 1032291.

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

El presente trabajo fue realizado en:

- Laboratorio de Neuroendocrinología Reproductiva de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría.
- UMADI de la DCBS de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

## DEDICATORIAS

Quiero decir que no tengo a nadie más que dedicar esta investigación que a ustedes, mis Padres, **María de Jesús y Juan Marín**, quienes son mi mayor fortaleza, mi fortuna y mi razón de seguir cumpliendo mis objetivos, tal vez fui el más rebelde y necio, pero por ustedes hoy tengo este honor de poder decirles que me han convertido en alguien que puede cumplir varias metas, tal vez la forma de demostrarnos las emociones mutuamente no sean parecidas a ninguna otra relación de padres e hijos, pero se siente tan bien, que no dudo lo que sentimos al estar juntos, es por eso que esta meta y momento de alegría es para ustedes, por el apoyo que siempre recibí, su impulso, sus consejos y su gran personalidad que hoy han dado resultados; Infinitas gracias!

*Seria tan fácil fingir*

*Que te volveré a ver*

*Que te volveré a ver*

*Seria tan fácil vivir*

*Con la mirada hacia dentro*

*Con los ojos adentro*

*Claudio Valenzuela*

## AGRADECIMIENTOS

Sin duda alguna, fueron dos años difíciles, no solo para mí, sino para todos. La detención de las actividades académicas, laborales y sociales ante la situación de pandemia causó un fuerte desequilibrio en nuestras vidas, pero a pesar de esas circunstancias, a pesar de esos obstáculos, rendirse no fue la opción. Se nos abrieron muchas puertas para lograr culminar los objetivos de este proyecto de investigación, además de la ayuda, los ánimos y deseos de cada una de las personas que formaron parte de este trabajo, sin la ayuda de todos ellos esto no habría sido posible. Es por ello que quiero agradecer a cada uno por su colaboración, su tiempo y atención, porque gracias a su apoyo pude crecer emocional y académicamente.

**Dra. Marcela Arteaga Silva** a quien le agradezco este gran apoyo, atención y sobre todo la oportunidad de aceptarme en su equipo de trabajo, desde el primer día de clase que tuve la fortuna de conocerla y hasta el día de hoy que me encuentro en el lugar donde estoy, es gracias a Usted, por la motivación que despierta en cada uno de sus alumnos, la experiencia, los conocimientos que nos transmite es lo que a mí en lo personal me ha moldeado en esta etapa en la que he crecido académicamente. Hoy soy quien soy gracias al tiempo que me brindó para atender mis dudas y para dedicar su interés en que Yo puliera mis conocimientos. Sin duda ha sido mi mejor elección el pedirle estar en su equipo de laboratorio, fui bien recibido por Usted y su equipo, y me he comprometido en seguir forjando a la persona que con orgullo digo “me ha convertido”. Admiro la energía y ánimos que tiene, porque no es nada sencillo atender personalmente a cada alumno, a la docencia y a la familia, eso es profesionalismo. Deseo que Usted y su familia reciban siempre paz, armonía, que continúen con la alegría y que no les falte la salud y bienestar ¡Mil Gracias!

**Dra. Rosa María Viguera Villaseñor** quien me abrió las puertas de su laboratorio para que este proyecto fuera posible, las atenciones y amabilidad que me brindó durante esta etapa, el tiempo para responder mis dudas, los comentarios y revisiones, además de los consejos y la forma en que ejerce su profesión, así como la emoción con la que imparte sus clases, sus conocimientos y profesionalismo, fueron de mis motivaciones a querer seguir creciendo académicamente para llegar a ser alguien como Usted. Su disposición y el interés por ver crecer a sus alumnos es otra de las motivaciones por la cual me ayudan a seguir puliendo mis conocimientos. Es por ello que agradezco todo su apoyo y la oportunidad de recibirme en su laboratorio junto con su equipo de trabajo, y deseo poder seguir trabajando bajo su supervisión y conocimientos para poder seguir creciendo como persona y profesionalmente. Es un orgullo y honor decir que gracias a Usted voy

forjando mi nivel de conocimientos. Deseo que Usted junto con sus seres queridos reciban siempre la felicidad y que nunca esté ausente la salud y compañía ¡Gracias!

**Dra. Edith Arenas Ríos** agradezco su interés, y por el tiempo que me brindó para revisar mis avances y el hacer espacio para escucharme, así mismo por sus comentarios en la realización de tesis que fueron tomados en cuenta y así poder poder finalizar este proyecto de investigación. La amabilidad y disposición que recibí de su parte fueron pieza clave para motivación y poder ejercer, avanzar y crecer como persona y académicamente. El apoyo que me brindó para la realización de los experimentos ha sido fundamental para cumplir los objetivos planteados y así poder seguir adentrándome más en experiencia en esta área. Con afecto deseo que Usted siempre se encuentre bien, que no falte la salud, alegría y que la cercanía de sus seres queridos siempre camine a su lado ¡Gracias!

**Dra. Ofelia Limón Morales** le agradezco por el interés y tiempo que se tomó para atenderme, fue de gran ayuda a poder culminar y pulir esta tesis. Sus revisiones detalladas, sus comentarios, así como sus sugerencias fueron tomadas en cuenta. La confianza y seguridad con la que me sentí al preguntar y poder resolver mis dudas me enseñan a entender que siempre habrá personas que pueden ayudar a crecer profesionalmente, además de la amabilidad y alegría con la que me atendió. Deseo que siempre reciba salud y felicidad junto con sus seres queridos ¡Gracias!

**Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana** quiero agradecerle por su tiempo, aprobación e interés de este trabajo. Las revisiones y comentarios me ayudaron a reforzar mi información, así mismo la amabilidad y disponibilidad con la que conté de su parte. que siempre perdure con sus alumnos. Deseo que tenga buena armonía, salud y bienestar con sus familiares y seres queridos ¡Gracias!

**Dr. Sergio Montes López** a pesar de la distancia se dio tiempo para poder atender y ser parte de este proyecto, sus revisiones y comentarios me ayudaron a poder culminar este escrito. Es por ello que agradezco su atención, interés y su disponibilidad por estar presente. Deseo que siempre tenga la compañía de sus seres queridos y que los gobierne la salud y bienestar en todo momento ¡Gracias!

**Dr. Joel Hernández Rodríguez** a quien sin duda es un gran compañero de equipo y considero como mi mentor y amigo, gracias a ti he aprendido el compromiso y cariño por la Ciencia. Siempre sin importar el día y la hora tuviste esa disponibilidad y atención para enseñarme y aconsejarme, me motivaste en cada momento, tu apoyo en el laboratorio y lo que he aprendido es gracias a ti, es por ello que agradezco infinitamente todo lo que has hecho por mí, desde antes de ingresar a la M. en BRA. ya estaba aprendiendo de ti, y nunca dudaste en extender tu mano para darme ese apoyo insustituible. Eres de las pocas personas a quien se le puede tener confianza y espero poder regresar cada favor que sin dudar me has brindado. Deseo



que sigas avanzando como persona y profesionalmente, y deseo que Tú y tu familia siempre sigan sonriendo y que en todo momento esté presente la salud, cariño y amor ¡Gracias!

**Sr. Pedro Medina Granados**, quiero hacerle saber que gracias a usted este proyecto tuvo excelentes comentarios, su ayuda, amabilidad y disponibilidad las cuales me brindó, me ayudaron a poder llevar a cabo mis resultados, aprendí mucho de usted, siempre estuvo al tanto de que realizara cada técnica con las medidas necesarias para que no tuviera algún problema. Deseo que siempre tenga felicidad a lado de su familia y que nunca les falte la salud y armonía ¡Gracias! Así mismo doy gracias **al proyecto 2019/C-066 del Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría** por la apertura de sus puertas para lograr este proyecto ¡Mil gracias!

Durante esta etapa también he conocido a personas, compañeros de trabajo que siempre tuvieron esa disponibilidad para apoyarme con mis experimentos. La fortuna de contar con personas tan agradables y simpáticas que hicieron de esta etapa mas emocionante y a pesar de las circunstancias me mostraron su interés y disponibilidad para que esto fuera posible, al **Maestro en B.R.A. Eduardo Cornejo de la Concha y Lic. en Biología Experimental Rocio Trilce López** mil gracias por su amable tiempo y por todos esos momentos de risas y experiencias que me han servido para poder seguir en este camino. Deseo poder seguir teniendo esa comunicación y vivencias con ustedes. Un gran y fuerte abrazo de mi parte ¡Mil gracias!

# ÍNDICE

	Página
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
1.1. Estructura y función del testículo.....	4
1.2. Estructura y función del epidídimo.....	8
1.2.1. Funciones que se llevan a cabo en el epidídimo.....	16
1.3. Parámetros de calidad espermática.....	21
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>23</b>
2.1. Los efectos del cadmio sobre la salud reproductiva masculina.....	24
2.1.1 Mecanismos celulares del Cd.....	27
2.2. La importancia y efectos del zinc sobre la salud reproductiva masculina.....	29
2.2.1. Mecanismos celulares del Zn.....	35
2.2.2. Zn y sistema antioxidante.....	37
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>38</b>
<b>4 HIPÓTESIS.....</b>	<b>38</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>38</b>
<b>6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>39</b>
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
<b>8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>46</b>
<b>9. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>10. DISCUSIÓN .....</b>	<b>64</b>
<b>11. CONCLUSIONES.....</b>	<b>82</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>84</b>
<b>13. ANEXOS.....</b>	<b>112</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Esquema de la estructura y composición del testículo.....	8
<b>Figura 2.</b> Anatomía y regionalización del epidídimo.....	10
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de células del epitelio epididimario (células principales, claras, basales y halo).....	14
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de células del epitelio epididimario (células estrechas y apicales).....	15,16
<b>Figura 5.</b> Liberación de epididimosomas en el epidídimo.....	19
<b>Figura 6.</b> EL Zn en la espermatogénesis.....	32
<b>Figura 7.</b> Funciones esenciales del Zn.....	36
<b>Figura 8.</b> Índice somático testicular.....	48
<b>Figura 9.</b> Índice somático epididimario.....	49
<b>Figura 10.</b> Índice de Johnsen.....	50
<b>Figura 11.</b> Índice histopatológico.....	51
<b>Figura 12.</b> Cortes histológicos de testículos de rata.....	52
<b>Figura 13.</b> Cortes histológicos del epidídimo de rata .....	55
<b>Figura 14.</b> Concentración espermática de las tres regiones (cabeza, cuerpo y cola) del epidídimo de rata.....	58
<b>Figura 15.</b> Vitalidad espermática de las tres regiones (cabeza, cuerpo y cola) del epidídimo de rata.....	60
<b>Figura 16.</b> Morfología espermática de las tres regiones (cabeza, cuerpo y cola) del epidídimo de rata.....	62
<b>Figura 17.</b> Concentración de T en suero.....	63
<b>Figura 18.</b> Modelo esquemático de la competencia del Zn con el Cd en la célula .....	81
<b>Figura 19.</b> Inducción de la expresión de MT por Zn.....	82

Las figuras 1-7 y 18-19 fueron creadas con el programa Biorender.com®

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Relación de espermatozoides contados en el primer cuadro de la cámara con respecto al número de cuadros a contar .....	<b>44</b>
<b>Tabla 2.</b> Factores de conversión para obtener el número de espermatozoides .....	<b>45</b>
<b>Tabla 3.</b> Pesos corporales de los grupos estudiados.....	<b>47</b>
<b>Tabla 4.</b> Diámetro y área de túbulos seminíferos.....	<b>53</b>
<b>Tabla 5.</b> Altura y área de células principales del epidídimo.....	<b>56</b>

## ABREVIATURAS

**Cd:** cadmio

**Zn:** zinc

**T:** testosterona

**i.p.:** intraperitoneal

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**Hg:** mercurio

**Pb:** plomo

**Cu:** cobre

**Mn:** manganeso

**Fe:** hierro

**Ca:** calcio

**Se:** selenio

**Na:** sodio

**K:** potasio

**Ca:** calcio

**Al:** aluminio

**EROS:** especies reactivas de oxígeno

**DMT-1:** transportador de metales divalente 1

**HHT:** hipotálamo hipófisis testículo

**GnRH:** hormona liberadora de gonadotropinas

**LH:** hormona luteinizante

**FSH:** hormona folículo estimulante

**INSL3:** insulina tipo 3

**IGF-1:** factor de crecimiento insulínico tipo 1

**FGF $\beta$ :** factor de crecimiento de fibroblastos

**StAR:** proteína reguladora esteroideogénica aguda

**3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD:** 3 $\beta$  y 17 $\beta$  hidroxisteroides deshidrogenasas

**CMP:** células mioideas peritubulares

**BHT:** barrera hemato-testicular

**BHE:** barrea hemato-epididimaria  
**SI:** segmento inicial  
**RA:** receptor para andrógenos  
**RE:** receptor para estrógenos  
**E<sub>2</sub>:** estradiol  
**ERA:** elementos respuesta de andrógenos  
**ERAn:** elementos respuesta a antioxidante  
**FAK:** proteína de adhesión focal  
**HCO<sup>3-</sup>:** bicarbonato  
**H (+) ATPasa:** ATPasa mitocondrial  
**CDs:** células dendríticas  
**CML:** células musculares lisas  
**DHT:** dihidrotestosterona  
**5 $\alpha$ -R:** 5 alfa reductasa  
**MT:** metalotioneínas  
**GSH:** glutatión  
**SOD:** superóxido dismutasa  
**CAT:** catalasa  
**GPx:** glutatión peroxidasa  
**GSR:** glutatión reductasa  
**MDA:** malondialdehído  
**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral- $\alpha$   
**Nrf2:** factor nuclear eritroide 2  
**O<sub>2</sub><sup>·-</sup>:** radical superóxido  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno  
**ZIP:** proteína importadora de Zn  
**ZnT:** proteína transportadora de Zn  
**MTF-1:** factor de transcripción de metales

## Resumen

Durante las últimas décadas la tasa de fertilidad masculina ha disminuido. Varios factores pueden explicar las causas de infertilidad, sin embargo, la exposición a tóxicos ambientales ha sido un factor que ha aumentado debido a las actividades antropogénicas. Se ha sugerido que los metales pesados entre ellos el cadmio (Cd), son causantes de daños en el sistema reproductivo, induciendo alteraciones histológicas en testículo y epidídimo, así como una disminución en las concentraciones de testosterona (T) y afecciones en la calidad espermática. El interés por encontrar sustancias o elementos que puedan reducir y proteger el daño causado por el Cd es de gran importancia, uno de ellos es el zinc (Zn), considerado un oligoelemento esencial para numerosas funciones biológicas incluyendo la espermatogénesis, la síntesis de T y la calidad espermática. Es por ello, que en este trabajo se analiza el efecto del Zn sobre la histología del epitelio seminífero y epididimario, los parámetros espermáticos y la concentración de T en la rata expuesta a Cd. Para ello, se requirieron 24 ratas macho Wistar de 7 días de vida y se dividieron en 4 grupos. 1) administrado con solución salina (50  $\mu$ L), 2) con administración de Cd (2 mg/kg de peso de CdCl<sub>2</sub>), 3) con administración de Zn (4 mg/kg de peso de ZnCl<sub>2</sub>) y 4) con administración de Zn (4 mg/kg de peso de ZnCl<sub>2</sub>) + Cd (2 mg/kg de peso de CdCl<sub>2</sub>). La administración de Zn fue del día 7 al 56 de vida y el Cd del día 35 al 56 de vida por vía intraperitoneal (i.p.). A todos los animales se les practicó eutanasia al día 90 de vida y se obtuvieron los testículos y epidídimos que se procesaron para histología. Se determinaron las alteraciones histológicas, la concentración de T y algunos parámetros espermáticos. En nuestros resultados, las ratas tratadas con Cd presentaron alteraciones histológicas en testículo, epidídimo, ausencia de espermatogénesis y disminución en la concentración de T. En las ratas tratadas con Zn+Cd, se encontró que el Zn tuvo efectos benéficos al proteger a los epitelios de ambos órganos y mostrar una espermatogénesis completa y mantener la concentración de T. De tal forma, que el tratamiento previo con Zn es capaz de proteger al epitelio seminífero y epididimario, a los parámetros espermáticos y a la concentración de T de los daños severos que provoca la exposición a Cd.

**Palabras clave:** cadmio, zinc, testículo, epidídimo, epitelio, testosterona

## **Abstract**

During the last decades the male fertility rate has decreased. Several factors can explain the causes of infertility, however, exposure to environmental toxins has been a factor that has increased due to anthropogenic activities. It has been suggested that heavy metals, including cadmium (Cd), cause damage to the reproductive system, inducing histological alterations in the testis and epididymis, as well as a decrease in testosterone (T) levels and sperm quality disorders. The interest in finding substances or elements that can reduce and protect the damage caused by Cd is of great importance, one of them is zinc (Zn), considered an essential trace element for numerous biological functions including spermatogenesis, T synthesis, and sperm quality. That is why, in this work, the effect of Zn on the histology of the seminiferous and epididymal epithelium, the sperm parameters and the levels of T in the rat exposed to Cd was analyzed. For this, 24 male Wistar rats of seven days old were divided into four groups. 1) Administered with saline solution (50  $\mu$ L), 2) with Cd administration (2 mg/kg weight of CdCl<sub>2</sub>), with Zn administration (4 mg/kg weight of ZnCl<sub>2</sub>) and with Zn administration (4 mg/kg weight of ZnCl<sub>2</sub>) + Cd (2 mg/kg weight of CdCl<sub>2</sub>). The administration of Zn was from 7 to 56 days old and Cd from 35 to 56 days old, intraperitoneally (i.p.). All animals were euthanized at 90 days old, the testicles and epididymides were obtained and processed for histology. Histological alterations, T levels and some sperm parameters were determined. In our results, the rats treated with Cd presented histological alterations in the testicle, epididymis, absence of spermatogenesis and decreased T levels. In rats treated with Zn+Cd, it was found that Zn had beneficial effects by protecting the epithelium of both organs and showing complete spermatogenesis and maintaining T levels. In such a way, the previous treatment with Zn is capable of protecting the seminiferous and epididymal epithelium, the sperm parameters, and the T levels from the severe damage caused by exposure to Cd.

**Keywords:** cadmium, zinc, testis, epididymis, epithelium, testosterone.



## 1. Introducción

La infertilidad en los humanos constituye uno de los problemas de salud a nivel mundial y es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad de los sistemas reproductivos masculino y femenino, que lleva a la imposibilidad de lograr un embarazo durante un año o más de relaciones habituales sin protección (OMS, 2010). Se ha estimado que existen alrededor de 48 millones de parejas que presentan dicha patología. Las causas de infertilidad se distribuyen en un 30% para factores masculinos, un 30% para factores femeninos, 20% para ambos casos y un 20% para factores idiopáticos (Brugo-Olmedo, 2002; Vander-Borghet & Wyns, 2018). Dentro de los factores de infertilidad masculina se conocen enfermedades como el varicocele, infecciones urogenitales y factores congénitos, entre otros, que pueden contribuir de manera perjudicial a la calidad espermática (Jalón-Monzón *et al.*, 2006). Sin embargo, las causas idiopáticas de la infertilidad presentan un porcentaje alto y se han relacionado con el estilo de vida y la exposición a factores tóxicos ambientales (Krzastek *et al.*, 2020).

En los últimos años ha existido un interés sobre el aumento de la exposición a contaminantes ambientales entre ellos los metales pesados, los cuales son capaces de interferir con funciones celulares y metabólicas del organismo (Genuis & Kyrillos, 2017; Krzastek *et al.*, 2020). Algunos metales pesados como el manganeso (Mn), cobre (Cu), hierro (Fe) y zinc (Zn) son necesarios para el cuerpo humano en concentraciones fisiológicas, no obstante, las altas concentraciones podrían provocar efectos tóxicos en el organismo (Fu & Xi, 2020).

Por otra parte, los metales pesados como el mercurio (Hg), plomo (Pb) y cadmio (Cd), no poseen funciones biológicas favorables y son responsables de efectos adversos para la salud humana, además de que tienden a acumularse en algunos órganos (Fu & Xi, 2020). Uno de los metales pesados de mayor interés en la investigación es el Cd, el cual puede causar daños en la salud reproductiva, provoca alteraciones en el testículo, relacionadas con la disminución en la concentración de espermatozoides, factor importante en la infertilidad masculina (Rehman *et al.*, 2018; Khorami *et al.*, 2020). Además, en este mismo órgano se han observado lesiones como hemorragia intersticial severa con edema, necrosis, así

como alteración en la síntesis de esteroides en las células de Leydig (Bhardwaj *et al.*, 2021) y disminución en la concentración sérica de testosterona (T), la cual juega un papel importante en la espermatogénesis (Sen Gupta *et al.*, 2004; Bhardwaj *et al.*, 2021). En cuanto al epidídimo, se sabe que el Cd provoca daños histopatológicos, además de alterar su función de maduración para los espermatozoides. También se ha identificado Cd en el plasma seminal masculino, donde afecta la concentración, movilidad, vitalidad y morfología espermática (Tunkay *et al.*, 2021).

Por lo cual, contrarrestar los daños causados por el Cd ha sido motivo de estudio, en los cuales se ha propuesto que algunos elementos como el Zn son capaces de reducir el daño causado por metales pesados (Yu *et al.*, 2021). El Zn es un micronutriente esencial para todos los organismos, este elemento tiene funciones biológicas esenciales que incluyen la, señalización, metabolismo de lípidos, carbohidratos, actividades enzimáticas, regulación de la talla y maduración sexual del organismo (Kerns *et al.*, 2018; Skalny *et al.*, 2021). Además, se sabe que el Zn regula aproximadamente 200 metaloenzimas, mantiene la estabilidad de membranas celulares, participa en mecanismos como la organización y replicación del DNA, así como en la división celular (Allouche-Fitoussi & Breitbart, 2020). En el sistema reproductivo el Zn es necesario para regular las funciones testiculares y epididimarias (Vickram *et al.*, 2021).

### **1.1. Estructura y función del testículo**

En los mamíferos los testículos están conformados por dos compartimentos, el tubular y el intersticial. El primero es la unidad funcional, contiene una membrana basal que soporta al epitelio seminífero donde se encuentran las células de Sertoli y células germinales en distintas etapas de maduración (Holstein *et al.*, 2003). El otro es el compartimento intersticial, el cual contiene microvasculatura, fibras nerviosas, vasos linfáticos, fibroblastos, macrófagos, tejido conectivo, además, se encuentran las células de Leydig, las cuales secretan andrógenos para la regulación del sistema reproductivo, el descenso testicular y la espermatogénesis (Zhu *et al.*, 2020).

En el epitelio de los túbulos seminíferos se lleva a cabo la espermatogénesis, la cual consta de una serie de divisiones en donde las espermatogonias deben autorrenovarse y diferenciarse en espermatozoides. Para lo cual se requiere de una regulación adecuada y precisa del microambiente testicular proporcionado por las células de Sertoli, células de Leydig y las células mioideas peritubulares (Hai *et al.*, 2014).

### **Células de Sertoli**

Son esenciales en la espermatogénesis, ocupan el 20% del epitelio del túbulo seminífero maduro (Neto *et al.*, 2016; Griswold, 2018). Su forma es irregular, se encuentran apoyadas sobre la base de la membrana basal y el ápice se extiende hacia la luz del túbulo seminífero (Neto *et al.*, 2016). Su morfología y estructura cambia constantemente durante el desarrollo y el ciclo del epitelio seminífero (Griswold, 2018). La estructura es proporcionada por un citoesqueleto complejo compuesto por filamentos de actina, complejo tubulobulbar, especializaciones ectoplasmáticas, filamentos intermedios, así como microtúbulos, donde cada uno de estos componentes presenta una ultraestructura y función específica (Tang *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2020).

Presentan ramificaciones citoplasmáticas que sostienen a las células germinales donde las células de Sertoli forman y rompen uniones entre sí, para ayudar a que migren hacia la luz del túbulo durante la espermatogénesis (Ye *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 2010). Estas conexiones están dadas por zonas especializadas de uniones estrechas de membranas celulares, las cuales separan el epitelio germinal en el compartimento basal y el adluminal, formando así la barrera hemato-testicular (BHT) (Holstein *et al.*, 2003).

### **Células de Leydig**

Las células de Leydig generalmente se encuentran en grupos y en posiciones estratégicas entre los vasos sanguíneos y el túbulo seminífero, son de forma poligonal y presentan características ultraestructurales que son esenciales para su función esteroidogénica (Neto *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2019). Son la fuente principal

de andrógenos, siendo la T el andrógeno más representativo y desempeñan el papel esencial en la regulación de la espermatogénesis influyendo en la producción de los factores de crecimiento (Svechnikov *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2019). Existen dos poblaciones diferentes de células de Leydig que producen andrógenos: las células de Leydig fetales y las adultas. En el día 13.5 de gestación en la rata, está presente el primer testículo morfológico con células de Leydig fetales (Picut *et al.*, 2017), mientras en el humano están presentes en la semana 6 de gestación (Sinclair, 1994). En este periodo producen concentraciones altas de T que son necesarias para la diferenciación genital y la masculinización del cerebro (Zirkin & Papadopoulos, 2018). Las células de Leydig secretan insulina tipo 3 (INSL3) para promover el descenso testicular induciendo un sobrecrecimiento del gubernaculum, atrayendo los testículos de la posición del riñón a la entrada del canal inguinal (Picut *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2020).

Del día 21 al 32 posnatal de la rata, las células de Leydig se encuentran en etapa inmadura, en el humano hay un aumento de T entre los 12 y 14 años, durante el periodo peripuberal. El aumento de T es debido a la producción en expansión de células de Leydig adultas a partir de las células mesenquimatosas (Picut *et al.*, 2017; Zirkin & Papadopoulos, 2018).

### **Células mioides peritubulares (CMP)**

Las CMP junto con las células de Sertoli conforman a los túbulos seminíferos, la función de contracción de las CMP es importante para el transporte intratesticular y para la expulsión de espermatozoides inmóviles. La T actúa sobre las CMP para mediar la liberación de proteínas peritubulares que modulan la función de las células de Sertoli, que regula la secreción de transferrina, inhibina y de esta manera inducir a la maduración de las espermátidas (Hai *et al.*, 2014). Otra de sus funciones importantes es la formación y mantenimiento de la BHT, a través de la secreción de fibronectina, colágenos y proteoglicanos, además, el IGF-1, el FGF $\beta$ , así como interleucinas, son producidas por las CMP para apoyar a las células de Sertoli. (Neto *et al.*, 2016).

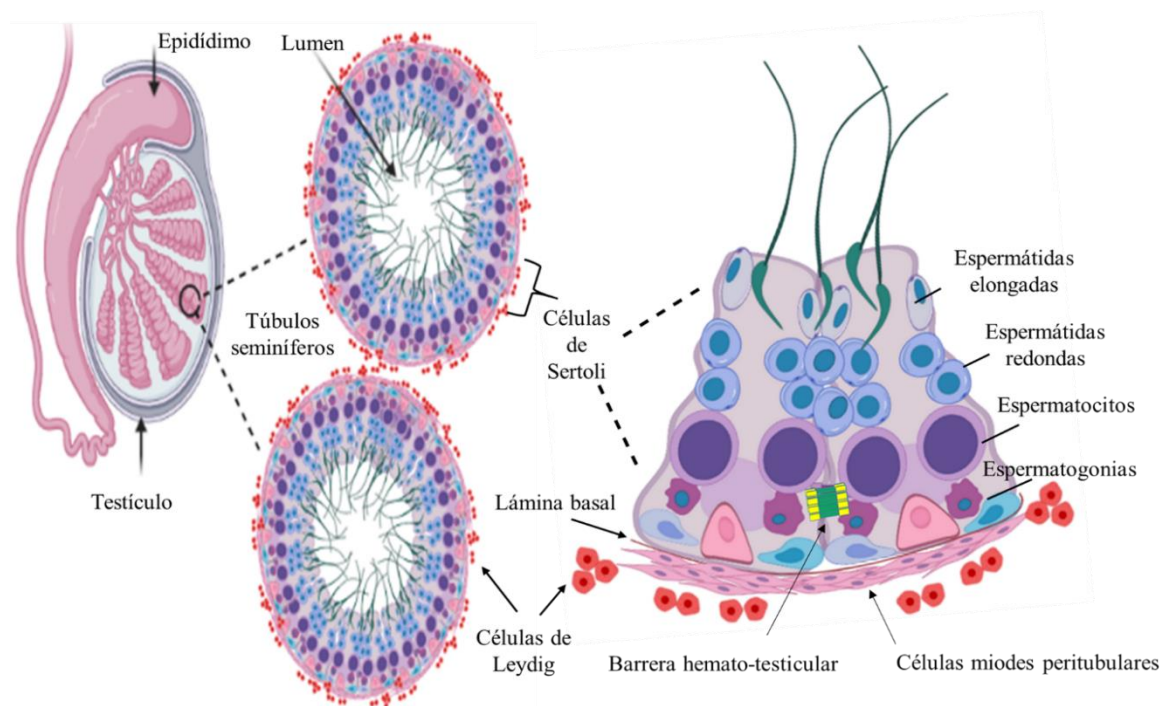
## **Barrera hemato-testicular (BHT)**

Durante la pubertad y edad adulta, las células de Sertoli forman la BHT la cual divide el epitelio germinal en un compartimento basal y un compartimento adluminal para brindarles protección a los espermatocitos que llevan a cabo la meiosis (Zhu *et al.*, 2020). En los testículos de los mamíferos la BHT está compuesta por importantes uniones celulares entre Sertoli adyacentes, entre ellas las uniones estrechas, especialización ectoplasmática basal, uniones gap y desmosomas (Setchell, 2008; Wen *et al.*, 2016). Las primeras células en atravesar la BHT son los espermatocitos en leptoteno, quienes migran al compartimento adluminal para concluir la meiosis. De manera que el inicio de la meiosis parece no requerir de un microambiente especial, sin embargo, el término de la meiosis debe ocurrir en el compartimento adluminal, esto para proteger a las células meióticas de mutaciones o alteraciones en el DNA y evitar la activación del sistema inmune por antígenos de células germinales haploides (Xiao *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2014). Por lo tanto, el paso de espermatocitos al compartimento adluminal y el transporte de espermátidas elongadas al borde del epitelio, esta mediado por el montaje y desmontaje de las uniones celulares para evitar el paso de sustancias no deseadas (Xiao *et al.*, 2012; Neto *et al.*, 2016).

## **Espermatogénesis**

Las células germinales primordiales migran del alantoides a la cresta gonadal, y son dirigidos por factores de las células de Sertoli. Una vez incluidos en el cordón seminífero son diferenciados a gonocitos (Loveland & Schlatt, 1997). Posteriormente, los gonocitos darán origen a las espermatogonias, donde las divisiones mitóticas darán paso a espermatocitos primarios, los cuales son las primeras células en cruzar la BHT hacia el compartimento adluminal para proceder a la meiosis I donde darán origen a espermatocitos secundarios (Holnstein *et al.*, 2003). Durante la meiosis II, los espermatocitos secundarios se convertirán a espermátidas redondas, posteriormente se lleva a cabo la espermiogénesis en donde la espermátida redonda se transforma en una célula elongada. Durante esta etapa, no ocurren más divisiones celulares y se produce una serie de cambios

citoplasmáticos y nucleares (Holnstein *et al.*, 2003; O'Donnell, 2015; Neto *et al.*, 2016). Finalmente ocurre la espermiación, donde los espermatozoides son liberados a la luz del túbulo seminífero. En este proceso las células de Sertoli son las que controlan la liberación de las espermátidas maduras, mediante la cooperación de sus filamentos intermedios y microtúbulos, de esa manera las espermátidas llegan al borde del epitelio del túbulo seminífero, donde se convierten en células libres denominadas espermatozoides (Holnstein *et al.*, 2003; O'Donnell, 2015). La estructura del testículo se muestra en la figura 1.



**Figura 1.** Esquema de la estructura y composición del testículo (Adaptado de Holnstein *et al.*, 2003).

Todos estos procesos requieren de la acción y señalización de andrógenos, que son indispensables para una adecuada progresión meiótica y maduración de las espermátidas, siendo la célula de Sertoli el principal mediador de la acción de estos andrógenos para la espermatogénesis (Smith & Walker, 2014).

## 1.2. Estructura y función del epidídimo

El epidídimo es uno de los órganos sexuales masculinos esenciales, es vital para la reproducción y proporciona distintas formas de protección a los

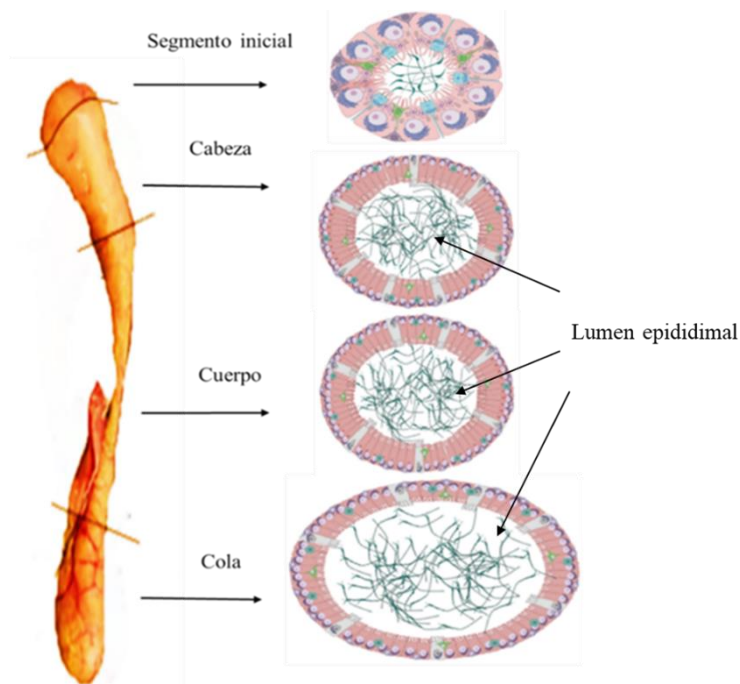
espermatozoides en maduración (O'Flaherty, 2019 James *et al.*, 2020). El túbulo epididimario, los conductos deferentes, la vesícula seminal y el conducto eyaculatorio se originan del conducto mesonéfrico (Robaire & Hinton, 2015; Sullivan & Mieusset, 2016). Los túbulos seminíferos convergen y forman la *rete testis*, que se comunica con los conductos eferentes y estos a su vez con una estructura muy enrollada, denominada túbulo epididimario. El epidídimo es un órgano tubular contorneado de forma de media luna, adherido al testículo, y se une al conducto deferente (James *et al.*, 2020). Su longitud varía entre especies, en ratón mide 1 m, en ratas 3 m, en los humanos es de 3-8 m y 80 m en equinos (Hinton *et al.*, 2000; Robaire & Hinton, 2015).

En el humano, la anatomía del epidídimo se compone por tabiques formados por tejido conectivo. En el ratón y la rata estos tabiques están organizados, se dividen de 10 a 19 segmentos, y posiblemente tengan una función en la diferenciación y regulación de la expresión génica a lo largo de este órgano. Estos tabiques en el humano no están organizados, solo se puede observar un segmento donde se delimita la región del conducto eferente y el tejido epididimario (Domeniconi *et al.*, 2016; Sullivan *et al.*, 2019).

En el caso de los roedores, el epidídimo se divide en cuatro regiones anatómicas: el segmento inicial (SI), cabeza (*caput*), cuerpo (*corpus*) y cola (*cauda*) (figura 2). Cada región con características y funciones únicas, donde las regiones proximales como el SI y la cabeza tienen la función de apoyar la maduración espermática (Sullivan *et al.*, 2019). Una característica diferencial en los humanos es que no presentan un SI, por lo que la región proximal del conducto se une a los conductos eferentes, los cuales están conformados por células ciliadas y un compartimiento luminal irregular, el epitelio es muy delgado y compuesto por tabiques de tejido conectivo, a diferencia de los túbulos epididimarios (Hess, 2002).

La región de la cabeza del epidídimo está formada por células epiteliales que contienen núcleos alargados. En todos los mamíferos este epitelio epididimario es sumamente grueso en la región proximal, y conforme se llega a la parte más distal del epidídimo el epitelio es más delgado y el diámetro de la luz aumenta (Robaire & Hinton, 2015; Sullivan *et al.*, 2019).

En el caso de la región distal de la cola, los espermatozoides permanecen inactivos y almacenados (Bedford, 2015; Sullivan *et al.*, 2019; James *et al.*, 2020). El compartimento intraluminal dilatado y delimitado por un epitelio más delgado da paso a concentrar una cantidad suficiente de espermatozoides disponibles para los múltiples apareamientos en los roedores, que pueden ser en promedio de 3 eyaculaciones durante la copula, en 30 minutos de registro en la rata (Bedford 1990, 2015b; Olayo *et al.*, 2015). Sin embargo, en el caso de los humanos, tiene una limitada capacidad de reserva o almacenamiento en la cauda influye que puede quedar vacía después de 3 eyaculaciones, por lo que se considera que esta región del epidídimo en los humanos está poco desarrollada en comparación con otros mamíferos (Sullivan *et al.*, 2019). Se ha estimado que la duración del tránsito epididimario va de 1 a 21 días, sin embargo, en el humano los primeros espermatozoides atraviesan el epidídimo entre 1 y 2 días, pero en general el tiempo de tránsito promedio es de 12 días (Robaire & Hinton, 2015; Sullivan *et al.*, 2019).



**Figura 2.** Anatomía y regionalización del epidídimo. El epidídimo de la rata se divide en segmento inicial, cabeza, cuerpo y cola. Algunos tipos celulares difieren en cada región, mientras otros se encuentran en todo el epidídimo, así mismo el diámetro luminal se encuentra más amplio en la región de la cola en comparación de la región del cuerpo y la cabeza (Adaptado de Shum *et al.*, 2011).



## **Tipos celulares del epidídimo**

El epidídimo presenta un revestimiento de epitelio pseudoestratificado y está compuesto por distintos tipos celulares que presentan uniones estrechas y que delimitan el compartimento intraluminal (Breton *et al.*, 2016; Sullivan *et al.*, 2019). Existen siete tipos de células especializadas que conforman este epitelio epididimario: *células principales, claras, estrechas, basales, apicales, halo y células dendríticas* (figura 3), y se encargan de darle la estructura y función al epidídimo, algunas se encuentran a lo largo de todas las regiones del epidídimo y otras sólo en regiones específicas (James *et al.*, 2020).

Las células epididimarias presentan una alta actividad metabólica, endocrítica y secretora, regulada principalmente por andrógenos (James *et al.*, 2020). Existe una elaborada red de comunicación entre las células epididimarias con el fin de proporcionar una regulación para varios mecanismos de transporte a lo largo del órgano (Breton *et al.*, 2016). El establecer un entorno luminal iónico mediante la ejecución del transporte transepitelial de iones, nutrientes y agua es una de las importantes funciones de las células epiteliales. Otra característica es la acidificación luminal del epidídimo para la maduración de los espermatozoides, esto facilita la transferencia de las proteínas de las células del epitelio epididimario a los espermatozoides a través de vesículas extracelulares denominadas epididimosomas (Sullivan, 2015; Breton *et al.*, 2016, 2019; Zhou *et al.*, 2019).

Un papel importante del epitelio epididimario es proporcionar una barrera de protección, debido a que es de los sitios donde los espermatozoides pueden sufrir daños causados por patógenos o sustancias nocivas que puedan existir en el torrente sanguíneo. Por lo que las células principales, estrechas, claras y las basales forman la barrera hemato-epididimaria (BHE) (Sullivan & Belleannee, 2018; Breton *et al.*, 2019). Estos diferentes tipos celulares, proporcionan un equilibrio para la activación inmunitaria, de tal manera que exista la protección ante diversos factores que pueden ser causantes y determinantes de la infertilidad masculina (Breton *et al.*, 2019).

## **Células principales**

Como indica su nombre, son el principal tipo celular que conforma el epitelio epididimario, se encuentran a lo largo de todo el conducto (Rinaldi *et al.*, 2020). De acuerdo con la región, representan entre el 65% y 80% del epitelio del epidídimo. Son las responsables de la absorción y secreción de materiales en la luz del epidídimo, debido a que cuentan con una gran actividad de secreción y de endocitosis. Es el principal sitio de la producción de epididimosomas (James *et al.*, 2020). Además, de la maquinaria secretora y endocítica bien desarrollada, se caracterizan por sus núcleos basalmente alineados y la presencia de microvellosidades (Shum *et al.*, 2014; Robaire & Hinton, 2015) (figura 3).

Las células principales sintetizan una gran cantidad de proteínas propias y de secreción (Shum *et al.*, 2014). Además de ser muy activas en la endocitosis de proteínas que se encuentran en el compartimento luminal (Shum *et al.*, 2014; Robaire & Hinton, 2015), contribuyen al establecimiento de un entorno luminal ácido (James *et al.*, 2020).

En el SI son capaces de reabsorber bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) a través de transportadores y enzimas, mientras que en la cola del epidídimo tienen la capacidad de secretar  $\text{HCO}_3^-$  o protones dependiendo de las señales fisiológicas (Breton *et al.*, 2016). La acidez del pH luminal y una concentración baja de  $\text{HCO}_3^-$  es indispensable para mantener los espermatozoides en estado latente durante su maduración y almacenamiento en el epidídimo (Ruan *et al.*, 2012; Breton *et al.*, 2016; Rinaldi *et al.*, 2020).

## **Células claras**

Tienen una alta actividad endocítica, se pueden encontrar en la región de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo y forman parte de la familia de células ricas en mitocondrias (Breton *et al.*, 2019). Una de sus funciones es absorber las gotas citoplasmáticas que se liberan de los espermatozoides durante la maduración. Junto con las células principales y estrechas son encargadas de la regulación del pH luminal (Cornwall, 2009). Una característica de estas células es que la región apical está conformada por numerosas vesículas, lisosomas, endosomas y cuerpos

multivesiculares, mientras que en la región basal se encuentra el núcleo y múltiples gotas de lípidos (figura 3). Su función endocítica es aún mayor que las células principales, endocitan proteínas específicas en cada región (Robaire & Hinton, 2015). Estas células proporcionan un entorno luminal ácido en el epidídimo con el fin de proteger a los espermatozoides para permanecer inactivos (Shum *et al.*, 2011; Breton *et al.*, 2016; Rinaldi *et al.*, 2020).

### **Células basales**

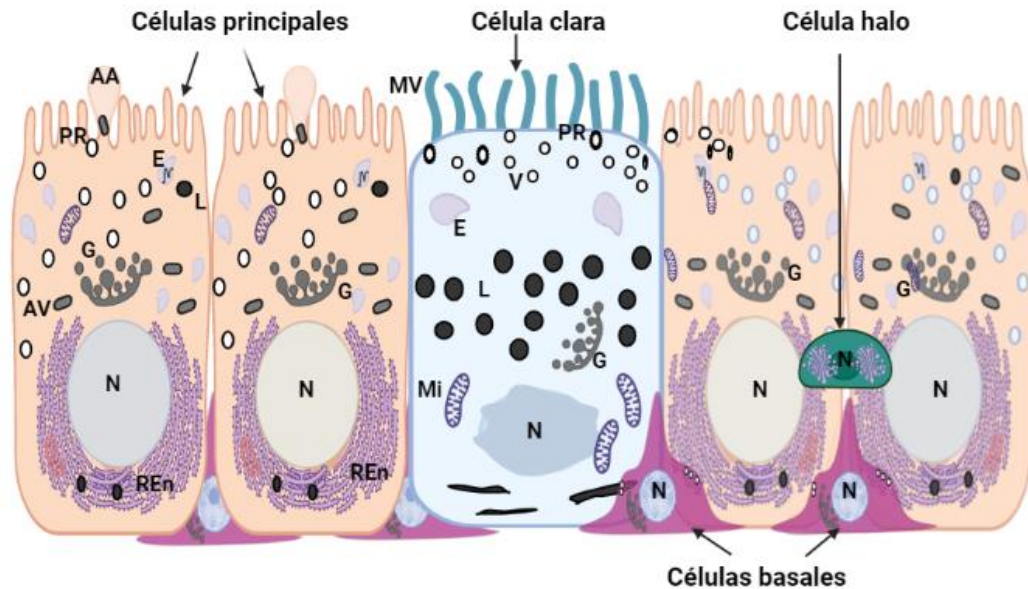
Se distribuyen a lo largo de todo el epitelio del epidídimo y su nombre se debe a que se localizan adheridas a la membrana basal, son delgadas en el sitio basal y más grandes en el polo luminal apical. Son parte fundamental de la estructura tubular epididimaria (Shum *et al.*, 2014; James *et al.*, 2020) debido a que presenta extensiones delgadas que se extienden a lo largo de la membrana basal que va desde su cuerpo hemisférico que cubre en gran medida la circunferencia del túbulo del epidídimo (Shum *et al.*, 2008; Rinaldi *et al.*, 2020), (figura 3). Juegan un papel esencial para el mantenimiento de la integridad de la BHE (Mandon *et al.*, 2015; Sullivan *et al.*, 2019).

Se sabe que pueden inducir indirectamente el ambiente luminal regulando algunas de las funciones de las células principales. Las células basales pueden cruzar las uniones estrechas para llegar a la luz del epitelio epididimario (Shum *et al.*, 2008; Rinaldi *et al.*, 2020). Estas células contienen pozos en la membrana plasmática opuestos con la membrana basal y a las células principales superpuestas, indicando que hay endocitosis y que está mediada por receptores de las células principales y de la sangre. Al igual que las otras células secretoras, las células basales contienen gran acumulación de material secretor dentro de los sáculos de Golgi y gránulos secretores (Leung *et al.*, 2004; Robaire & Hinton, 2015).

### **Células halo**

Se sabe que se encuentran a lo largo de todo el epitelio del epidídimo, su función principal es la de otorgar inmunidad a los espermatozoides (James *et al.*, 2020). Se caracterizan por ser células muy pequeñas de borde estrecho y un

citoplasma claro. Se localizan en la base del epitelio epididimario, insertadas entre las células principales, presentando múltiples y distintos gránulos (figura 3). Son difíciles de distinguir debido a su pequeño tamaño y morfología nuclear (Robaire & Hinton, 2015). Estas células han sido descritas como linfocitos o monocitos y se plantea que son una mezcla de diferentes células inmunitarias (Serre & Robaire 1998).



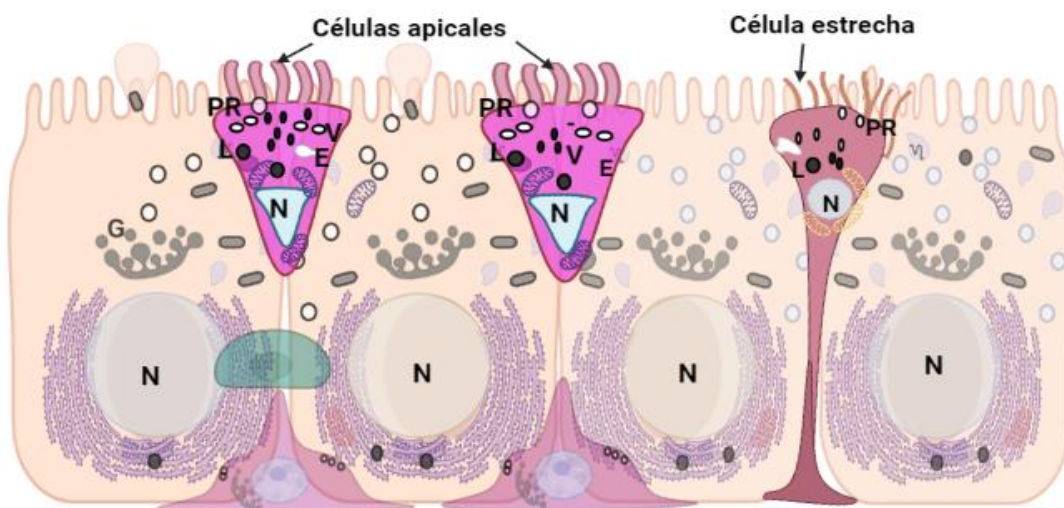
**Figura 3.** Representación esquemática de células del epitelio epididimario (células principales, claras, basales y halo). Las células principales, son columnares y predominan en todo el epidídimo, muestran ampollas apicales de citoplasma en la superficie celular, gran maquinaria secretora, orificios recubiertos, agregados tubulares vasculares, un núcleo basal alineado, lisosomas (L), retículo endoplasmático basal y aparato de Golgi. Las células claras que se encuentran en cabeza cuerpo y cola son de mayor tamaño y ejercen gran actividad endocítica, presenta orificios apicales, lisosomas, endosomas y muchas mitocondrias, además presenta pocas microvellosidades. Las células basales que son el sello distintivo del epitelio se extienden en la lámina basal cubriendo gran parte del túbulo epididimario. Las células halo, se insertan entre las células principales adyacentes, se ubican basalmente y contiene pequeños gránulos. ampollas apicales (AA), pozos recubiertos (PR), agregados tubulares vasculares (AV), núcleo (N), lisosomas (L), endosomas (E) retículo endoplasmático (REn), aparato de Golgi (G), mitocondrias (Mi), microvellosidades (MV) (Adaptado de Robaire & Hinton, 2015).

## Células estrechas

Se pueden encontrar exclusivamente en el segmento inicial del epidídimo, reciben este nombre debido a la forma característica en copa que presentan, siendo más delgadas que las células principales. Mantienen una delgada extensión citoplasmática hacia la membrana basal (Breton *et al.*, 2019) (figura 4). Contienen múltiples vesículas que son responsables de la endocitosis, además secretan  $H^+$  hacia la luz del epidídimo desde la membrana apical (James *et al.*, 2020). Las células estrechas junto con las células claras muestran características ultraestructurales de actividad endocítica. Expresan la bomba de  $H^+$  vacuolar V-ATPasa que es necesaria para llevar a cabo la acidificación intraluminal, además de tener gran cantidad de mitocondrias (Breton *et al.*, 2016, 2019).

## Células apicales

Se localizan principalmente en el SI del epitelio epididimario. Se caracterizan por la presencia de un núcleo ovoide localizado apicalmente, estas células no tienen contacto con la membrana basal (figura 4). Además, su perfil de expresión de proteínas es muy diferente al de otras células. Estas células también pueden endocitar sustancias de la luz epididimal. Cuenta con múltiples enzimas proteolíticas y gran cantidad de mitocondrias (Robaire & Hinton, 2015; James *et al.*, 2020).



**Figura 4.** Representación esquemática de células del epitelio epididimario (células estrechas y apicales). En la región del segmento inicial se localizan las células estrechas y apicales. Las células estrechas son alargadas y tienen contacto con la membrana basal, contienen numerosas vesículas pequeñas, endosomas. Las células apicales no tienen contacto con la membrana basal. Pozos recubiertos (OR), endosomas (E), lisosomas (L), núcleo (N), vesículas (V) (Adaptado de Robaire & Hinton, 2015).

### **Células dendríticas (CDs)**

Forman una gran red que se localiza en el epitelio epididimario. Se distinguen por su morfología dendriforme, por las interacciones con el epitelio del epidídimo y por su capacidad presentadora de antígenos (Da Silva *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2021). Sin embargo, estas células se encuentran en todo el epidídimo, y regulan con alta actividad las interacciones del sistema reproductivo e inmunológico (Da Silva *et al.*, 2011).

Se ha sugerido que existen dos tipos de poblaciones de CDs las inmunogénicas y las tolerogénicas. Las CDs inmunogénicas se distribuyen principalmente en la región proximal de los segmentos de la cabeza, teniendo forma dendrítica a diferencia de las que se encuentran en la cola del epidídimo (Guiton *et al.*, 2013).

En el SI las CDs intraepiteliales abundan e interactúan con los espermatozoides y los componentes del lumen, de esta manera mantienen la inmunidad durante la maduración espermática para poder establecer el potencial de fertilidad (Geismann *et al.*, 2010). Las células dendríticas peritubulares de la cola del epidídimo regulan las respuestas inmunitarias contra patógenos durante el almacenamiento de los espermatozoides (Da Silva *et al.*, 2011).

#### **1.2.1. Funciones que se llevan a cabo en el epidídimo**

Los espermatozoides deben desarrollar plenamente sus capacidades fertilizantes durante el tránsito a lo largo del epidídimo por lo que su recorrido es esencial (Chabory *et al.*, 2010; Sullivan & Mieusset, 2016), debido a que una vez que los espermatozoides abandonan el testículo y entran en el epidídimo ya se han desarrollado y diferenciado morfológicamente, pero aún son considerados

funcionalmente inmaduros en el sentido que aún no pueden reconocer, unirse y penetrar a los ovocitos (Chabory *et al.*, 2009).

### **Transporte de espermatozoides**

El epidídimo recibe cada segundo aproximadamente entre 1000 y 1500 espermatozoides que han sido liberados de los testículos. Este proceso de transporte está influenciado por las contracciones de las células musculares lisas (CML), el líquido luminal y las células ciliadas especializadas (Elfgen *et al.*, 2018). El transporte de los espermatozoides se lleva a cabo desde la parte más proximal del epidídimo, principalmente por contracciones rítmicas de las CML que rodean al túbulo, estas contracciones son frecuentes en la región de la cabeza y aumentan conforme llegan a la cola del epidídimo (Renne *et al.*, 2012).

Las capas de CML son delgadas y están dispuestas de forma circular, su grosor aumenta a lo largo del túbulo epididimario. En el epidídimo humano, entre las CML se encuentran haces de fibras de colágeno y fibroblastos. Aunque se sabe poco de la regulación y función de las CML en el transporte de espermatozoides en algunas regiones del epidídimo se ha reportado que la cabeza y el cuerpo se encuentran inervados por algunas fibras nerviosas, mientras que en la cola del epidídimo la inervación es más densa, la entrada neuronal, adrenérgica y colinérgica contribuyen con las influencias hormonales a la contractilidad y transporte de los espermatozoides (Elfgen *et al.*, 2018). La contractilidad del túbulo epididimario también está influenciada por las prostaglandinas, los péptidos neurohipofisarios como la oxitocina, la vasopresina y la endotelina, que se unen a receptores presentes en el epidídimo (Robaire & Hinton, 2015).

### **Maduración espermática epididimaria**

El concepto de maduración espermática epididimaria ha ido desarrollándose desde los primeros estudios de Tournade (1913) con base en los cambios en la movilidad que se da en los espermatozoides durante su recorrido a lo largo del epidídimo y que se relacionó con la adquisición fertilizante (Gervasi & Visconti *et al.*, 2017).

El epitelio epididimario crea un entorno luminal que está en constante cambio a lo largo de este órgano. Esta sucesión de microambiente de las diversas actividades secretoras y de la reabsorción del epitelio epididimario, conduce a modificaciones esenciales. Estas modificaciones fisiológicas y bioquímicas se refieren a la agregación o cambio de proteínas, de glicoconjugados y lípidos membranales (Tulsiani, 2006; Chabory *et al.*, 2009).

Los mecanismos por los cuales se da la transferencia de proteínas y secreciones del epidídimo a los espermatozoides no se comprenden del todo bien. Sin embargo, se cree que podría ser a través de: 1) la absorción de proteínas solubles secretadas por el epitelio en el líquido epididimario (Cuasnicu *et al.*, 2002); 2) la transferencia de exosomas liberados por el epitelio epididimario, denominados epididimosomas, los cuales contienen tanto proteínas y lípidos que se transfieren a los espermatozoides (Sullivan & Saez., 2013; Sharma *et al.*, 2016) y 3) las interacciones entre los espermatozoides y la superficie epitelial del epidídimo (Paunescu *et al.*, 2014).

Ha sido difícil dilucidar los cambios moleculares que regulan el proceso de maduración en el epidídimo, debido a que en cada región y los septos del epidídimo se observa una expresión diferencial de genes que regulan y mantienen las concentraciones de iones luminales esenciales para la regulación del proceso de maduración espermática (Shum *et al.*, 2011). Los estudios sobre este proceso se basan en la comparación de los espermatozoides que se extraen de cada región del epidídimo (Días *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2016).

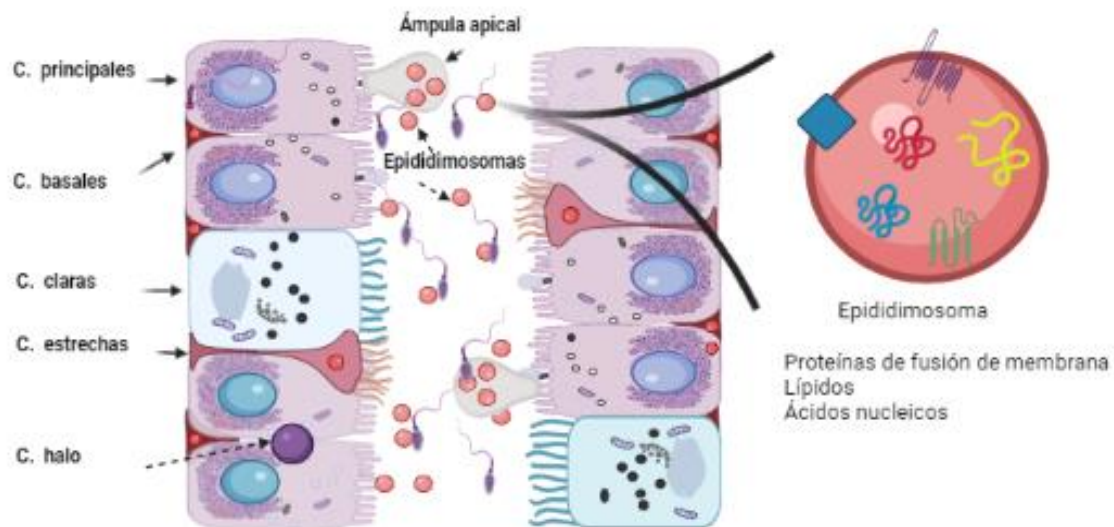
### **Adquisición de proteínas en el epidídimo**

Se ha propuesto que los epididimosomas son los encargados de transferir las proteínas y otras moléculas a los espermatozoides (Sullivan & Sáez, 2013). Los epididimosomas son muy diferentes en cada región del epidídimo, lo que explica una transferencia diferencial de proteínas a los espermatozoides durante su recorrido, donde se integran a la membrana o en su estructura celular (Kirchhoff *et al.*, 1996; Eickhoff *et al.*, 2001). Por lo que, las proteínas que adquiere el espermatozoide están involucradas en funciones como la movilidad, capacitación,



reacción acrosomal, interacción con la zona pelúcida y fertilización (Eickhoff *et al.*, 2001; Frenette & Sullivan, 2001; Caballero *et al.*, 2012; Krapf *et al.*, 2012). Estudios proteómicos han demostrado que existen diferencias de proteínas de la región de la cabeza del epidídimo comparadas con la región de la cola (Thimon *et al.*, 2008; Girouard *et al.*, 2011; Baker *et al.*, 2012).

Además, se sabe que el epitelio del epidídimo puede interactuar con los espermatozoides, estos resultados revelan que tanto epididimosomas (figura 5), como el contacto directo del epitelio epididimario con los espermatozoides son de gran importancia para la transferencia de proteínas y otras moléculas (Paunescu *et al.*, 2014).



**Figura 5.** Liberación de epididimosomas en el epidídimo. El epitelio epididimario secreta hacia el lumen nutrientes y moléculas para brindar protección a los espermatozoides. Las células principales desprenden una ampolla apical en el lumen, se disuelve liberando epididimosomas. Los epididimosomas interactúan con los espermatozoides y células no adyacentes del epitelio. Los epididimosomas contienen lípidos de membrana, proteínas, entre otras moléculas que adquieren los espermatozoides para su maduración (Adaptado de James *et al.*, 2020).

### Modificaciones en membrana espermática

Los espermatozoides, además de la adquisición de proteínas, requieren otros cambios moleculares en su superficie durante el tránsito epididimario como: la agregación, cambio o eliminación de azúcares y lípidos anclados a la membrana espermática. Tanto las glicoproteínas como los polisacáridos forman una capa

denominada “glucocálix (Teclé & Gagneux, 2015). Mediante lectinas específicas se ha determinado la distribución de estos glicoconjugados en la membrana de los espermatozoides en las tres regiones epididimarias, donde carbohidratos como N-acetilglucosamina, ácido siálico y manosa, se presentan con un índice de fluorescencia alto en la región de la cabeza de los espermatozoides (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2021).

El epidídimo secreta concentraciones elevadas de glicohidrolasas y glicosiltransferasas solubles, que interactúan con los espermatozoides y están involucradas en la modificación de los carbohidratos en la membrana (Tulsiani *et al.*, 2006). Se ha demostrado que hay un cambio en la carga de la membrana espermática durante la maduración, debido específicamente a la integración del ácido siálico (Calvo *et al.*, 2000). La glicosilación en la membrana de los espermatozoides es fundamental, ya que carbohidratos como: N acetilglucosamina y ácido siálico, además de manosa, son requeridos para el proceso y reconocimiento del espermatozoide con la zona pelúcida del ovocito y la fertilización (Tulsiani & Abou-Haila, 2012; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2021).

### **Protección a los espermatozoides**

Después de abandonar el testículo, los espermatozoides carecen de mecanismos de defensa, debido a que pierden la capacidad de sintetizar proteínas (Teclé & Gagneux, 2015). Por lo que el epidídimo debe asegurar la supervivencia de los espermatozoides frente al daño oxidativo durante su recorrido y almacenamiento en la parte distal (Taylor *et al.*, 2013; Scarlata & O'Flaherty 2020). La BHE les brinda protección a los espermatozoides maduros del sistema inmunológico y ante sustancias nocivas que puedan existir en el torrente sanguíneo. Se sabe que entre el 60% y 80% de los espermatozoides están presentes en el lumen de la cola del epidídimo, por lo que las células epiteliales de esa región secretan enzimas específicas y factores para regular el pH luminal para mantener un entorno luminal que proteja y permita mantener a los espermatozoides en estado inactivo durante su almacenamiento (James *et al.*, 2020).

## **Regulación hormonal del epidídimo**

Las acciones de los andrógenos son reguladas por la unión a los receptores a andrógenos (RA). El RA en la rata se encuentra en todo el conducto epididimario, y abunda en las células principales (Robaire & Hamzeh, 2011). La T sintetizada en los testículos ingresa al epidídimo mediante los conductos eferentes o a través del torrente sanguíneo. En el epitelio epididimario la T es metabolizada a dihidrotestosterona (DHT) por la enzima 5 $\alpha$ -reductasa (5 $\alpha$ -R) o en estradiol (E<sub>2</sub>) por la P450-aromatasa (Robaire & Hamzeh, 2011; Falvo *et al.*, 2016). La DHT es el andrógeno biológico más activo en el organismo (Robaire y Hamzeh, 2011).

La T y DHT ejercen sus acciones uniéndose al RA, un receptor nuclear inducible por ligando, el cual regula la expresión de genes diana a través de la unión al DNA de elementos respuesta para andrógenos (ERA) (Robaire & Hamzeh, 2011; Hu *et al.*, 2014). De esta manera se lleva a cabo la síntesis de proteínas para la funcionalidad del epidídimo. La DHT que se sintetiza en el segmento inicial del epidídimo funciona corriente abajo, donde ejerce acciones en genes que dependen de andrógenos y proporciona dicho andrógeno a lo largo del epidídimo (Robaire & Hamzeh, 2011)

### **1.3. Parámetros de calidad espermática**

El manual de la OMS (2010) para evaluaciones de semen humano, se utiliza como fuente de metodología estándar para los laboratorios de andrología que analizan los parámetros de calidad espermática, para determinar el estado de fertilidad masculina. Estos se dividen en los parámetros macroscópicos y microscópicos.

#### **Macroscópicos**

Licuefacción. Después del eyaculado, el semen debe presentar un estado de coagulación, por lo que debe licuarse para el estudio. Esto se logra dejando la muestra de semen a temperatura ambiente durante 15-20 minutos.

Viscosidad. La muestra no debe presentar alta viscosidad, de lo contrario, podría haber alteraciones en la próstata.

Volumen. Deben transcurrir al menos 5 días de abstinencia sexual, para poder evaluar este parámetro. El volumen normal del eyaculado debe ser entre 1.5 a 6 mL. Si presenta un volumen inferior se denomina hipospermia.

Color. En condiciones normales, el color debe ser blanco o ligeramente amarillo. De lo contrario puede deberse a alteraciones que deben ser analizadas.

pH. Debe ser entre 7.2 y 8.0, si los valores son debajo de 7.2, podría atribuirse a daños u obstrucción de los conductos eyaculadores.

### **Microscópicos**

Concentración. Los valores normales van de los 15 a 39 millones de espermatozoides por cada mililitro de volumen del eyaculado. Si la concentración es menor a estos valores se denomina oligozoospermia.

Vitalidad. La vitalidad de los espermatozoides debe ser mayor al 58%, de lo contrario se denomina necrozoospermia.

Movilidad. Este parámetro se evalúa al diferenciar la movilidad y la movilidad progresiva. La movilidad progresiva de los espermatozoides debe ser mayor al 32%, o de lo contrario se denomina astenozoospermia.

Morfología. En este caso la normalidad de los espermatozoides no debe ser inferior al 4%, si es inferior, estamos hablando de teratozoospermia.

## 2. Antecedentes

El Cd está presente en el medio ambiente y es uno de los principales agentes tóxicos para la reproducción. La vida media biológica de este metal en el humano es de 20 a 40 años, ya que la tasa de excreción es baja y tiende a acumularse en el cuerpo provocando afecciones a distintos órganos (OMS, 2010; Bhardwaj *et al.*, 2021). El consumo de cigarrillo y de alimentos contaminados son las principales fuentes de exposición, así como la inhalación de vapores y polvo que lo contienen. El resultado es la acumulación de Cd en el cuerpo, por lo que varios órganos y sistemas son afectados ejerciendo efectos tóxicos en riñón, sistema respiratorio, sistema esquelético, sistema reproductivo, etc. (Thévenod *et al.*, 2019, 2020). Generalmente este metal está presente en el medio ambiente en concentraciones bajas, sin embargo, en las últimas décadas las actividades antropogénicas han aumentado sus concentraciones en el medio ambiente, ocasionando una exposición significativa y constante de la población humana (OMS, 2019). Dentro de los usos principales del Cd se encuentran las baterías recargables (Níquel-Cd), en aleaciones y diversos tipos de soldadura, en joyería, procesos industriales como agente corrosivo, absorbente de neutrones en plantas de energía nuclear, productos de cloruro de polivinilo, pigmentos de color, entre otros. La exposición a Cd en trabajadores en industrias es a través de procesos que involucran el calentamiento de este metal, que comprende materiales como la fundición y galvanoplastia (Kumar & Sharma, 2019).

De acuerdo con el Comité Mixto de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y de la OMS, además de los Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), se estableció en el 2010 que la ingesta mensual tolerable de Cd no debe exceder los 25 µg/kg de peso corporal, mientras que para el agua bebible es 3 µg/L y en el aire es de 5 ng/m<sup>3</sup> (OMS, 2019). Una vez que se ingiere el Cd, este es absorbido en el duodeno mediante el transportador de metal divalente 1 (DMT-1) que absorbe los microminerales (Mouro *et al.*, 2019).

## **2.1. Los efectos del Cd sobre la salud reproductiva masculina**

Se ha reportado que el Cd en el plasma seminal esta correlacionado con infertilidad (Tuncay *et al.*, 2021). Incluso, se ha encontrado Cd en bajas concentraciones en el plasma seminal y sanguíneo de humanos relacionado con azoospermia y oligospermia (Famurewa *et al.*, 2017). La relación entre la exposición a Cd e infertilidad masculina han categorizado dos grupos de estudios: 1) en poblaciones de sujetos con exposición ambiental y 2) sujetos con exposición ocupacional (Mínguez-Alarcón *et al.*, 2012). Tanto jóvenes como personas adultas residentes de zonas industrializadas reportaron que el parámetro más afectado es la concentración espermática (Balitán-Amoretty *et al.*, 2015). También se sabe que fumadores presentan un aumento de la concentración de Cd en sangre y plasma seminal asociado a un bajo recuento espermático, disminución en la movilidad, vitalidad y defectos en la morfología espermática (Akinloye *et al.*, 2006; de Angelis *et al.*, 2017). También se ha reportado, que las concentraciones séricas de Cd están relacionadas con la disfunción eréctil en la población en general (Gabrielsen *et al.*, 2018). Los estudios en animales indican que la exposición al Cd podría afectar las erecciones peneanas (Gabrielsen *et al.*, 2018; Kumar & Sharma, 2019).

Se ha definido que el Cd es un disruptor endocrino y causa efectos adversos en la salud cuando interfiere con el sistema endocrino y hormonal afectando la salud reproductiva (Henson & Chedrese, 2004). En la reproducción masculina la coordinación adecuada depende de la función del eje hipotálamo-hipófisis-testículo (HHT), el cual modula el funcionamiento de los testículos, así como la producción de las hormonas esteroideogénicas para llevar a cabo la espermatogénesis (Arteaga-Silva *et al.*, 2021). Los estudios tanto en animales como en humanos han demostrado que la exposición a Cd puede alterar la función del sistema endocrino, afectando las actividades de regulación hormonal, como su síntesis, metabolismo y transporte (de Angelis *et al.*, 2017). El eje HHT regula las hormonas sexuales mediante retroalimentación negativa, estimulando la síntesis de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante (FSH) (Plant, 2015). El Cd actúa en los tres niveles del eje HHT

alterando los mecanismos reguladores, donde puede alterar la liberación de neurotransmisores hipotalámicos y la secreción hormonal de la adenohipófisis (Lafuente, 2013; Duvilanski & Cabilla, 2014). Se ha concluido que el Cd podría penetrar en el tejido testicular causando daños y un deterioro en su función, observándose una interrupción en la espermatogénesis (Alaee *et al.*, 2014). El Cd es capaz de actuar como una metal-hormona al unirse a RA y receptor para estrógenos (RE), provocando fuertes respuestas androgénicas y estrogénicas (Dubilanski & Cabilla, 2014; Plunk & Richards, 2020).

El Cd puede causar citotoxicidad directa en el testículo, afectando a las células de Leydig, causar un desequilibrio en la síntesis de T y afectar la espermatogénesis (Luca *et al.*, 2013; Kumar y Sharma, 2019). La exposición a Cd en etapa perinatal puede afectar el desarrollo y función de células de Leydig fetales. En ratas gestantes expuestas via i.p. a Cd (0.25 – 1.0 mg/kg), disminuye la síntesis de T de los testículos y el número de células de Leydig fetales de la descendencia masculina. Otro efecto notable es el acortamiento de la distancia anogenital, el cual es dependiente de andrógenos (Li *et al.*, 2018). Además, en ratas expuestas a Cd durante la lactancia se afecta el desarrollo de las células de Leydig adultas, provoca el incremento de células inmaduras y disminuye las enzimas esteroidogénicas (Tian *et al.*, 2018). Se sabe por diversos estudios que el Cd disminuye las actividades de las enzimas  $3\beta$  y  $17\beta$  hidroxisteroides deshidrogenasas ( $3\beta$ -HSD y  $17\beta$ -HSD) (Sadik, 2008; Eleawa *et al.*, 2014; Cupertino *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2018). En ratas adultas con exposición a una dosis única de Cd, disminuye significativamente la concentración sérica de T y altera la morfología de las células de Leydig (Cupertino *et al.*, 2017).

Las células de Sertoli son más sensibles a la exposición a Cd afectando su función al reducir la respuesta del receptor de FSH y disminuir la secreción de la hormona anti-Mulleriana y la inhibina-B (Luca *et al.*, 2013; de Angelis *et al.*, 2017).

Al ser un blanco común de la toxicidad del Cd, los daños más observados han sido la vacuolización, alteraciones en las uniones intercelulares y la acumulación de estructuras muy similares a los lisosomas (de Souza-Predees *et al.*, 2011). El Cd también afecta el desarrollo de las células de Sertoli durante los

períodos fetal y neonatal. La exposición a Cd (1-2 mg/kg) en ratas gestantes y lactantes puede provocar vacuolización de las células de Sertoli, genera desprendimiento de células germinales en el epitelio seminífero adulto de la descendencia masculina (Bekheet, 2011; Zhu *et al.*, 2020). El Cd inhibe la proliferación e induce la apoptosis y daño al DNA de las células de Sertoli inmaduras, provocando alteraciones en la ultraestructura y alteraciones en la BHT (Zhang *et al.*, 2010; de Souza-Predes *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado que el Cd puede dañar el citoesqueleto de las células de Sertoli al interrumpir la organización de la F-actina y alterar la expresión de proteínas reguladoras, provocando la interrupción de la BHT tanto en modelos de roedores como en humanos. (Xiao *et al.*, 2014). La exposición de Cd en dosis de 5 a 10  $\mu$ M durante 8 horas interrumpe el ensamblaje de las uniones estrechas de las células de Sertoli (Siu *et al.*, 2009b; Wan *et al.*, 2014).

El epidídimo es otro órgano reproductivo que puede ser afectado por Cd y la exposición aguda a este metal puede disminuir su peso (Predes *et al.*, 2016). El Cd provoca alteraciones en las uniones de las células epididimarias, afectando la BHT (Dube & Cyr, 2012). Se ha reportado que el Cd puede provocar una desorganización celular, engrosamiento del músculo liso y aumento en la altura del epitelio de la cabeza y cola del epidídimo, lo que se relaciona con una disminución del diámetro de la luz epididimal (Predes *et al.*, 2016; Adamkovicova *et al.*, 2014), además de provocar edema del endotelio vascular (de Angelis *et al.*, 2017). El Cd puede afectar la adherencia de las células principales y basales e inducir un aumento de vesículas que ocupan la mayor parte del citoplasma de las células (Lamas *et al.*, 2017). La exposición a Cd desde el nacimiento a etapas peripuberales afecta la histología y función del epidídimo, lo que se relaciona con alteraciones en los cambios bioquímicos de la glicosilación de la membrana plasmática de los espermatozoides, interrumpiendo así su maduración durante su recorrido en este órgano reproductivo (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2021).

Además, el Cd puede inhibir la acidificación vacuolar de ATPasa H<sup>+</sup>, provocando disminución de alcalinización que altera la movilidad de los espermatozoides (Herak-Kramberger *et al.*, 2000; Anjum *et al.*, 2017).



Por lo tanto, el Cd al afectar los túbulos seminíferos en el testículo puede provocar el desprendimiento de células germinales inmaduras, que da como resultado anomalías en el desarrollo temprano de los espermatozoides, lo que induce a la apoptosis de células germinales y en consecuencia un bajo recuento espermático que se verá reflejado en el epidídimo (Zhang *et al.*, 2010). Se ha observado que las anomalías más comunes y con mayor porcentaje son el desprendimiento de cabezas (Wang *et al.*, 2012), así como un aumento en anomalías del flagelo de los espermatozoides, observándose flagelos con torsión, roturas, formas en zigzag y retención de gotas citoplasmáticas (Adamkovicova *et al.*, 2016), ocasionando una disminución de la calidad espermática (Benoff *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2016).

Con respecto a la movilidad, el Cd afecta diferentes parámetros de movimiento, observándose alteraciones en la motilidad progresiva, la trayectoria media de distancia, línea curva y recta de distancia, trayectoria media de velocidad, línea curva y recta de velocidad, linealidad, rectitud, oscilación, amplitud lateral del desplazamiento de la cabeza y frecuencia cruzada de latidos (Adamkovicova *et al.*, 2016). La concentración, movilidad, viabilidad y morfología de los espermatozoides se han correlacionado con la disminución en las concentraciones de T y del estrés oxidante causados por el Cd (Pandya *et al.*, 2012).

### **2.1.1. Mecanismos celulares del Cd**

La principal absorción de Cd es a través de la vía pulmonar y gastrointestinal, después llega al hígado donde puede formar complejos con proteínas mediante los grupos sulfhidrilos, con el glutatión (GSH) y las metalotioneínas (MT) (Thévenod, 2009; Neminche, 2017). El Cd puede ingresar a las células donde ejerce su toxicidad, causa daños en mitocondria, causa muerte celular por apoptosis o necrosis, y provoca daños severos como fibrosis tisular e inflamación (Thevenod, 2009).

El Cd no tiene alguna función fisiológica esencial y puede imitar a iones metálicos como Ca, Cu, Mn, Fe y Zn, que son esenciales en el organismo (de Angelis *et al.*, 2017; Thévenod *et al.*, 2021). El Cd es capaz de atravesar las

membranas celulares, donde compite por las vías de transporte, a esto se le conoce como mimetismo iónico (Thevenod *et al.*, 2021). Se conocen dos mecanismos de mimetismo: el mimetismo iónico y mimetismo molecular. El mimetismo iónico es aquel donde los iones de Cd imitan distintas especies químicas, y así tienen la facilidad de poder ingresar a la célula a través de transportadores de proteínas de membrana o bien lo puede hacer por canales específicos para la captación de iones (Bridgest & Zalups, 2005; Chmielowska-Bąk *et al.*, 2013). El mimetismo molecular es cuando el Cd es capaz de desplazar a diferentes iones de la posición que ocupan en moléculas biológicas. Estos mecanismos de mimetismo son los causantes de los daños en la célula. De tal manera que el Cd puede interferir en la regulación de la concentración de los iones esenciales y en la modificación de la estructura de moléculas diana de dichos iones, inhibiendo la función biológica y provocando irregularidades en la distribución, absorción y biodisponibilidad iónica en la célula (Bridgest & Zalups, 2005; de Angelis *et al.*, 2017). En el testículo se ha demostrado que una de las vías principales de entrada del Cd son los transportadores de Zn (ZnT) (Dalton *et al.*, 2005) y que puede interferir con el Zn debido a su similitud química, de manera que lo puede sustituir con facilidad ocasionando inestabilidad en los sitios funcionales de proteínas que contienen Zn (Tang *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que la inducción de estrés oxidativo es uno de los mecanismos implicados en la toxicidad por Cd (Nemmiche, 2017). Es importante mencionar que el Cd por sí solo no puede generar radicales libres, por lo que el aumento de especies reactivas de oxígeno (EROS) y de estrés oxidante está dado por mecanismos indirectos (Liu *et al.*, 2009; Polykretis *et al.*, 2019). El Cd interfiere en los sitios de unión de los iones Cu, Zn y Se en las enzimas antioxidantes, y desequilibra su función al reducir su capacidad reguladora lo que conlleva al aumento de EROS e induce estrés oxidante. El estrés oxidante induce la peroxidación de lípidos en membrana, daños al DNA y la oxidación de distintas proteínas, además de disfunción mitocondrial que finalmente provoca muerte celular (Bhardwaj *et al.*, 2021). El estrés oxidante provocado por Cd disminuye las funciones de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), GSH, glutatión reductasa (GSR) y glutatión peroxidasa (GPx), y provoca un aumento de las

concentraciones de malondialdehído (MDA) el cual es un marcador de lipoperoxidación (Wang *et al.*, 2011; Bashir *et al.*, 2019; Shi & Fu, 2019).

Además, el estrés oxidante inducido por Cd regula la expresión de la proteína proapoptótica BCL-2 asociada a proteína x (Bax), el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), y regula negativamente la expresión del gen antiapoptótico (Bcl2), activando la caspasa-3 y -7 provocando muerte celular (Alkhedaide *et al.*, 2016; Elmallah *et al.*, 2017; Dai *et al.*, 2019; Amanpour *et al.*, 2020).

## **2.2. La importancia y efectos del Zn en la salud reproductiva masculina**

La función del Zn en la salud y enfermedades ha sido abordada en diferentes estudios, haciendo énfasis en los problemas de deficiencia de este metal (Jurowski *et al.*, 2014). Es un micronutriente que se presenta como metal catiónico divalente (Kerns *et al.*, 2018; Levaot & Hershinkel, 2018). El Zn difiere de otros metales esenciales como el Fe y Cu, quienes presentan estados redox, dado que el Zn al ser estable no presenta directamente reacciones redox y no puede donar ni recibir electrones libres. Es considerado un metal redox inerte, y por lo tanto no es considerado un antioxidante tradicional (Lee, 2018). Sin embargo, puede interactuar en distintas proteínas y enzimas, donde al unirse a sitios específicos en algunas enzimas, funcionan como antioxidantes (Kerns *et al.*, 2018; Lee, 2018).

El Zn está presente en todos los órganos y tejidos, y su deficiencia es causante de daños severos en la salud (Prasad *et al.*, 2014). No se conocen sitios de almacenamiento de Zn en el cuerpo, por lo que la ingesta debe ser frecuente (Kerns *et al.*, 2018). El Zn es absorbido por el duodeno, íleon y yeyuno, se distribuye a través del suero en donde se une a la albúmina y a una gran cantidad de proteínas (Jarosz *et al.*, 2017; Kerns *et al.*, 2018).

A nivel celular este elemento se encuentra en un 40% en el núcleo, un 50%, en el citoplasma y el 10% se asocia a membranas y proteínas (Kambe *et al.*, 2014; Kerns *et al.*, 2018). La movilización del Zn es ejercida por dos principales familias transportadoras, la familia importadora de Zn (ZIP) quienes lo transportan hacia el citosol y la familia ZnT, estas proteínas lo transportan fuera del citosol (Lichten & Cousins, 2009; Kambe *et al.*, 2014; Kimura & Kambe, 2016). Cuando el Zn ingresa

a la célula por estos transportadores, se dirige hacia el retículo endoplásmico, mitocondrias, aparato de Golgi y algunas proteínas (Kerns *et al.*, 2018). El Zn citosólico se une a las apoproteínas tioneínas para formar MT. Las MT junto con los transportadores ZIP y ZnT, pulen el exceso de Zn y suministran este elemento en sitios con deficiencia (Blindauer & Leszczyszyn, 2010; Kimura & Kambe, 2016; Lee, 2018).

Los primeros estudios del Zn en órganos reproductivos como el testículo, han demostrado que tiene efectos muy favorables ante la exposición a tóxicos (Parizek, 1957), y desde entonces se ha demostrado que el Zn juega un papel importante en la salud reproductiva masculina (Wani *et al.*, 2017; Skoracka *et al.*, 2020). Estudios en varones fértiles indican concentraciones altas de Zn en comparación con varones infértiles en donde se observa una reducción de este elemento (Colagar *et al.*, 2009). Las concentraciones bajas de Zn o en su caso una deficiencia de este metal se relaciona con la disminución tanto en volumen como en el peso testicular, lo cual implica fallas en la espermatogénesis (Prasad, 2013, 2014; Allouche-Fitoussi & Breitbart, 2020).

El desarrollo del testículo y la esteroidogénesis son dependientes de Zn, por lo que la deficiencia se relaciona con hipogonadismo, oligospermia, astenozoospermia y azoospermia (Gandhi *et al.*, 2017; Kerns *et al.*, 2018; Skoracka *et al.*, 2020). Se ha reportado, que la concentración de Zn en los órganos reproductivos masculinos y en el semen humano es significativamente más alta que en otros fluidos y tejidos corporales y su deficiencia causa alteración en la función reproductiva (Boran & Ozkan, 2004; Allouche-Fitoussi & Breitbart, 2020). En el plasma seminal y la próstata la presencia de Zn es esencial debido a que las concentraciones fisiológicas de este elemento favorecen la preservación de los espermatozoides en cuanto a concentración, morfología y función, las cuales son características necesarias para llevar a cabo una adecuada fertilización (Kothari & Chaudhari, 2016; Fallah *et al.*, 2018). Además, el Zn es un ion necesario para llevar a cabo la capacitación y la reacción acrosomal (Gangwar & Atreja, 2015; Kerns *et al.*, 2018).

En la regulación hormonal el Zn desempeña funciones importantes al estar presente en la mayoría de las enzimas, lo que influye en el sistema reproductivo masculino a través de las hormonas gonadotrópicas (Baltaci *et al.*, 2006, 2019).

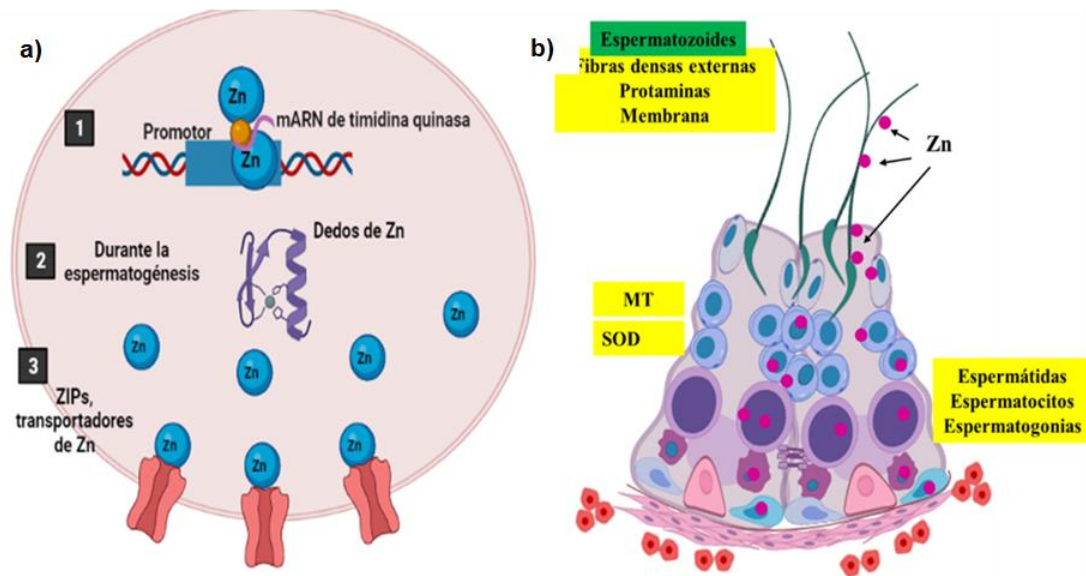
Se ha reportado que transportadores de Zn (ZnT-8) se localizan en células de Leydig tanto en humano como en ratón. Este transportador de Zn también se localiza en las mitocondrias de las células de Leydig, lo cual facilita el transporte de Zn desde el citosol hacia las mitocondrias. Por lo que se sugiere que ZnT-8 está relacionado con la acumulación de Zn, y que puede regular la fosforilación de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) y llevar a cabo la síntesis de T (Zhang *et al.*, 2018).

Estudios en ratones revelan que la LH regula la expresión de proteínas de dedos de zinc en células de Leydig, estas proteínas tienen un papel importante en la proliferación y diferenciación celular y esta expresión se relaciona con la secreción de T (You *et al.*, 2017).

La deficiencia de Zn no sólo afecta la reducción de la síntesis y secreción de T, también disminuye e inhibe la secreción de LH y FSH (Ozturk *et al.*, 2005), además de la reducción en la actividad de los RA, por lo que se ha demostrado que la suplementación de Zn aumenta la síntesis de T (Baltaci *et al.*, 2019).

La actividad del Zn en la espermatogénesis ha sido estudiada, donde se sabe que es fundamental (Yamaguchi *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2013; Vickram *et al.*, 2021), y esencial durante las etapas tempranas, donde actúa como regulador en la proliferación de espermatogonias, para el periodo de meiosis y el mantenimiento de las células germinales (Ellis, 2014; Hai *et al.*, 2014). En los espermatocitos este elemento está presente en el núcleo y cromatina (Zhao *et al.*, 2013), de manera que el aumento de Zn en el testículo durante el periodo temprano de la espermatogénesis es necesario para que este proceso pueda llevarse a cabo (Hai *et al.*, 2014). Por lo que una deficiencia de este elemento se relaciona con ausencia en la proliferación de espermatogonias y muerte de células germinales (Omu *et al.*, 2015; Olesen *et al.*, 2018). Una de las proteínas con función necesaria para la espermatogénesis son las proteínas dedos de Zn (Ishizuka *et al.*, 2016). Estas

proteínas son el componente fundamental para la acción de los factores de transcripción (Ecoo *et al.*, 2017) (figura 6a).



**Figura 6.** EL Zn en la espermatogénesis. En la figura a) muestra como el Zn 1) inicia la transcripción de la timidina quinasa, 2) las proteínas de dedos de Zn como factor de transcripción y 3) la captación de Zn por los transportadores ZIP durante la espermatogénesis. En la figura b) se muestra que el Zn se acumula en las células germinales, además de unirse a MT y ser fundamental para SOD y en los espermatozoides. Metalotioneínas (MT), superóxido dismutasa (SOD) (Adaptado de Vickram *et al.*, 2021; Elegazar *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que la presencia de los transportadores de Zn, así como MT en los espermatocitos y espermatidas es esencial para el proceso espermatogénico (Sugihara *et al.*, 1999; Sutou *et al.*, 2003; Elegazar *et al.*, 2005), (figura 6b).

Estudios en ratas indican que la presencia de Zn en la espermatogénesis es necesaria para la formación de los enlaces disulfuro en la etapa de la espermiogénesis. Durante esta etapa el Zn ejerce su función en la integración de la cromatina de los espermatozoides. El remplazo de histonas por protaminas es una estrategia protectora de gran importancia que presentan los espermatozoides ante los daños al DNA (Razavi *et al.*, 2019). Esto ocurre durante las etapas finales de diferenciación en las espermatidas, donde el Zn se incorpora al núcleo y en las fibras

densas, el Zn nuclear se asocia con las protaminas formando puentes de Zn para estabilizar la estructura de la cromatina (Bjorndahl & Kvist 2010, 2011). En el flagelo, el Zn se une a los grupos sulfhidrilo de cisteínas de las fibras densas externas, esto es necesario para brindarle al flagelo protección de una oxidación prematura (Henkel *et al.*, 2003; Bertelsmann *et al.*, 2007).

Existen evidencias que sugieren que las mitocondrias pueden suministrar Zn mediante transportadores, además que el propio Zn ejerce actividad en la función mitocondrial de las células germinales. El Zn se integra con las membranas de los espermatozoides, interactuando con MT y lipoproteínas, mediante los grupos sulfhidrilo para ejercer la función de estabilizar a la membrana, de esta manera el Zn protege a la membrana espermática proporcionando una capa de protección y así aumentar el potencial de fertilización (Li *et al.*, 2017; Vickram *et al.*, 2021).

El proceso de captación de Zn en el citoplasma es llevado a cabo por transportadores de Zn para el proceso espermatogénico, de manera que la expresión disminuida de las proteínas transportadoras a nivel intracelular provoca alteraciones en este proceso (Thomas *et al.*, 2018). Otros estudios indican que los niveles de EROS en testículo aumentan cuando los niveles del Zn son bajos, lo que provoca apoptosis en células somáticas y germinales, esta deficiencia muestra que los niveles de GSH y GPx también disminuyen (Chen *et al.*, 2020).

En el epidídimo el Zn cumple papeles importantes, debido a que la mayoría de las proteínas secretadas por este órgano para dar funcionalidad a los espermatozoides dependen de Zn (Maldera *et al.*, 2011; Sheng *et al.*, 2021). Durante la espermatogénesis el Zn se une a las fibras densas externas del flagelo para proteger al espermatozoide de una oxidación prematura (Kerns *et al.*, 2018), sin embargo, durante la maduración del espermatozoide, se elimina la mayor cantidad de este elemento y es absorbido por el epidídimo. Posterior a la eliminación del Zn, se oxidan los grupos sulfhidrilo (zinc-tiol), endureciendo las fibras densas externas, por lo que la eliminación de Zn es necesaria para brindarle la movilidad progresiva al espermatozoide (Henkel *et al.*, 2003; Kern *et al.*, 2018).

La manera en que las proteínas secretadas por el epidídimo pueden transferirse a los espermatozoides, esta mediada por los epididimosomas, los cuales dependen de Zn que funciona como potenciador para la interacción de epididimosomas y espermatozoides (Sullivan *et al.*, 2007; Sullivan, 2016).

Por otro lado, el epidídimo metaboliza la T a DHT a través de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa que es dependiente Zn, por lo que la deficiencia de Zn influye a una disfunción de la DHT, lo que provoca alteraciones en la secreción de proteínas de las células epididimarias (Henkel *et al.*, 2003; Baltaci *et al.*, 2019).

Las glándulas accesorias sexuales masculinas secretan en el plasma seminal elementos y sustancias que protegen a los espermatozoides durante la eyaculación (Fallah *et al.*, 2018). El plasma seminal se compone de proteínas, enzimas, lípidos, macroelementos como el sodio (Na), potasio (K), Ca, magnesio (Mg) y microelementos como el Cu, Fe y el Zn (Yuyan *et al.*, 2008). El Zn se encuentra en altas concentraciones en el líquido seminal, propiciando la flexibilidad de los lípidos de la membrana del espermatozoide, además de protegerlos ante la oxidación (Chia *et al.*, 2000). El Zn ayuda a preservar la movilidad espermática (Wong *et al.*, 2001; Jeng *et al.*, 2015). Las vesículas seminales también juegan un papel importante en las últimas etapas de la eyaculación (La Vignera *et al.*, 2013), ayudan a la coagulación del semen mediante las proteínas semenogelinas y esta coagulación es mediada por el Zn para mantener una consistencia viscosa (Roan *et al.*, 2014). Se ha demostrado que la deficiencia o concentraciones bajas de Zn conducen a una baja calidad del semen (Colagar *et al.*, 2009). Se ha reportado que alteraciones en las concentraciones de Zn en el plasma seminal, perjudica la concentración, movilidad, viabilidad, pH y la viscosidad (Dissanayake *et al.*, 2010). Aunado a que el Zn tiene función reductora sobre el estrés oxidante del plasma seminal y modula la respuesta inmune (Vickram *et al.*, 2021).

El Zn tiene función en la capacitación y en la fertilización (Liu *et al.*, 2009; Gangwar & Atreja, 2015), es una pieza clave que se requiere forzosamente para aumentar la capacidad fertilizante (Badade *et al.*, 2011).



Por lo tanto, la deficiencia de Zn, altera la espermatogénesis, la síntesis de T y funcionalidad del epidídimo, y estas alteraciones se reflejan en una alteración de los parámetros espermáticos (Omu *et al.*, 2015).

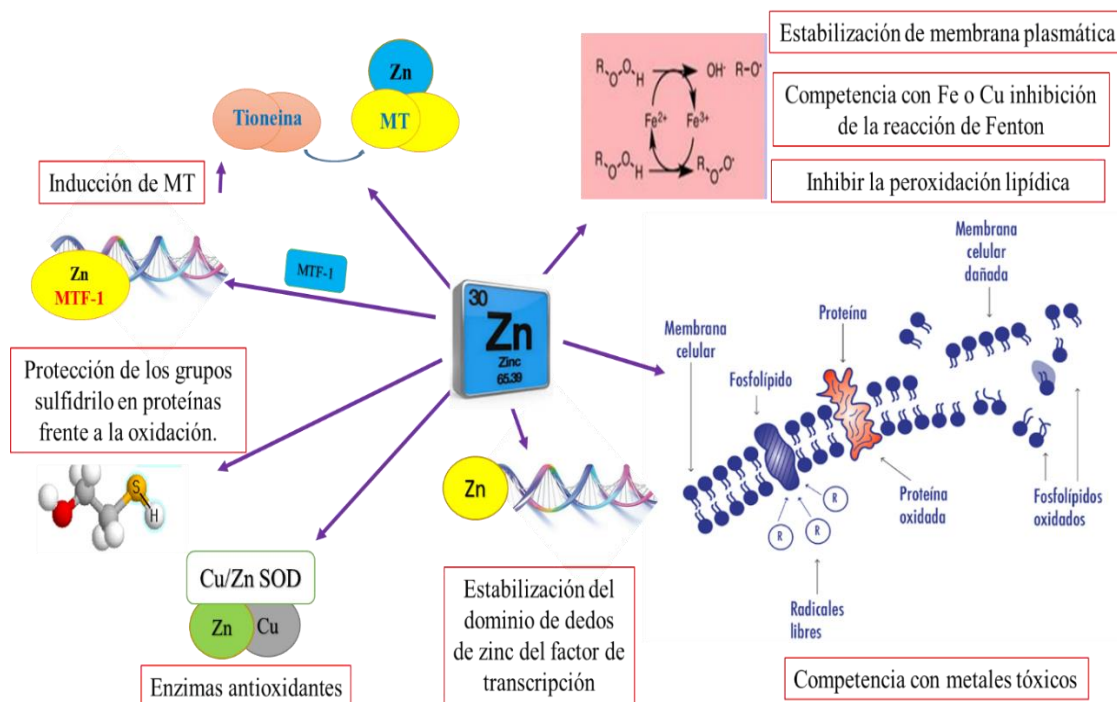
### **2.2.1. Mecanismos celulares del Zn**

Las enzimas y proteínas que requieren de Zn para su función biológica son conocidas como metaloproteínas (Andreini *et al.*, 2006; Andreini & Bertini, 2012; Zhang & Zheng, 2020). Los tipos de metaloproteínas en las que el Zn es requerido son las proteínas reguladoras de genes, las metaloenzimas y las MT (Vallee & Falchuk, 1993; Wessels *et al.*, 2017). El Zn es el único metal que se puede encontrar en la mayoría de las enzimas como oxidoreductasas, hidrolasas, transferasas, isomerasas, liasas y ligasas (Wessels *et al.*, 2017; Kerns *et al.*, 2018). Esto se debe a que el Zn posee propiedades como baja toxicidad en comparación a otros metales de transición, es muy estable y presenta mayor coordinación con las macromoléculas (Vallee & Auld, 1992). En las enzimas el Zn participa en tres funciones específicas: una función catalítica, donde el Zn cumple una función directa en la catálisis enzimática, una función coactiva o cocatalítica, en esta función puede aumentar o disminuir la función catalítica junto con el Zn catalítico y por último el Zn es requerido para las estructuras cuaternarias y la estabilización de las enzimas oligoméricas (Vallee & Auld 1992; Kerns *et al.*, 2018).

Las enzimas con mayor afinidad al Zn son las MT, cuya función es la eliminación de metales tóxicos y de radicales libres para brindar un equilibrio intracelular, además de brindar protección contra el daño al DNA (Polykretis *et al.*, 2019). El Zn en el citosol se transloca como suministro intracelular al retículo endoplasmático, aparato de Golgi, lisosomas y mitocondrias (Lu *et al.*, 2016). Regula positivamente factores de transcripción como el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) (Lee, 2018), que modula la expresión de genes de enzimas antioxidantes y desintoxicantes, la SOD y GSH son productos de esta regulación (Lee & Johnson, 2004; Jarosz *et al.*, 2017). Además, la competencia del Zn con Fe y Cu en la membrana celular puede inhibir la función de la enzima NADPH oxidasa, la cual es una fuente de superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El Zn al competir

con estos metales también impide que se lleve a cabo la reacción de Fenton y, por lo tanto, puede inhibir la lipoperoxidación (O'Dell, 2000; Prasad, 2014b). El Zn puede suprimir la propagación de la lipoperoxidación en la fosfatidilserina, donde el aluminio (Al) y otros metales tienden a unirse (Lee, 2018). Además, el Zn ejerce funciones en la estabilización de la membrana y en macromoléculas donde reduce el daño oxidante (O'Dell, 2000; Li *et al.*, 2017) (figura 7). El suministro adecuado de Zn en las mitocondrias es fundamental para que sean capaces de llevar a cabo la transcripción y traducción (Taylor *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que la deficiencia de Zn está relacionada con la respuesta inflamatoria y el aumento de la señalización proapoptótica (Bax, caspasa-3) en células germinales al reducir las señales antiapoptóticas (Bcl-2) (Omu *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2020).



**Figura 7.** Funciones esenciales del Zn. El Zn ejerce diversas funciones que son necesarias para los organismos. Desde ser pieza clave en la estabilización del dominio de dedos de zinc como factor de transcripción, ser cofactor de enzimas como Zn Cu/Zn SOD, unión a grupos sulfhidrilo, factor de transcripción de MT, estabilizador en membranas. El Zn puede competir con otros metales como Cu y Fe que actúan en la reacción de Fenton e impedir la lipoperoxidación, además de competir con metales tóxicos. Zinc (Zn), cobre (Cu), superóxido desmutasa (SOD), factor 1 inductor de metales (MTF-1) (Adaptado de Lee, 2018).

### **2.2.2. Sistema antioxidante y Zn**

Como se mencionó anteriormente, el Zn no es un antioxidante en un sentido estricto, es decir, no es redox activo, por lo tanto, no actúa directamente con los radicales libres o con las EROS (Lee, 2018; Maret, 2019). Sin embargo, el Zn es componente estructural de proteínas e interactúa con enzimas, tal es el caso de las metaloenzimas, donde puede actuar como cofactor en los sitios activos, o en combinación con otros metales. Las enzimas antioxidantes como la SOD que requiere de Cu y Zn como cofactor para su función catalítica el estado redox y ser la defensa ante el ataque oxidante (Bridgest & Zalups, 2005; Zwolak, 2020), además, el Zn interactúa y modula la acción de quinasas o fosfatasas (Bridgest & Zalups, 2005; de Angelis *et al.*, 2017). Por lo tanto, está relacionado con la disminución de los niveles altos de EROS, los cuales son responsables de muchas afecciones a nivel celular (Lee, 2018).

Es evidente que las concentraciones de Zn en el organismo son requeridas para muchas funciones vitales. Sin embargo, es importante mencionar que también puede actuar como prooxidante al alcanzar niveles extremos en el organismo (Napoli *et al.*, 2011; Lee, 2018; Maret, 2019). De acuerdo con la base de datos TOXNET de la biblioteca Nacional de Medicina de EE. UU., la dosis oral letal de Zn es de 3 g/kg de peso corporal, la cual es 10 veces mayor que la del Cd (Plum *et al.*, 2010). Las concentraciones altas de Zn citosólico pueden afectar el ensamblaje correcto de proteínas mitocondriales, comprometiendo a muchas enzimas, provocando disfunción mitocondrial y un aumento de EROS (Napoli *et al.*, 2011).

### **3. Justificación**

Tanto el testículo como el epidídimo son órganos con funciones necesarias para el éxito reproductivo. El testículo es un órgano donde se lleva a cabo la espermatogénesis y la síntesis de T, mientras que en el epidídimo se lleva a cabo la maduración espermática, por lo que los espermatozoides que son liberados del testículo deben atravesar el epidídimo para adquirir modificaciones funcionales en cuanto a su movilidad y su capacidad fertilizante. Sin embargo, existe evidencia que tanto la espermatogénesis y la calidad espermática, tanto en humanos como en animales presentan alteraciones por la exposición a Cd. El Cd provoca daños reproductivos, alterando la función del eje HHT, provocando alteraciones histológicas testiculares que dan como resultado un deterioro en la espermatogénesis y en los procesos de maduración epididimaria que se relacionan con la infertilidad masculina.

Por otro lado, el Zn, al ser un elemento esencial para la espermatogénesis, la síntesis de T y la maduración espermática epididimaria, puede ser capaz de proteger las alteraciones histológicas causadas por la toxicidad del Cd en testículo y epidídimo, así como los parámetros de calidad espermática.

### **4. Hipótesis**

El Zn reducirá las alteraciones histológicas causadas en el testículo, epidídimo y en los parámetros espermáticos generados en la rata por la exposición a Cd.

### **5. Objetivo general**

Analizar el efecto del pretratamiento con Zn sobre las alteraciones histológicas del testículo, epidídimo y parámetros espermáticos por la exposición a Cd en ratas macho.

## **6. Objetivos específicos**

- Analizar los efectos del pretratamiento con Zn sobre las características histológicas de los túbulos seminíferos del testículo en ratas expuestas a Cd.
- Analizar los efectos del pretratamiento con Zn sobre las características histológicas de las tres regiones del epidídimo: cabeza, cuerpo y cola en ratas expuestas a Cd.
- Evaluar los efectos del pretratamiento con Zn sobre los parámetros espermáticos: concentración, vitalidad y morfología en ratas expuestas a Cd.
- Evaluar los efectos del pretratamiento con Zn sobre la concentración de T en ratas expuestas a Cd.

## 7. Material y métodos

Se utilizaron ratas hembra gestantes de la cepa Wistar provenientes de la UMADI de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I), para la obtención de crías macho. Se distribuyó aleatoriamente a los machos en camadas de 6 crías por nodriza.

Los animales fueron distribuidos en forma aleatoria en cuatro grupos con n=6.

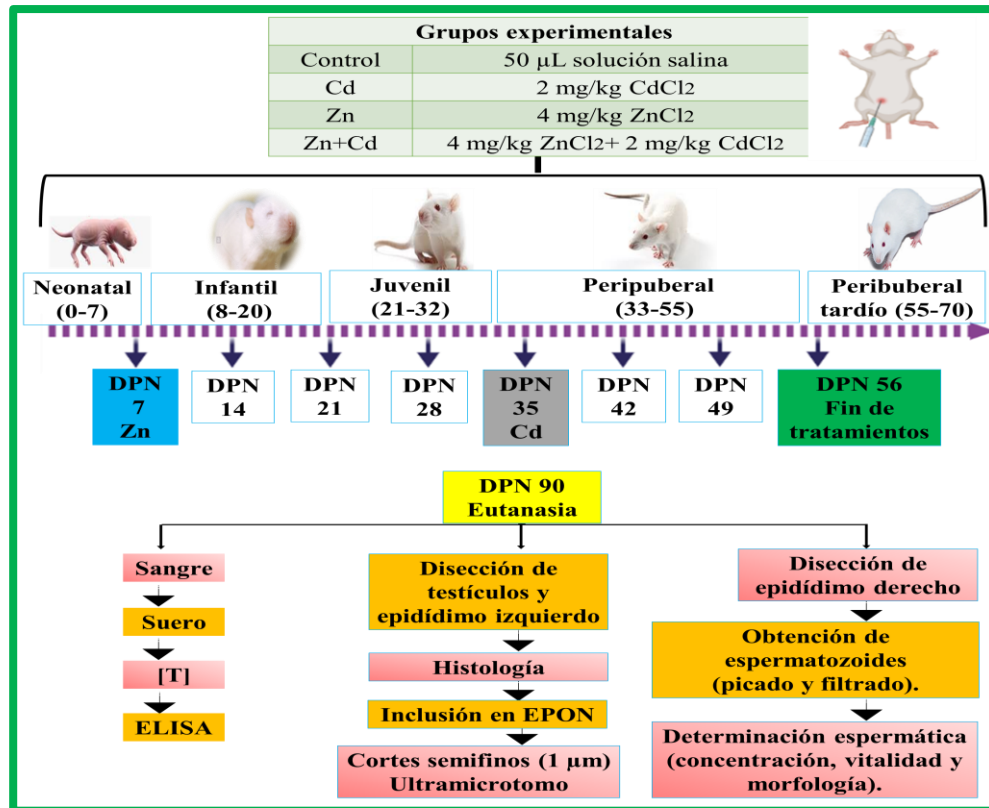
- Grupo 1, Control: machos de 35 días de vida con administración de solución salina vía (i.p.) en 50  $\mu$ L.
- Grupo 2, Cd: machos de 35 días de vida, a los cuales se les administró 2 mg/Kg de CdCl<sub>2</sub> (JT, Baker) en 50  $\mu$ L de solución salina vía i.p.
- Grupo 3, Zn: machos de 7 días de vida, a los que se les administró 4 mg/Kg de ZnCl<sub>2</sub> (JT, Baker) en 50  $\mu$ L de solución salina vía i.p.
- Grupo 4, Zn+Cd: machos de 7 días de vida, con administración de 4 mg/Kg de ZnCl<sub>2</sub>. En el día 35 de vida se les administró 2 mg/Kg de CdCl<sub>2</sub> vía i.p.

Los grupos fueron administrados una vez por semana desde el día 7 de vida (semana 1), hasta el día 56 de vida (semana 8). En el grupo de Zn+Cd la administración CdCl<sub>2</sub> que comenzó en el día 35 de vida, se realizó con un intervalo de una hora después de la administración de ZnCl<sub>2</sub>. Las dosis se eligieron según reportes previos (El-Maraghi & Nassar, 2011; Asgharzadeh *et al.*, 2021).

Todos los machos fueron destetados al día 21 de vida y permanecieron alojados en jaulas de acuerdo con su tratamiento. En todo el tiempo los animales se mantuvieron en condiciones estándar con una temperatura regulada ( $24 \pm 2$  °C), se mantuvieron con alimento y agua *ad libitum*, bajo un ciclo de luz-oscuridad controlado (12:12) y se llevó a cabo el registro de los pesos corporales de cada grupo. Todos experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio), junto con los lineamientos de la conducción ética de investigación, docencia y la difusión de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (DCBS) de la UAM-I.

## Diseño experimental

Cuando los animales cumplieron 90 días de vida, se les practicó eutanasia por decapitación, y se recuperó la sangre del cuerpo en tubos Vacountainer para determinar la concentración de T mediante la técnica de ELISA. Inmediatamente después de la eutanasia, se realizó la disección bilateral de los testículos y de los epidídimos y se les retiró el tejido adiposo y se registraron los pesos. Los epidídimos fueron seccionados en sus tres regiones anatómicas (cabeza, cuerpo y cola). Al testículo derecho, y cada sección del epidídimo izquierdo fueron fijadas en solución de Karnovsky para su posterior análisis histológico. De las secciones del epidídimo derecho se obtuvieron a los espermatozoides para los análisis de determinación espermática.



## **Índice somático para órganos reproductivos**

Se registraron los pesos del testículo y del epidídimo del grupo control y de cada grupo experimental para posteriormente calcular el índice somático de ambos órganos, mediante la siguiente fórmula (Anjum *et al.*, 2017).

$$IS = \frac{\text{peso del órgano}}{\text{peso de la rata}} \times 100$$

## **Procesamiento y evaluación histológica del testículo y epidídimo de rata macho**

Después de la extracción del testículo derecho y del epidídimo izquierdo regionalizado del grupo control y de cada grupo experimental, se fijaron durante 24

Horas en solución de Karnovsky modificada y se procesaron para inclusión en resina epóxica (EPON 812 Ted Pella, Inc., Redding, CA, USA). Posteriormente se continuó con 4 lavados de 30 minutos c/u con buffer de cacodilato de sodio al 0.1 M. Posteriormente se realizó una post-fijación con tetróxido de osmio al 1% (Zelterquist), durante una hora, seguido de tres lavados con agua destilada. Se llevó a cabo un tren de deshidratación de las muestras en alcoholes de: 60%, 70%, 80%, 90%, 96% hasta llegar a alcohol absoluto (2 lavados de 10 a 15 minutos por cada alcohol). Para iniciar el proceso de inclusión en la resina, se realizaron dos lavados de 20 minutos con óxido de propileno. Se continuó con la impregnación de la resina, donde las muestras se dejaron en diluciones graduales de óxido de propileno: EPON (2:1 durante una hora, 1:1 durante 24 horas, 1:2 durante 24 horas) y otra de EPON puro durante 24 horas. Cada sección del tejido se colocó en moldes con EPON puro durante 24 horas en una estufa a 60°C para su polimerización. Se obtuvieron cortes semifinos de 1 µm de grosor mediante un ultra micrótopo (Leica modelo Ultracut-UCT) y se tiñeron con azul de toluidina al 0.5% (SIGMA-ALDRICH, México), finalmente se realizaron montajes en portaobjetos para su análisis. El análisis histológico se realizó mediante un microscopio Leica a 20X, 60X, con un sistema de análisis de imágenes (Imagen-ProPlus 6.0). Por cada laminilla se examinaron 10 secciones transversales de túbulos seminíferos y epitelio



epididimario donde se determinó: área y diámetro de túbulos seminíferos, índice de maduración del epitelio seminífero (Índice de Jonhsen, ANEXO I), índice histopatológico testicular (ANEXO II), area y altura de células principales del epitelio epididimario.

### **Obtención de muestras de espermatozoides del epidídimo**

Todos los procedimientos fueron realizados a 36 °C. Tanto la disección, la eliminación del tejido adiposo y conectivo, así como la división de cabeza, cuerpo y cola de los epidídimos del grupo control y de cada grupo experimental, fueron realizadas de acuerdo con el procedimiento descrito por Hernández-Rodríguez *et al.* (2021). Cada región del epidídimo derecho se colocó en un tubo Eppendorf conteniendo 500 µL de solución Ringer a 36 °C; la extracción de los espermatozoides se realizó mediante la técnica de picado con tijeras de punta fina, haciendo múltiples cortes. Cada picado de las regiones del epidídimo con solución de Ringer, se agitó ligeramente y se dejó reposar 5 minutos para el desprendimiento de los espermatozoides. La suspensión se filtró a través de una malla de lycra estéril de 20 µm, se realizaron enjuagues del picado con 500 µL de solución Ringer, para filtrar el remanente de material biológico y separar el fluido con espermatozoides del tejido epididimario. Los espermatozoides obtenidos se lavaron mediante centrifugación a 500 G durante 5 minutos, por cada lavado se eliminó el sobrenadante y el botón de espermatozoides se resuspendió en 1000 µL de solución Ringer a 36 °C. La suspensión final del lavado de los espermatozoides de cada región del epidídimo fue considerada para realizar la determinación espermática, los valores reportados fueron expresados con respecto al total de los espermatozoides presentes en 1 mL de solución Ringer.

### **Determinación de la calidad espermática**

Todas las muestras obtenidas de cada una de las tres regiones del epidídimo del grupo control y de cada grupo experimental se montaron en sus respectivas laminillas y se evaluaron en un microscopio óptico Olympus BX 51 (Tokio, Japón);

Se determinó la concentración, vitalidad y morfología, de acuerdo con los criterios que establece el manual de la OMS (2010) como se describe a continuación:

### **Concentración espermática**

Se realizó una dilución 1:50 v/v en tubos Eppendorf de los espermatozoides obtenidos y lavados con agua destilada (se colocaron 980  $\mu$ L de agua destilada y 20  $\mu$ L de la muestra de espermatozoides). Para el conteo se utilizó una cámara de Neubauer donde se colocó en cada lado una alícuota de 10  $\mu$ L de la dilución de espermatozoides-agua (dilución 1:50), se dejó reposar 1 minuto. El conteo se realizó por ambos lados de la cámara mediante un microscopio óptico Olympus BX 51 (Tokio, Japón).

Primero se contabilizó el número de espermatozoides presentes en el primer cuadro superior izquierdo de la cámara. De acuerdo con el número de espermatozoides contados en el primer cuadro superior fueron los cuadros a contar de la cámara de Neubauer (tabla 1).

**Tabla 1. Relación de espermatozoides contados en el primer cuadro de la cámara con respecto al número de cuadros a contar**

<b>Número de espermatozoides contabilizados en el cuadro superior izquierdo</b>	<b>Número de cuadros evaluados del cuadro central de la cámara</b>
< 10 espermatozoides	25 cuadros
10-40 espermatozoides	10cuadros
> 40 espermatozoides	5 cuadros

Se contabilizaron 5 cuadros de cada lado de la cámara. La concentración de espermatozoides se expresa en millones/ML, para lo cual se obtuvo la media del conteo de ambos lados de la cámara y se dividió entre el factor de conversión correspondiente (tabla 2).

**Tabla 2. Factores de conversión para obtener el número de espermatozoides**

Dilución utilizada (semen + diluyente)	Número de cuadros contados		
	25 cuadros	10 cuadros	5 cuadros
1:50	2	0.8	0.4

### ***Vitalidad espermática***

Se colocaron 5  $\mu$ L de solución de eosina-nigrosina en un portaobjetos (previamente rotulado) y 5  $\mu$ L de la muestra de espermatozoides, se mezclaron y después se realizó un frotis a lo largo del portaobjetos, se dejó secar a una temperatura de 36.5 °C sobre una termoplatina. Se observó el frotis en un microscopio óptico Olympus BX 51 (Tokio, Japón), a 40X y se contabilizaron 100 espermatozoides. Los espermatozoides vivos no presentan tinción y los espermatozoides muertos se tiñeron de color rosado. El número de espermatozoides vivos se representó en porcentaje de vitalidad.

### ***Morfología espermática***

Se tomó una alícuota de 10  $\mu$ L de la muestra de espermatozoides, se colocó en un portaobjetos (previamente rotulado) y se realizó un frotis a lo largo del portaobjetos. Se dejó secar durante 5 minutos a temperatura ambiente, se continuó con la tinción de las muestras mediante el kit Spermform. Primero se colocaron en medio fijador durante 3 minutos, después se colocaron en el colorante A durante 2 minutos, colorante B durante 4 minutos, se enjuagó con agua destilada y se dejó secar.

La determinación de las categorías de morfología espermática se realizó siguiendo los criterios de la OMS (2010). Se observó en un microscopio óptico Olympus BX 51 (Tokio, Japón) a 40X donde se consideró la muestra como teratozoospermica si presentaba más de un 85% de espermatozoides anormales.

Los espermatozoides de la rata deben presentar una cabeza en forma de gancho, en caso de presentar forma acintada, piriforme, vacuolada, cabezas dobles o combinaciones entre éstos, se considera anormalidad.

La pieza intermedia debe ser delgada, representar menos de la tercera parte del ancho de la cabeza y debe estar alineada con el eje longitudinal de la cabeza.

El flagelo no debe presentar gotas citoplasmáticas, no debe presentar dobladuras, roturas, ni horquillas o enrollamientos.

### **Cuantificación de T en suero**

A los individuos se les practicó eutanasia por decapitación y se recuperó la sangre del cuerpo en tubos (BD Vacountainer SST, México. CDMX.) con gel de separación; se centrifugó durante 15 minutos a 3000 rpm y se recuperó el suero para determinar la concentración de T mediante la técnica de ELISA (DRG® Free Testosterone EIA-1559, Estados Unidos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El kit DRG Free Testosterone ELISA consta de un ensayo ligado a enzimas en fase sólida (ELISA). Cada pocillo de microtitulación está recubierto con un anticuerpo dirigido hacia un sitio antigénico en la molécula de la T, de tal manera que la T endógena de las muestras compite con un conjugado de T peroxidasa de rábano (T-HRP) para unirse al anticuerpo recubierto. Posteriormente a la incubación, el conjugado no unido se eliminó mediante lavado. La cantidad de conjugado de peroxidasa unida es inversamente proporcional a la concentración de T libre de la muestra. Las muestras se trabajaron por duplicado y se tomó lectura con un espectrofotómetro a una densidad óptica a 450 nm. Posterior a la adición de la solución de sustrato, la intensidad de color que se obtiene es inversamente proporcional a la concentración de T de la muestra, esto se cuantificó mediante una curva estándar.

### **8. Análisis estadístico**

Para todos los parámetros analizados y reportados se obtuvieron la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM), posteriormente se analizaron los datos mediante ANOVA de una sola vía para cada parámetro seguida de prueba *post hoc* de Tukey. Se consideró un valor de significancia de  $p < 0.05$ .

## 9. RESULTADOS

### Peso y talla corporal

En la tabla 3 se muestran los pesos corporales y tallas del grupo control y de cada grupo experimental. Al inicio del tratamiento los animales del grupo control y de cada grupo experimental en la primera semana de vida mostraron un peso de  $8.5 \pm 0.22$  g. Sin embargo, cuando se inició el tratamiento para el grupo Cd (día 35 de vida), conforme transcurrió el tiempo de la administración de 2 mg/kg de  $\text{CdCl}_2$ , los animales presentaron una disminución significativa ( $p < 0.05$ ), en comparación con los grupos control, Zn y el de Zn+Cd. Durante las siguientes semanas de tratamiento con Cd, en el día 90 de vida, los pesos corporales de los animales de igual manera presentaron una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con los grupos control, Zn y Zn+Cd. Los grupos de Zn y Zn+Cd en cuanto al peso corporal, no mostraron diferencias significativas. Así mismo en cuanto a la talla, los animales del grupo Cd presentaron una disminución significativa en comparación con el grupo control. Los grupos Zn y Zn+Cd no presentaron diferencias significativas en la talla.

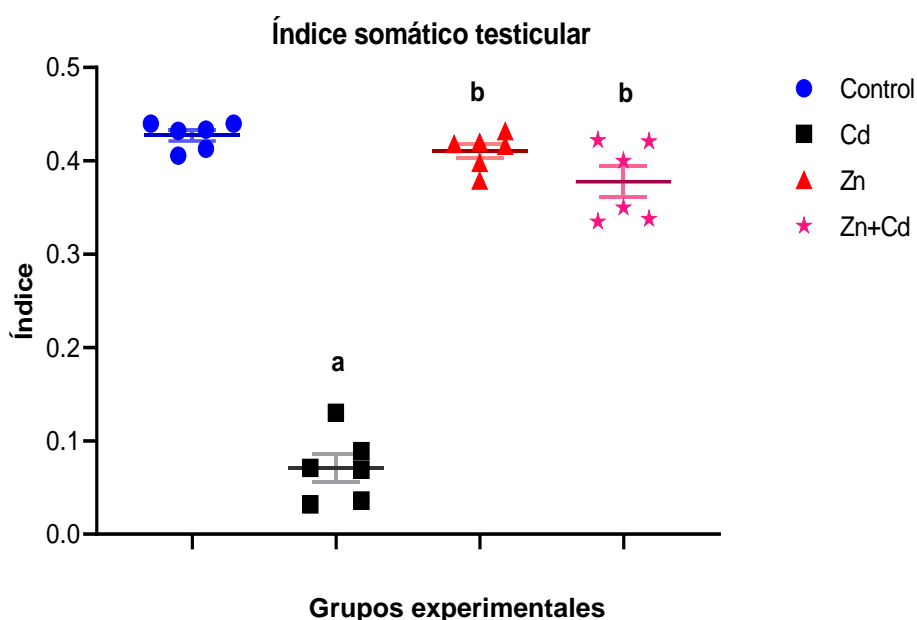
**Tabla 3. Pesos corporales de los grupos estudiados**

Edad (días)	Pesos corporales (g)			
	Control	Cd	Zn	Zn+Cd
7	$8.5 \pm 0.22$	$8.5 \pm 0.22$	$8.5 \pm 0.22$	$8.7 \pm 0.21$
21	$47 \pm 0.71$	$48 \pm 0.22$	$49 \pm 0.54$	$49 \pm 0.42$
35	$138 \pm 2.7$	$137 \pm 2.4$	$151 \pm 2.8^{ab}$	$149 \pm 2.0^{ab}$
56	$283 \pm 4.5$	$251 \pm 1.6^a$	$282 \pm 4.5^b$	$283 \pm 4.0^b$
90	$466 \pm 10$	$426 \pm 5.0^a$	$447 \pm 13$	$452 \pm 5.5$
		Talla (cm)		
90	$47 \pm 0.57$	$45 \pm 0.31^a$	$46 \pm 0.40$	$46 \pm 0.21$

Los datos representan las medias  $\pm$  EEM de  $n=6$  por grupo. <sup>a</sup> $p < 0.05$  control vs grupos Cd, Zn y Zn+Cd; <sup>b</sup> $p < 0.001$  Cd vs grupos Zn y Zn+Cd. ANOVA seguida de Tukey.

## Índice somático testicular

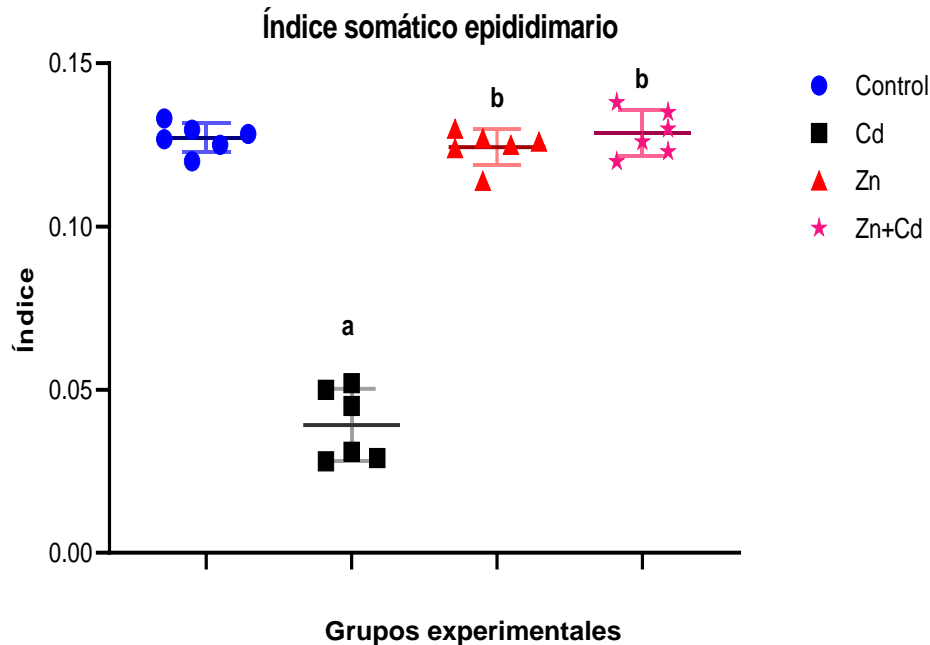
En la figura 8 se muestra el índice somático testicular de los animales del grupo control y de cada grupo experimental. Se observó una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) en el índice somático del testículo de ratas expuestas a Cd en comparación con los grupos control, Zn y Zn+Cd. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el índice somático testicular de los grupos de Zn y Zn+Cd en comparación con el grupo control.



**Figura 8.** Índice somático testicular. Los datos representan las medias  $\pm$  EEM de  $n=6$  por grupo. <sup>a</sup> $p < 0.05$  control vs grupos Cd, Zn y Zn+Cd; <sup>b</sup> $p < 0.001$  Cd vs grupos Zn y Zn+Cd. ANOVA seguida de Tukey.

## Índice somático epididimario

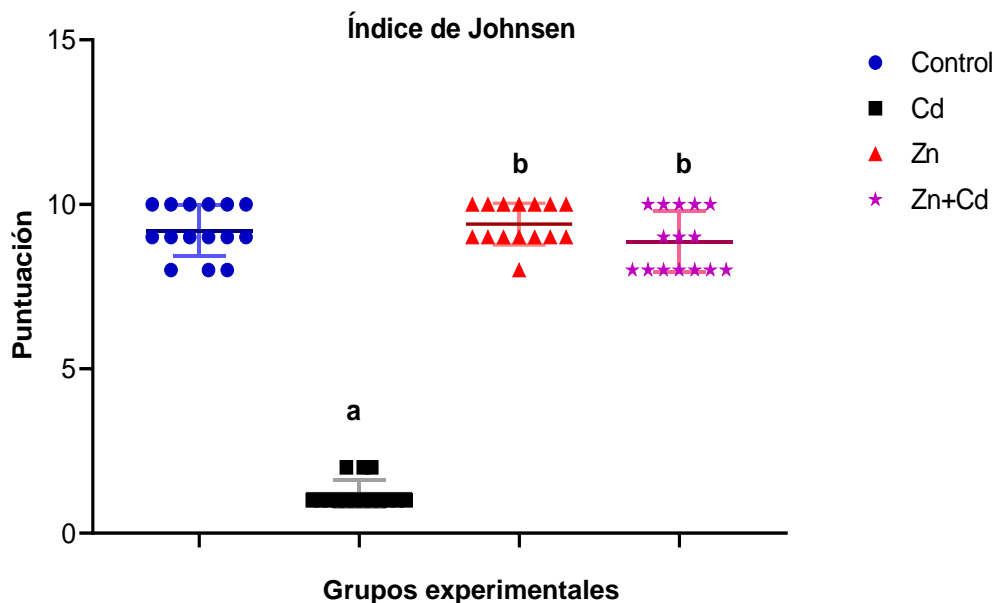
En la figura 9 se muestra el índice somático epididimario de los animales del grupo control y de cada grupo experimental. Se observó una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) en el índice somático del epidídimo de ratas expuestas a Cd en comparación con los grupos control, Zn y Zn+Cd. No se observaron diferencias significativas en el índice somático epididimario de los grupos de Zn y Zn+Cd en comparación con el grupo control.



**Figura 9.** Índice somático epididimario. Los datos representan las medias  $\pm$  EEM de  $n=6$  por grupo. <sup>a</sup> $p < 0.01$  control vs grupos Cd, Zn y Zn+Cd; <sup>b</sup> $p < 0.001$  Cd vs grupos Zn y Zn+Cd. ANOVA seguida de Tukey.

### Índice de maduración del epitelio seminífero (Índice de Johnsen)

En la figura 10 se muestra el índice de Johnsen el cual indica el grado de maduración del epitelio seminífero (Anexo I) del grupo control y de cada grupo experimental. En el grupo Cd se presentó una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) en comparación con los grupos control, Zn y Zn+Cd en la maduración del epitelio seminífero, considerando que en el grupo de Cd no se presentó espermatogénesis y escasas células somáticas, obteniendo así la puntuación más baja del índice de maduración. En los grupos Zn y Zn+Cd no presentaron diferencias significativas en comparación con el grupo control, considerando que los tres grupos presentaron túbulos seminíferos con una maduración adecuada, donde se observa una espermatogénesis completa con los distintos tipos de células germinales y células somáticas que comprende un epitelio seminífero maduro.

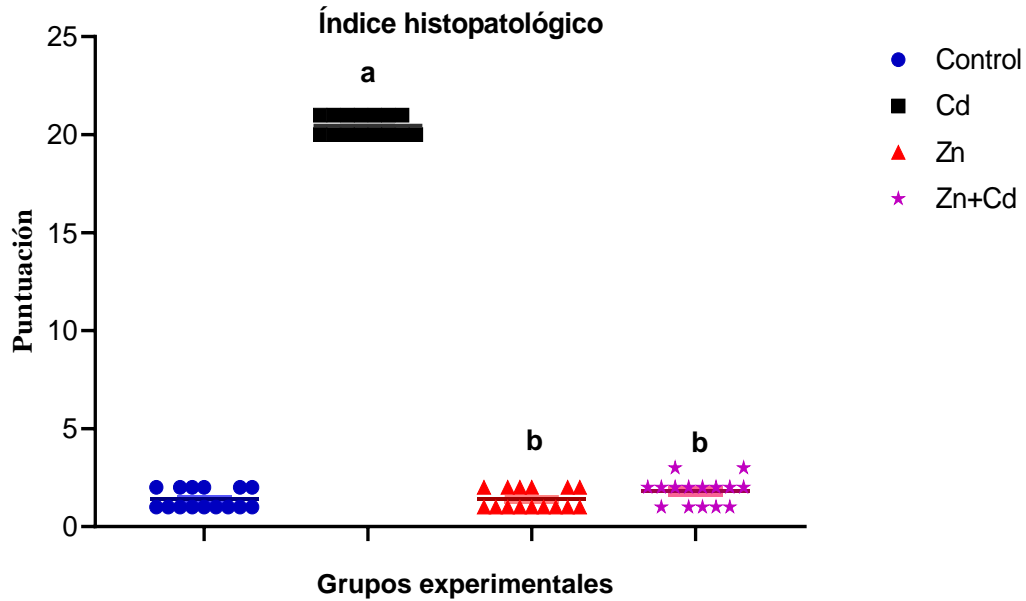


**Figura 10.** Índice de maduración del epitelio seminífero (Índice de Johnsen). Los datos representan las medias  $\pm$  EEM de  $n=6$  por grupo. <sup>a</sup> $p < 0.01$  control vs grupos Cd, Zn y Zn+Cd; <sup>b</sup> $p < 0.001$  Cd vs grupos Zn y Zn+Cd. ANOVA seguida de Tukey.

### Índice histopatológico testicular

En la figura 11 se muestra el índice histopatológico, el cual nos indica el grado de daños en el túbulo seminífero (Anexo II) del grupo control y de cada grupo experimental. El grupo tratado con Cd presentó un aumento significativo ( $p < 0.001$ ) en comparación con los demás grupos, considerando que el grupo de Cd obtuvo el puntaje más alto en daños histológicos. Los grupos control, Zn y Zn+Cd, no presentaron diferencias significativas, debido a que no presentaron ningún daño testicular, al mostrar un epitelio seminífero maduro y sano.





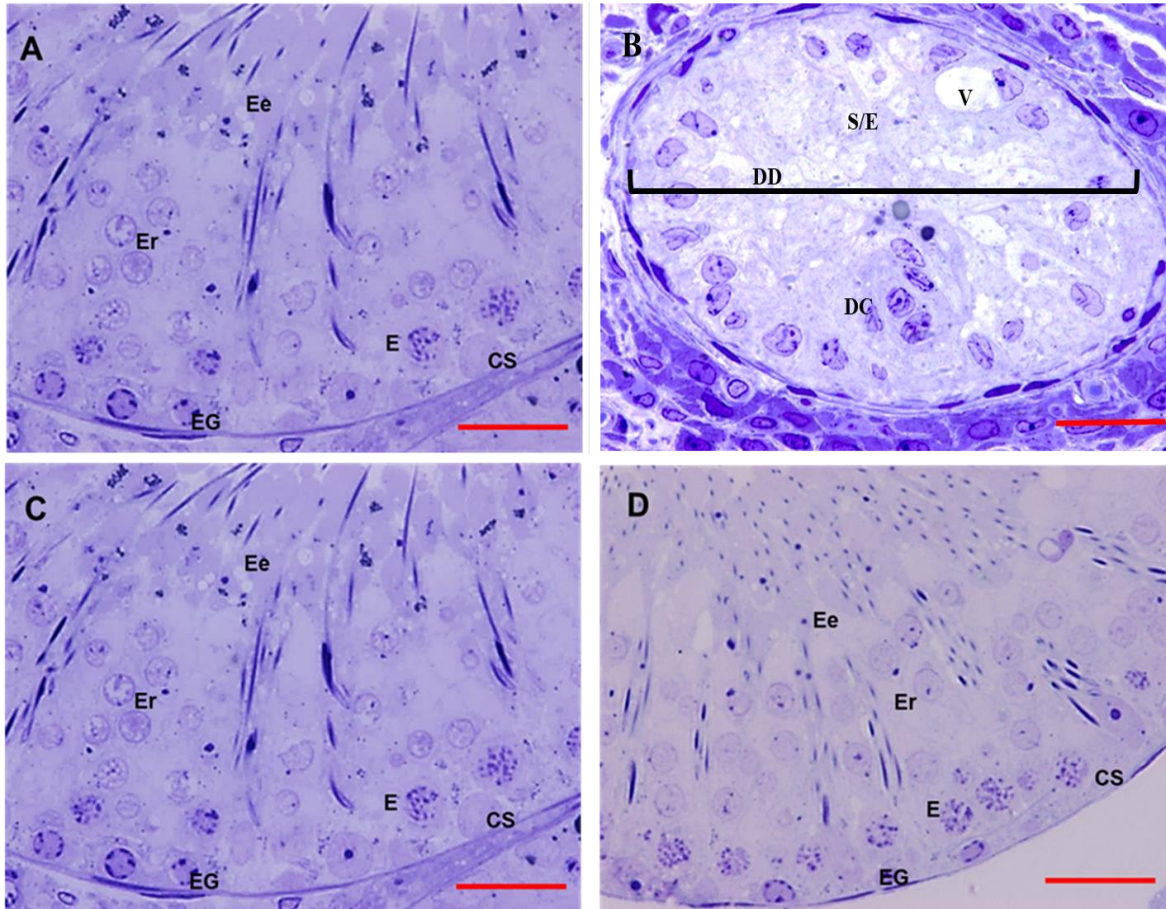
**Figura 11.** Índice histopatológico. Los datos representan las medias  $\pm$  EEM de  $n=6$  por grupo. <sup>a</sup> $p < 0.01$  control vs grupos Cd, Zn y Zn+Cd; <sup>b</sup> $p < 0.001$  Cd vs grupos Zn y Zn+Cd. ANOVA seguida de Tukey.

### Análisis histológico del testículo

En la figura 12 se muestra el análisis histológico del epitelio seminífero del grupo control y de cada grupo experimental. En las secciones histológicas de la estructura del epitelio seminífero del grupo control (figura 12A) observamos un epitelio caracterizado por la presencia de diferentes tipos de células germinales en desarrollo, donde se identificaron espermatogonias (EG), espermatocitos (E), espermátidas redondas (Er), espermátidas elongadas (Ee), así como células de Sertoli (CS), lo que comprende una espermatogénesis completa y un epitelio seminífero sano.

En las secciones histológicas del grupo Cd (figura 12B), se presentaron daños severos que corresponden con una gran descamación de las células de Sertoli, vacuolización, un contorno irregular, disminución del diámetro del túbulo seminífero y ausencia de espermatogénesis en comparación con los grupos control, Zn y Zn+Cd. En el grupo Zn (figura 12C), los cortes histológicos del epitelio seminífero muestran un epitelio seminífero maduro, con la presencia de todos los tipos de células germinales en desarrollo que comprende una espermatogénesis

completa y epitelio seminífero sano. Para el caso del grupo Zn+Cd (figura 12D), observamos que el Zn protegió al epitelio seminífero del Cd, al mostrar un túbulo seminífero maduro y sano con espermatogénesis completa y abundantes células germinales en desarrollo en comparación con el grupo Cd.



**Figura 12.** Cortes histológicos de testículos de rata. A) grupo control; B) grupo Cd; C) grupo Zn; D) grupo Zn+Cd. Espermatogonias (EG), espermatocitos (E), espermatidas redondas (Er), espermatidas elongadas (Ee), célula de Sertoli (CS), contorno irregular (CI), descamación celular (DC), vacuolización (V), disminución del diámetro del túbulo seminífero (DD), ausencia de espermatozoides (S/E). Azul de toluidina, 60x. Escala 30  $\mu$ m.

## Diámetro y área de túbulos seminíferos

En la tabla 4 se muestra el diámetro y el área de los túbulos seminíferos que infiere la población celular del grupo control y de cada grupo experimental. El grupo Cd presentó una reducción significativa ( $p < 0.001$ ) tanto en diámetro como en el área con respecto al grupo control y los grupos experimentales. No se presentaron diferencias significativas entre los grupos control, Zn y Zn+Cd, es decir no presentaron alteraciones en el diámetro y área de los túbulos seminíferos.

Tabla 4. Diámetro y área de túbulos seminíferos

	Control	Cd	Zn	Zn+Cd
Diámetro de túbulos seminíferos ( $\mu\text{m}$ )	341 $\pm$ 5.9	179 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>	356 $\pm$ 5.0 <sup>b</sup>	342 $\pm$ 4.4 <sup>b</sup>
Área de túbulos seminíferos ( $\mu\text{m}^2$ )	71810 $\pm$ 2045	13909 $\pm$ 656 <sup>a</sup>	74494 $\pm$ 1929 <sup>b</sup>	70108 $\pm$ 1926 <sup>b</sup>

Los datos representan las medias  $\pm$  EEM de  $n=6$  por grupo. <sup>a</sup> $p < 0.01$  control vs grupos Cd, Zn y Zn+Cd; <sup>b</sup> $p < 0.001$  Cd vs grupos Zn y Zn+Cd. ANOVA seguida de Tukey.

## Análisis histológico del epidídimo

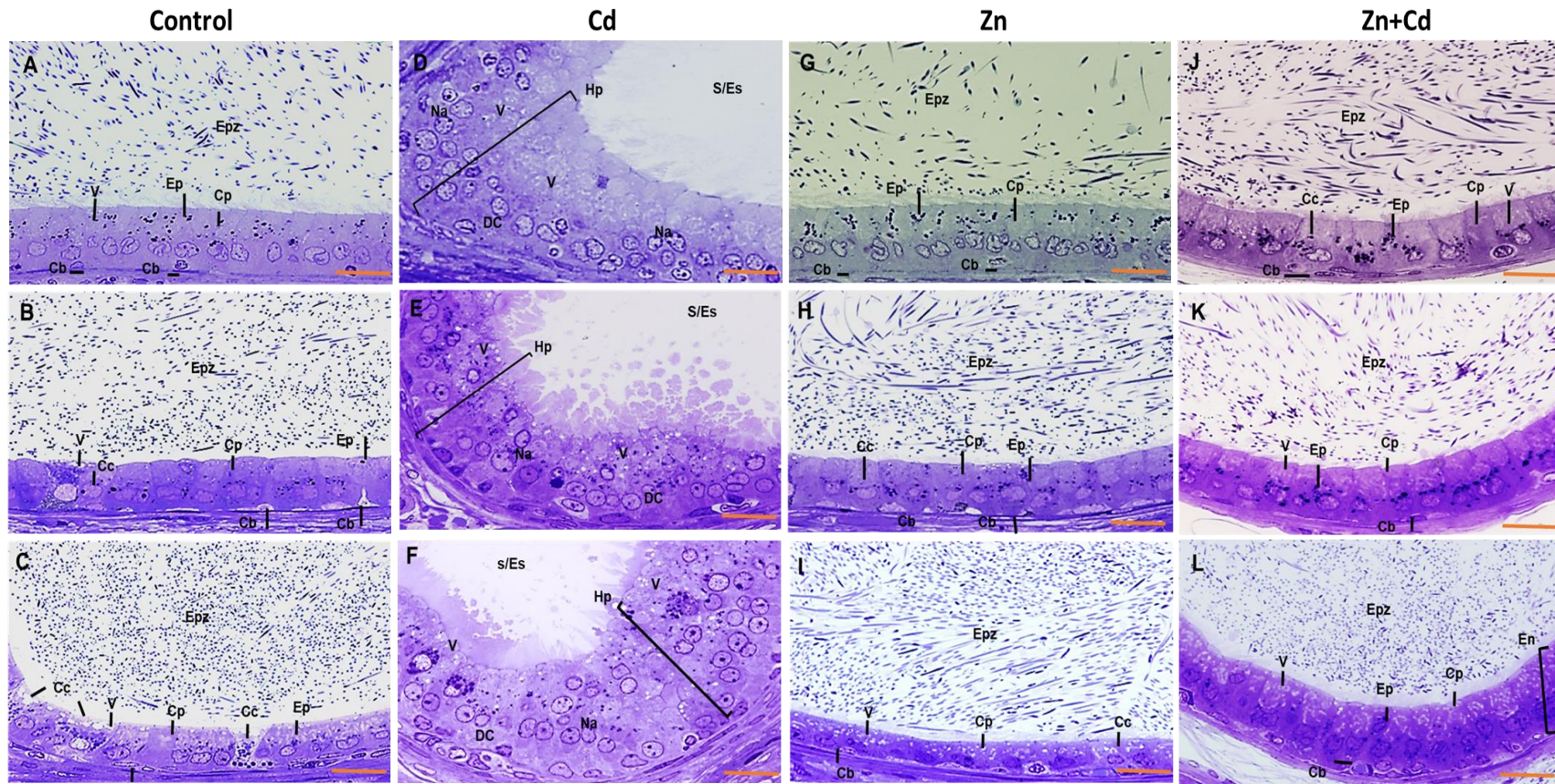
En la figura 13 se muestra el análisis histológico de cada una de las regiones del epitelio epididimario del grupo control y de los grupos experimentales.

En las secciones histológicas de la estructura del túbulo epididimario de las diferentes regiones cabeza, cuerpo y cola del grupo control observamos un epitelio pseudoestratificado caracterizado por la presencia de los diferentes tipos celulares, donde se identificaron células basales (Cb), células claras (Cc), las células principales (Cp) con microvellosidades y gran cantidad de epididimosomas. Se observó un epitelio sin alteraciones, donde se encontraron los tipos celulares mencionados, además de vacuolización, que es una característica que predomina

en las Cp del epidídimo. Así mismo, se observó una densa cantidad de espermatozoides en la luz del tubo epididimario en sus tres regiones.

En el grupo Cd, observamos como el Cd provocó alteraciones en el epitelio en las tres regiones epididimarias, donde se presentó una enorme desorganización celular, núcleos aberrantes, un aumento en la vacuolización y un epitelio muy engrosado provocando hiperplasia y atrofia del tubo epididimario lo que reduce el contorno y el lumen del epidídimo, además se observó la ausencia de espermatozoides en el lumen de las tres regiones epididimarias con respecto a los grupos control, Zn y Zn+Cd. En el grupo con tratamiento de Zn, se encontró un epitelio sano, no se presentaron alteraciones en las tres regiones epididimarias. Se observó un epitelio pseudoestratificado con los tipos celulares característicos, epididimosomas, vacuolización en células Cp, además de la gran densidad de espermatozoides en el lumen epididimario. En el grupo de Zn+Cd, se pudo observar que el Zn protegió el epitelio epididimario, donde en la región de la cabeza y cuerpo del epidídimo se presentó un epitelio pseudoestratificado con los tipos celulares sin alteraciones, ligera vacuolización y gran densidad de espermatozoides en el lumen epididimario. Sin embargo, para la región de la cola del epidídimo, se presentó un ligero aumento en el grosor del epitelio en comparación con el grupo control, así mismo un ligero aumento en la vacuolización. La densa presencia de espermatozoides en la región de la cola no se vio afectada en comparación con el grupo Cd.





**Figura 13.** Análisis histológico del epidídimo. Control; (A) cabeza, (B) cuerpo, (C) cola. Cd; (D) cabeza, (E) cuerpo, (F) cola. Zn; (G) cabeza, (H) cuerpo, (I) cola. Zn+Cd; (J) cabeza, (K) cuerpo, (L) cola. Célula principal (Cp); célula basal (Cb); célula clara (Cc); espermatozoides (Epz), sin espermatozoides (S/Es), epididimosomas (Ep); hiperplasia (Hp), engrosamiento del epitelio (En), núcleos aberrantes (Na), vacuolización (V). Azul de toluidina, 60x. Escala 20  $\mu$ m.

## Medición de células principales del epidídimo

En la tabla 5 se presentan los datos de altura y área de las células principales de las tres regiones epididimarias del grupo control y de cada grupo experimental. En el grupo control la altura y el área de las células principales fueron disminuyendo desde la cabeza a la cola del epidídimo, esto es característico del epitelio conforme a la región. Sin embargo, para el grupo de Cd, se presentó un aumento significativo ( $p < 0.001$ ), donde la altura y área de las células principales aumentaron en las tres regiones epididimarias al compararlos con el grupo control. En el grupo tratado con Zn presentó una altura y área similar al grupo control, donde la altura y área fueron disminuyendo desde la cabeza a la cola del epidídimo. Para el caso del grupo Zn+Cd la altura y área de las células principales fueron disminuyendo de la cabeza al cuerpo del epidídimo, sin embargo, en la región de la cola, se presentó un ligero aumento significativo ( $p < 0.01$ ) en la altura y área en comparación con los grupos control y Zn, pero este ligero aumento fue menor en comparación con el grupo Cd.

**Tabla 5. Altura y área de células principales del epidídimo**

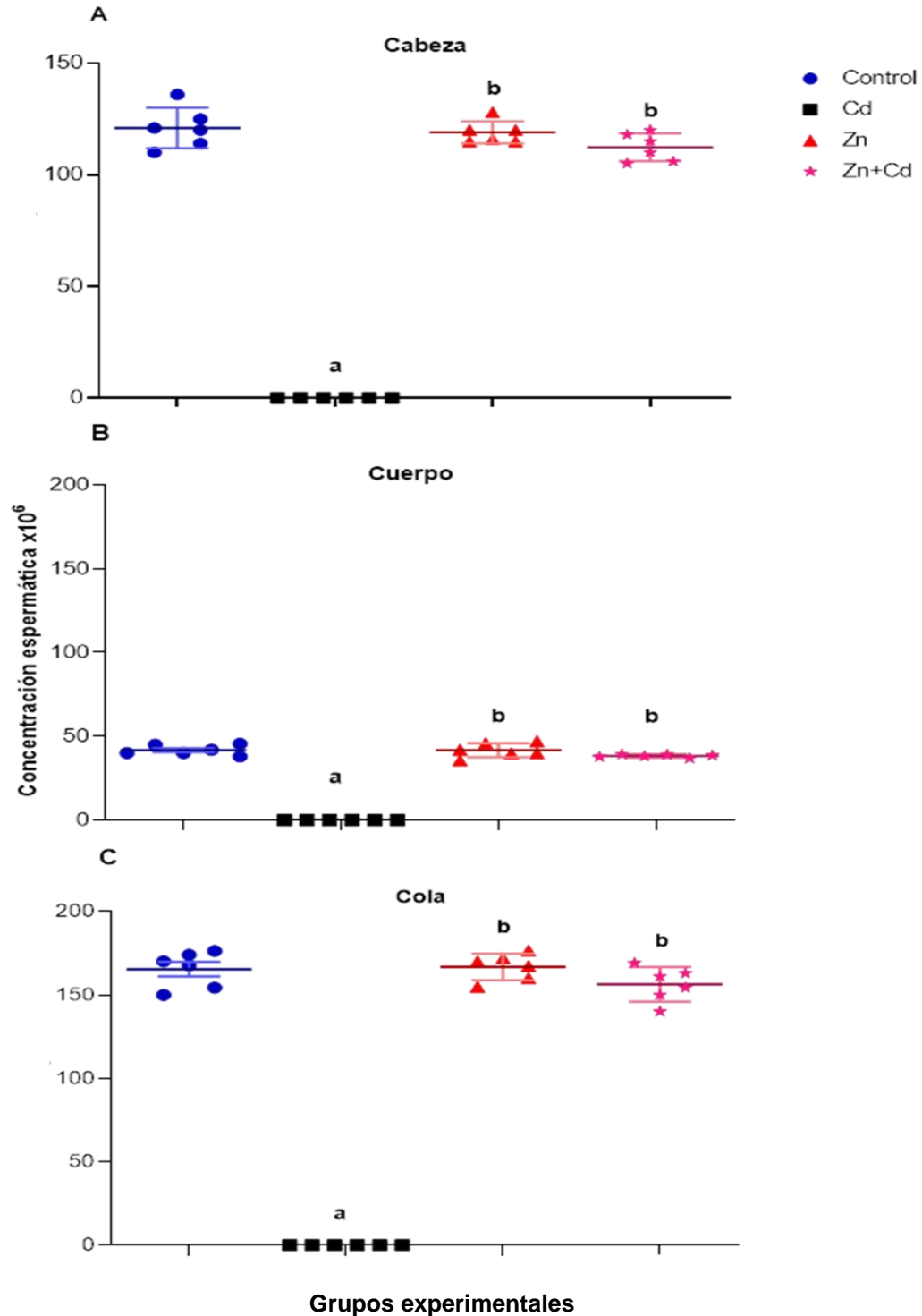
	Control	Cd	Zn	Zn+Cd
<b>Altura (<math>\mu\text{m}</math>)</b>				
Cabeza	31 $\pm$ 0.80	36 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	32 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>	30 $\pm$ 0.87 <sup>b</sup>
Cuerpo	28 $\pm$ 0.59	32 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	27 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	27 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>
Cola	15 $\pm$ 0.51	34 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>	14 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>	28 $\pm$ 0.28 <sup>abc</sup>
<b>Área (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>				
Cabeza	343 $\pm$ 8.6	438 $\pm$ 17 <sup>a</sup>	328 $\pm$ 11 <sup>b</sup>	316 $\pm$ 11 <sup>b</sup>
Cuerpo	304 $\pm$ 6.2	402 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	313 $\pm$ 4.6 <sup>b</sup>	300 $\pm$ 8.0 <sup>b</sup>
Cola	118 $\pm$ 3.1	220 $\pm$ 6.8 <sup>a</sup>	129 $\pm$ 6.1 <sup>bc</sup>	182 $\pm$ 7.3 <sup>abc</sup>

Los datos representan las medias  $\pm$  EEM de  $n=6$  por grupo. <sup>a</sup> $p < 0.01$  control vs grupos Cd, Zn y Zn+Cd; <sup>b</sup> $p < 0.001$  Cd vs grupos Zn y Zn+Cd; <sup>c</sup> $p < 0.01$  Zn vs Zn+Cd ANOVA seguida de Tukey.

## **Determinación espermática**

### ***Concentración espermática***

En la figura 14 se muestra la concentración espermática que se llevó a cabo mediante el conteo de muestras de los espermatozoides obtenidos de cada una de las regiones del epidídimo del grupo control y cada grupo experimental. Se observó una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) en el grupo Cd debido a la ausencia total de espermatozoides en las tres regiones del epidídimo en comparación con las regiones del epidídimo de los grupos control, Zn y Zn+Cd. Para los grupos Zn y Zn+Cd, la concentración espermática en las tres regiones del epidídimo no presentó diferencias significativas en comparación con el grupo control. Se observó que en el grupo de Zn+Cd la concentración espermática aumentó significativamente ( $p < 0.001$ ) en las tres regiones epididimarias con respecto al grupo Cd.

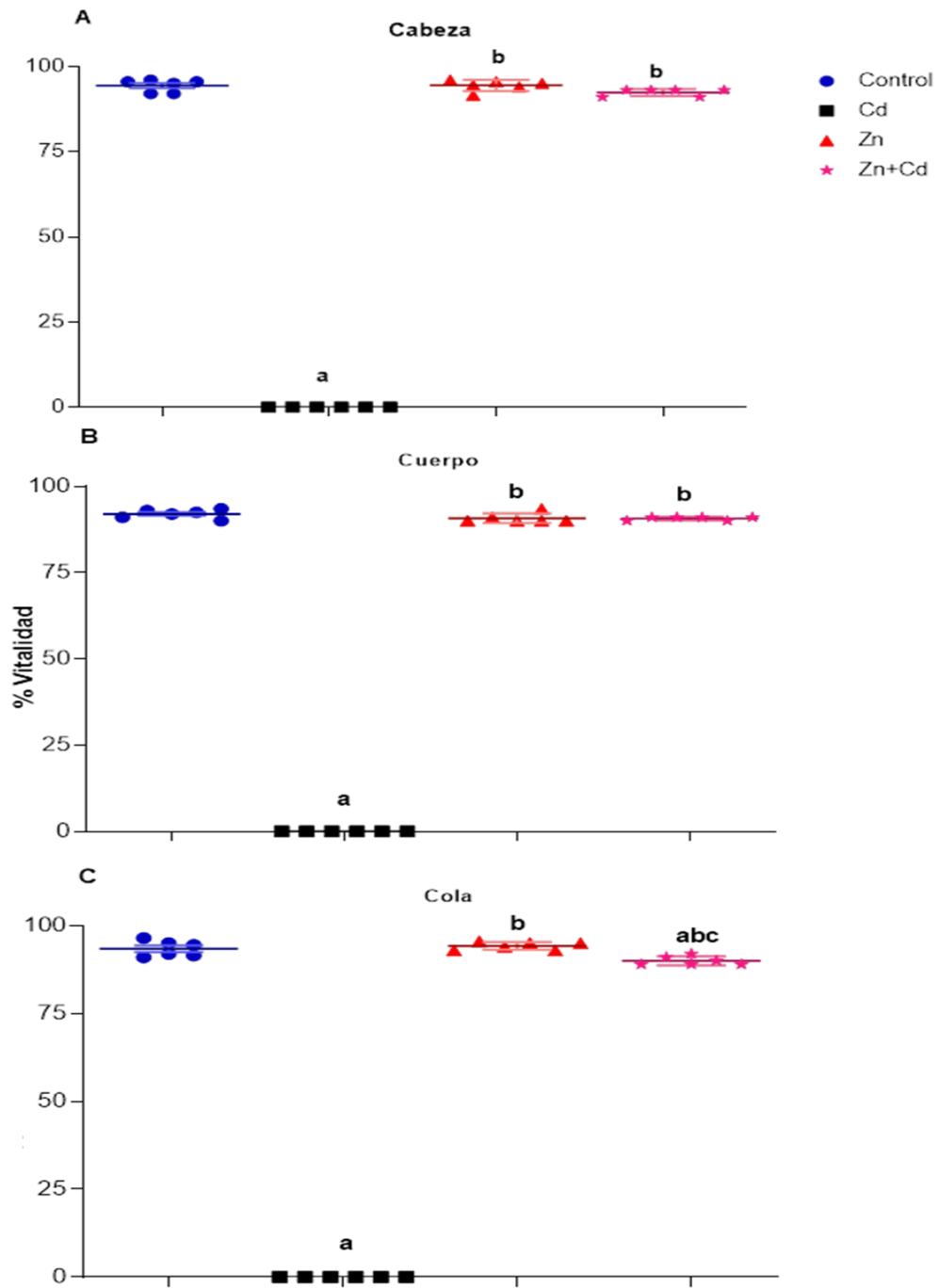


**Figura 14.** Concentración espermática de las tres regiones (A) cabeza, B) cuerpo y C) cola) del epidídimo de rata de los grupos experimentales. Los datos representan las medias  $\pm$  EEM de  $n=6$  por grupo. <sup>a</sup> $p < 0.01$  control vs grupos Cd, Zn y Zn+Cd; <sup>b</sup> $p < 0.001$  Cd vs grupos Zn y Zn+Cd. ANOVA seguida de Tukey.



### ***Vitalidad espermática***

En la figura 15 se muestra la vitalidad espermática del grupo control y de cada grupo experimental. En la evaluación del porcentaje de vitalidad espermática observamos que el grupo Cd presentó una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) al no presentar espermatozoides en ninguna de las tres regiones del epidídimo en comparación con los grupos control, Zn y Zn+Cd. Se observó en el grupo de Zn un porcentaje de vitalidad en las tres regiones epididimarias similares al del grupo control, mientras en el grupo de Zn+Cd se pudo observar que el Zn aumenta significativamente ( $p < 0.001$ ) la vitalidad con respecto al grupo tratado únicamente con Cd, además mantuvo este parámetro similar a los del grupo control y grupo Zn en las regiones de la cabeza y cuerpo del epidídimo, sin embargo, en la región de la cola presentó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el grupo control y grupo Zn.

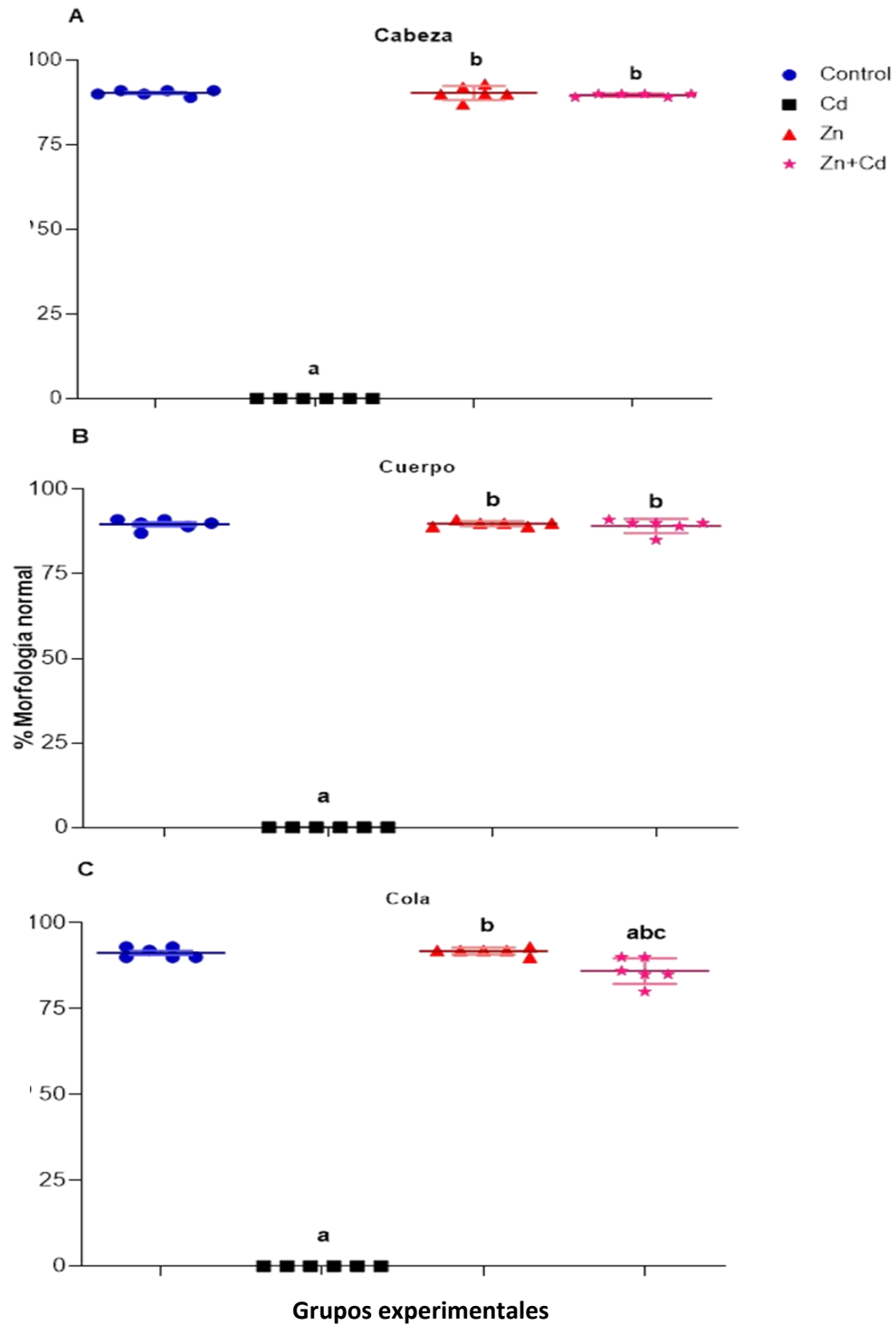


**Grupos experimentales**

**Figura 15.** Vitalidad espermática de las tres regiones (A) cabeza, B) cuerpo y C) cola) del epidídimo de rata de los grupos experimentales. Los datos representan las medias  $\pm$  EEM de  $n=6$  por grupo. <sup>a</sup> $p < 0.01$  control vs grupos Cd, Zn y Zn+Cd; <sup>b</sup> $p < 0.001$  Cd vs grupos Zn y Zn+Cd; <sup>c</sup> $p < 0.01$  Zn vs Zn+Cd. ANOVA seguida de Tukey.

### ***Morfología espermática***

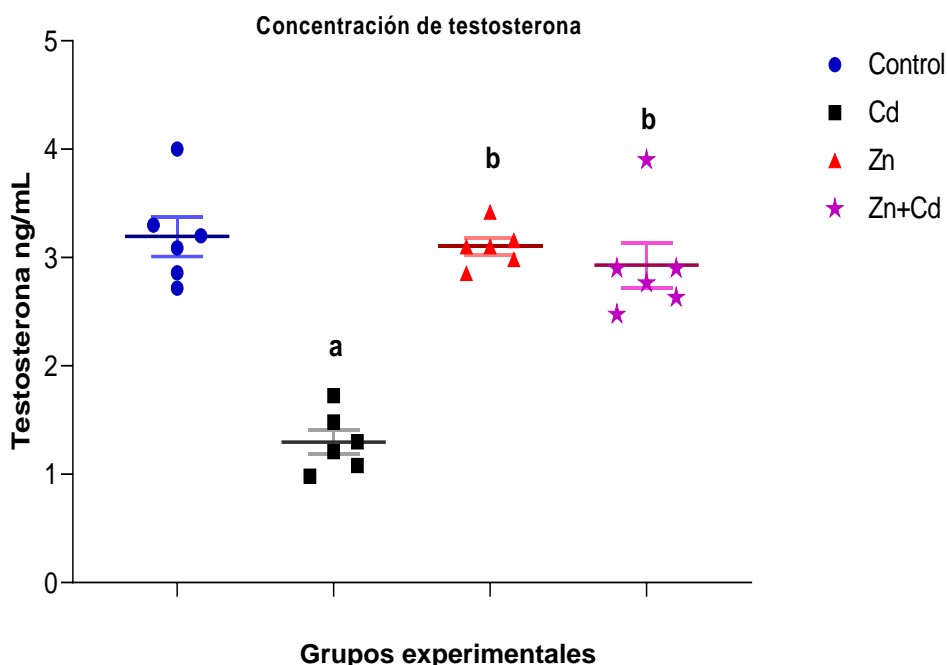
En la figura 16 se muestra la morfología espermática del grupo control y de cada grupo experimental. El grupo Cd, al no presentar espermatozoides en ninguna región del epidídimo se evaluó como disminución significativa ( $p < 0.001$ ) en comparación con el grupo control y los demás grupos experimentales. En cuanto al grupo Zn no se presentaron diferencias significativas en comparación con el grupo control en las tres regiones epididimarias. Sin embargo, el grupo, Zn+Cd, presentó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en anomalías morfológicas en comparación con los grupos control y Zn, estas alteraciones sólo se observaron en la región de la cola del epidídimo, de las cuales las más frecuentes fueron flagelos contorneados.



**Figura 16.** Morfología espermática de las tres regiones (A) cabeza, B) cuerpo y C) cola) del epidídimo de rata de los grupos experimentales. Los datos representan las medias  $\pm$  EEM de  $n=6$  por grupo. <sup>a</sup> $p < 0.01$  control vs grupos Cd, Zn y Zn+Cd; <sup>b</sup> $p < 0.001$  Cd vs grupos Zn y Zn+Cd; <sup>c</sup> $p < 0.01$  Zn vs Zn+Cd. ANOVA seguida de Tukey.

## Concentración de testosterona en suero

En la figura 17 se muestran las concentraciones séricas de T a los 90 días de vida del grupo control y de los grupos experimentales. Los resultados mostraron una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) en la concentración de T en el grupo tratado con Cd comparándolo con el grupo control. En cuanto al grupo de Zn, no se presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control, mientras para el grupo de Zn+Cd se observó que el Zn mantuvo las concentraciones de T similares a las de los grupos control y Zn, y presentó un aumento significativo con respecto al grupo de Cd ( $p < 0.001$ ).



**Figura 17.** Concentración de T. Los datos representan las medias  $\pm$  EEM de  $n=6$  por grupo. <sup>a</sup> $p < 0.01$  control vs grupos Cd, Zn y Zn+Cd; <sup>b</sup> $p < 0.001$  Cd vs grupos Zn y Zn+Cd. ANOVA seguida de Tukey.

## 10. DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó con el fin de investigar las funciones protectoras del Zn contra la toxicidad que causa el cadmio en el testículo y en el epidídimo. La administración de Cd (2 mg/kg p.c.) a partir del día de vida 35 al 56 generó alteraciones en los pesos corporales, testiculares y epididimarios; en el testículo alteró la estructura, provocando disminución del diámetro de los túbulos seminíferos y desprendimiento de células de Sertoli, a tal grado que la espermatogénesis no prosiguió. En todo el epidídimo provocó desorganización del epitelio, hiperplasia cribiforme y de igual manera ausencia de espermatozoides en el lumen, además redujo la síntesis de T. En los animales tratados previamente con Zn (4 mg/kg p.c) desde el día de vida 7 y posteriormente administrados con Cd (2 mg/kg) a partir del día de vida 35, se observaron los efectos de protección al no presentar reducción de los pesos tanto corporal como testicular y epididimario, se presentó el epitelio seminífero sano y con espermatogénesis completa. En el epitelio epididimario no se presentó alteraciones histológicas, a excepción en la región de la cola donde hubo un incremento de la altura del epitelio y los espermatozoides alojados en esta región tuvieron una disminución significativa en la vitalidad y morfología. Además, las concentraciones de T no se vieron afectadas.

El Cd puede interactuar con diversas proteínas y enzimas debido a la similitud con otros metales (Thévenod *et al.*, 2020), siendo su principal mecanismo de daño su mimetismo iónico y molecular para poder ocupar los sitios de unión en diferentes moléculas (Bridge & Zalupus 2005; Thévenod *et al.*, 2019). Por tal razón, el Cd puede provocar daños en el organismo, incluyendo el sistema reproductivo masculino, como testículo y epidídimo.

El presente estudio, demuestra que la exposición a 2 mg/kg de CdCl<sub>2</sub> vía i.p. a partir del día 35 de vida, reduce significativamente el peso y talla corporal de los individuos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Wang *et al.* (2020) quienes administraron 2 mg/kg de Cd durante cuatro semanas por vía i.p. y observaron una disminución significativa de los pesos corporales en la rata. Sin

embargo, nuestras administraciones se realizaron una vez por semana, posiblemente el Cd se acumuló en los órganos y tejidos lo que se relaciona con los daños que indujo este metal como lo reporta Lafuente *et al.*, (2013).

Un estudio realizado por Kawakami *et al.* (2010) explica que el Cd induce apoptosis de adipocitos, el tejido adiposo blanco es sensible a la exposición a Cd, lo que da como resultado una reducción significativa del peso del tejido adiposo blanco que va acompañado de una reducción de peso en tejidos y peso corporal.

Por otra parte, en el grupo Cd se presentó una disminución en la talla de los animales. Escasos estudios analizan la talla de los animales con exposición a Cd, sin embargo, nuestros resultados probablemente se deban a lo reportado por Rodríguez & Mandalunis, (2016) quienes mencionan que el hueso al ser una estructura dinámica en constante remodelación a lo largo de la vida, requiere de una estricta coordinación de la síntesis y mineralización de la matriz ósea por los osteoclastos y osteoblastos. Por lo tanto, cualquier factor que interfiera con la función de estas células, provocará alteraciones en su proceso. El Cd puede interferir con la remodelación del hueso durante el crecimiento, estimulando la osteoclastogénesis, inhibir la diferenciación de osteoblastos y provocar una disminución en el volumen óseo, lo que se relaciona con una disminución en la talla de los animales. Sin embargo, se necesitan más estudios por analizar los efectos del Cd y sus mecanismos sobre la reducción en la talla corporal.

Concerniente a nuestros resultados el grupo de Zn+Cd no presentó disminución en los pesos corporales, esto puede deberse a que el Zn es un potente regulador de la biogénesis como lo reportan Maxel *et al.* (2015) y Pandurangan *et al.* (2016). Ellos indican que un transportador de Zn (ZIP-14) se expresa específicamente en el tejido adiposo blanco donde juega un papel en su fisiología, desde la absorción de nutrientes y de la protección de la apoptosis de adipocitos ante la exposición a Cd. El Zn tiene una función importante en la modulación de la leptina, que es un regulador esencial del equilibrio energético y la ingesta de alimento mediante la señalización del sistema nervioso central, además estudios indican que el Zn produce ganancia de peso en personas con hemodiálisis (Abdollahi *et al.*, 2020).

Con respecto a la talla, en el grupo Zn+Cd no encontramos disminución. Se puede atribuir a que el Zn se encuentra en un 30% en el esqueleto. El Zn actúa como activador o coactivador de proteínas que involucran la homeostasis ósea, ya sea en forma de dedos de zinc o grupos de zinc (Huang *et al.*, 2020). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Boughammoura *et al.* (2020), quienes demuestran que el Zn podría intervenir contra la toxicidad de Cd en el tejido óseo, mediante distintos transportadores ZIP y ZnT. Kambe *et al.* (2008) explican que varios ZnT y ZIP se expresan durante el desarrollo de mamíferos en los osteoblastos, ameloblastos y odontoblastos, lo que indica que el Zn está sumamente relacionado con la formación y remodelación ósea. Por ejemplo, ZIP1 regula la estimulación de la osteogénesis y suprime la osteoclastogénesis. De esta manera el Zn es un elemento esencial para el desarrollo, crecimiento óseo, para su regeneración y homeostasis.

En nuestro estudio, el Cd redujo significativamente los pesos testiculares y epididimarios. El Cd afecta a los órganos reproductivos como lo demostraron Hernández-Rodríguez *et al.* (2021), quienes administraron 1 mg/kg Cd desde el primer día de nacimiento hasta los 35 y 49 días de vida, y observaron que disminuyeron los pesos del testículo y del epidídimo. En el presente estudio, la dosis de 2 mg/kg a partir del día de vida 35, el testículo y epidídimo presentaron disminución de peso como en los estudios reportados por Liu *et al.* (2016) y con dosis más altas de 2.5 mg/kg de Cd como lo reporta Sadik, (2008), quienes señalan que el Cd al reducir el peso de órganos reproductivos, conduce a daños severos en cuanto a su estructura y función.

La disminución de peso de los órganos reproductivos en nuestros resultados puede atribuirse a los cambios degenerativos que se presentaron en el epitelio seminífero y epididimario. de Souza-Predes *et al.* (2010) indican que cuando hay una gran pérdida de células del epitelio seminífero se puede observar una fuerte reducción de los parámetros morfométricos, como el peso del testículo y el diámetro de los túbulos seminíferos, esto concuerda con nuestros resultados donde se observó la pérdida del epitelio seminífero y de la actividad espermatogénica,



además que se relaciona con la disminución del diámetro de los túbulos seminíferos lo cual provoca una disminución del peso testicular. En cuanto al epidídimo, la reducción del peso pudo deberse a la ausencia de espermatozoides lo que provocó que el epidídimo se plegara sobre sí mismo ocasionando aspecto cribiforme, y que se relaciona con las alteraciones en la función del epidídimo como lo reportan Kempinas & Klinefelter, (2014). Esta disminución de peso en el testículo y epidídimo se asocia con daños histológicos observados en nuestros resultados.

En el grupo de Zn+Cd, el peso testicular y epididimario no presentaron disminución de peso, lo que indica el papel protector del Zn, donde la histología del testículo y epidídimo no se vieron afectadas, así como la presencia de espermatozoides, lo que influyó en mantener los pesos de ambos órganos, estas descripciones histológicas y funcionales donde el Zn tuvo efectos favorables se describen más adelante.

El Cd puede provocar atrofia testicular, disminución del diámetro de túbulos seminíferos, y detención de la espermatogénesis, pérdida de células germinales, además de provocar daños al epitelio epididimario, como aumento de vacuolización, edemas y hemorragias, como lo reportan previos estudios (El-Maraghy & Nassar, 2011; Abarikwo *et al.*, 2018; Mahmoudi *et al.*, 2018). Lo cual concuerda con nuestros resultados, donde el grupo Cd mostró valores bajos en el índice de maduración del epitelio seminífero, al detenerse el proceso de espermatogénesis. Esto puede deberse al daño que observamos en los análisis histológicos, donde el Cd provocó atrofia en el testículo, descamación de las células de Sertoli, vacuolización epitelial, contorno irregular y disminución en el diámetro de los túbulos seminíferos.

Estos daños observados, posiblemente se deban al estrés oxidante que el Cd puede provocar tomando en cuenta que el testículo es un órgano blanco de este metal tóxico (Bhashir *et al.*, 2019; Shi & Fu, 2019). De manera que, al ingresar el Cd tanto en el epitelio testicular como epididimario, ya sea directamente al permear las barreras hemáticas, o por distintos canales y/o transportadores, el Cd probablemente provocó un aumento de EROS, lo que llevó al estrés oxidante como lo reportan Wang *et al.* (2011), Minutoli *et al.* (2015) y Thévenod *et al.* (2019). Las

células de Sertoli, quienes brindan diversos factores para la maduración de las células germinales (Ramos-Treviño *et al.*, 2018), fueron blanco del Cd al ejercer sus efectos tóxicos por interrumpir las uniones estrechas en estas células. Debido a que las proteínas que conforman la BHT son vulnerables a los efectos del Cd (Siu *et al.*, 2009), de manera que al permear la BHT, tanto las células de Sertoli y las células germinales están expuestas al daño que induce el Cd como lo reportan Zhang *et al.* (2010). Esto podría explicar la descamación de las células de Sertoli y la pérdida de células germinales en nuestro estudio.

Por otra parte, en el grupo de Zn+Cd, el Zn tuvo un efecto protector sobre el epitelio seminífero, favoreciendo una espermatogénesis completa, se ha demostrado que el Zn evita la desorganización de los túbulos seminíferos, ejerciendo funciones protectoras ante los daños testiculares provocados por el Cd, además de inducir el aumento de células espermatogénicas (Babaknejad *et al.* 2018; Mohamed & Abdelrahman, 2019).

El Zn es importante para las enzimas antioxidantes como la Cu/Zn-SOD, en la cual actúa como un cofactor para su actividad. Además, el Zn actúa como defensa de los grupos tiol y sulfhidrilo al interactuar con ellos e inhibir la generación de radicales libres. Estudios previos demuestran que la administración de Zn induce el aumento de MT, las cuales son las responsables de la captación de Cd, para evitar así la interacción del Cd con proteínas y evitar la producción descontrolada de EROS como lo reportan Polykretis *et al.* (2019). Anjum *et al.* (2016) señalan que el Zn disminuye los daños por lipoperoxidación en el testículo por exposición a Pb. De manera que el Zn es un metal activo que puede brindar protección ante los daños oxidantes. Posiblemente estos mecanismos podrían explicar el papel del Zn en la protección del epitelio seminífero en nuestros resultados.

Se ha demostrado que el endotelio vascular es uno de los principales tejidos diana a la toxicidad del Cd (Marettová *et al.*, 2010; Pérez Díaz *et al.*, 2019). El Cd daña la arteria espermática interna con las ramas testiculares y del epidídimo, además del plexo pampiniforme (Gunn *et al.*, 1963). De esta manera, aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos, provocando la fuga de líquido hacia el intersticio, provocando edema, hemorragia, hipoxia, inflamación, lo que conduce a

necrosis testicular o epididimaria (Prozialeck *et al.*, 2006, 2008). Además, el Cd provoca daño en las células endoteliales donde ocurre un efecto directo en las uniones adherentes entre las células endoteliales de los vasos, induce alteración sobre la expresión y función de la molécula de adhesión celular dependiente de Ca conocida como cadherina endotelial vascular (cadherina- EV), y provoca una reorganización del citoesqueleto de actina (De Angelis *et al.*, 2017). Estos estudios concuerdan con los que observamos en nuestros resultados, donde se observó un daño severo en el endotelio vascular de ambos órganos, donde el Cd indujo desprendimientos, hemorragia y necrosis testicular y epididimaria.

En nuestro estudio, el Zn tuvo efectos favorables sobre el endotelio vascular del testículo al no presentar desprendimiento vascular, hemorragias o edemas en el intersticio. Esto puede deberse al suministro previo de este elemento, y su incorporación al órgano mediante transportadores de Zn como el ZIP8, el cual se expresa en células endoteliales vasculares del testículo. Sin embargo, existe controversia sobre este transportador, debido a que se ha considerado que puede ser un potenciador en la captación de Cd, además de que se expresa considerablemente en cepas sensibles al Cd y no en cepas de animales resistentes al Cd como lo reportan Dalton *et al.* (2005). Por lo que la competencia del Zn con el Cd por estos transportadores podría ser un posible mecanismo de protección en el endotelio vascular del testículo. No obstante, se necesitan más estudios sobre los posibles mecanismos del Zn en el endotelio vascular testicular ante el daño causado por Cd.

En nuestro estudio, el Cd provocó daños en la estructura del epidídimo, con un aumento significativo en el grosor del epitelio, provocando alteraciones hiperplásicas y cambios estructurales, en conjunto con una disminución del lumen epididimal en las tres regiones, además de la desorganización celular y un aumento de vacuolización en el epitelio. Lamas *et al.* (2017) y Hernández-Rodríguez *et al.* (2021) sugieren que el Cd al atravesar la BHE, puede inducir el aumento de EROS, provocando estrés oxidante, lo que conlleva a daños en el epitelio y los compartimentos celulares. Abarikwo *et al.* (2018) demostraron que el Cd reduce los

niveles de SOD, CAT y GPx, lo que conlleva al aumento de estrés oxidante, y lo que provoca las alteraciones histológicas del testículo y epidídimo. El aumento en el grosor del epitelio epididimario en conjunto a la disminución del lumen, está relacionado con el aumento de vesículas densas, lo que llega a ocupar gran parte del citoplasma celular. Además, el Cd interfiere con las adhesiones celulares, provocando la desorganización celular en el epitelio como lo reportan Lamas *et al.* (2017).

De Grava Kempinas & Klinefelter (2015), describen que estas alteraciones hiperplásicas provocan cambios cribiformes, que llegan al plegamiento del órgano. Estos cambios se asocian a toxicidad por algunos metales pesados como el Cd, y que a su vez el plegamiento puede deberse a una respuesta secundaria a la falta de espermatozoides y líquido luminal, y que provoca un microambiente alterado. Además, estas alteraciones pueden relacionarse a la falta de andrógenos. Por lo tanto, en nuestro estudio, la ausencia de espermatozoides en el lumen epididimario podría explicar el cambio cribiforme asociado a la disminución del lumen epididimal y que el daño generado en el epitelio, donde posiblemente el Cd atravesó la BHE, influyendo en la desorganización epitelial al interferir con las adhesiones celulares e incrementar la vacuolización. Sin embargo, no hay una causa definitiva que pueda explicar con exactitud los cambios cribiformes del epidídimo.

Por otra parte, en este proyecto, en los animales tratados con Zn+Cd encontramos efectos benéficos del Zn consistieron en proteger al epitelio epididimario en la región de la cabeza y del cuerpo al no presentar daño estructural, desorganización del epitelio ni reducción en el lumen y donde la presencia de espermatozoides en la luz epididimal es un indicador que confirma el efecto protector del Zn.

El epidídimo es un órgano rico en concentraciones de Zn, por lo tanto, su función en el mantenimiento de la BHE y en la función secretora de las células epiteliales se ven reflejados por la presencia de Zn. La mayoría de las proteínas que el epidídimo secreta dependen de Zn para su funcionalidad. Los epididimosomas requieren de Zn para potenciar la interacción con los espermatozoides y que estos puedan adquirir las proteínas necesarias para su maduración, además de las

enzimas antioxidantes que requieren al Zn como cofactor para su funcionalidad como lo reportan Babaknejad *et al.* (2017), Sullivan *et al.* (2017). Estas funciones y mecanismos podrían explicar el efecto de protección que el Zn brindó en la cabeza y cuerpo del epidídimo en nuestro estudio.

Sin embargo, en la región de la cola del epidídimo, Lamas *et al.* (2017), describen que el aumento del grosor en esta zona podría deberse al esfuerzo por la respuesta antioxidante, en la cual parece no ser del todo suficiente para reparar el daño que se puede dar durante el almacenamiento de los espermatozoides ante el estrés oxidante provocado por el Cd. La actividad secretora del epitelio epididimario se pudo ver forzada a los cambios metabólicos en el compartimento luminal, lo que aceleró el intento por restaurar los parámetros y proporcionar la sobrevivencia de los espermatozoides. Wu *et al.* (2020), demostraron que los efectos adversos a largo plazo del estrés oxidativo en el epidídimo y los espermatozoides de rata se presentan con mayor frecuencia en la región de la cola del epidídimo. Esto podría explicar el aumento en la altura del epitelio en la región de la cola del epidídimo de nuestros resultados. Probablemente la acumulación de Cd en esta región y la presencia de Zn llevó a la competitividad en el ingreso a las células y en los sitios de unión de enzimas. Un estudio más a detalle podría dilucidar el mecanismo por el cual esta región presentó este aumento del epitelio.

En nuestro estudio los parámetros espermáticos de las tres regiones del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola) en el grupo de Cd se deterioraron significativamente ya que los daños que el Cd indujo en el testículo, la reducción de los túbulos seminíferos y la descamación de las células de Sertoli, alteraron la espermatogénesis, por lo tanto, no se observó la presencia de células germinales de ningún tipo, ni espermatozoides en el lumen del tubo seminífero, y esta ausencia de espermatozoides se vio reflejada en las tres regiones del epidídimo. Hernández-Rodríguez *et al.* (2021) reportan que, en animales con dosis diarias de 0.125, 0.25 y 0.5 mg/kg de Cd vía i.p. del día de vida 1 al 49, presentaban espermatozoides en las tres regiones epididimarias, la concentración y vitalidad espermática disminuyeron en las dosis más altas. Sin embargo, no fue nuestro caso donde las dosis (una vez por semana) de 2 mg/kg de Cd vía i.p. a partir del día 35

al 56 de vida, provocó daños severos en testículo y epidídimo con ausencia de espermatozoides.

La ausencia de espermatozoides en nuestro estudio podría explicarse a que el Cd probablemente indujo un aumento de EROS, lo que provoca estrés oxidante, que conlleva a daños en los testículos como lo reportan Elmallah *et al.* (2017). El Cd al inducir el estrés oxidante, conlleva a la lipoperoxidación a la cual los espermatozoides son un blanco debido a que contienen abundantes ácidos grasos polinsaturados, y su oxidación se relaciona con una disminución en los parámetros espermáticos o muerte celular por apoptosis (Adamkovicova *et al.*, 2016).

En el testículo, la apoptosis es altamente regulada y fundamental para llevar a cabo el proceso normal de la espermatogénesis y mantener así el potencial de fertilización (Bhardwaj *et al.*, 2021). La presencia de Cd puede interrumpir la regulación de este proceso, ya que se ha demostrado que el Cd induce apoptosis testicular en la rata (Amanpour *et al.*, 2020), describiéndose condensación de cromatina, degeneración de orgánulos citoplasmáticos, fragmentación del ADN y aumento en la actividad de caspasa-3 y 9 (Wang *et al.*, 2011).

La vía apoptótica mediada por estrés del retículo endoplasmático es otro efecto inducido por el Cd. La regulación al alza de caspasas-3,7,8,9 y de genes proapoptóticos (Bid, Bax, Bim, Bak) y una regulación a la baja del gen antiapoptótico (Bcl-2) por el Cd, induce la apoptosis de células germinales (Alkhedaide *et al.*, 2016; Elmallah *et al.*, 2017; Dai *et al.*, 2019; Amanpour *et al.*, 2020). Estos estudios podrían explicar nuestros resultados, donde suponemos que la ausencia de células germinales y de espermatozoides pudo deberse posiblemente al estrés oxidante y a la apoptosis celular que el Cd induce, tal y como lo reportan los estudios de Rajendar *et al.* (2011), Ji *et al.* (2013) y Amanpour *et al.* (2020), en donde observaron que los túbulos seminíferos presentaron contracción, apoptosis en células somáticas y germinales por la administración de Cd, y un incremento en los niveles de EROS y lipoperoxidación.

En el epidídimo, la exposición a Cd también perturba las uniones celulares de la BHE, estos daños conllevan a una maduración alterada de los espermatozoides (Adamkovicova *et al.*, 2014).

La acumulación de Cd en el epidídimo conduce a daños morfológicos y apoptosis en células epiteliales y en los espermatozoides (Machado-Neves, 2021). Al igual que en el testículo, el Cd regula al alza genes Bcl-2, bax, Cytc, Caspas-3 y -9 en el epidídimo, desencadenando la apoptosis vía mitocondrial, además de también regular al alza la expresión de factores relacionados con la vía de inflamación NF-kB (Zhang *et al.*, 2021).

El papel del epidídimo en la protección de los espermatozoides ha sido un tema de importancia, debido a que los espermatozoides son susceptibles al daño oxidativo (Noblanc *et al.*, 2012). El epidídimo se ve obligado a poder otorgarle la maquinaria necesaria para su supervivencia, es por lo que el epidídimo cuenta con una gran batería de sistema antioxidante, entre ellos la SOD, CAT, GPx, GSH, tiorredoxinas, peroxirredoxinas, entre otros (Ó-Flaherty *et al.*, 2019).

Por el contrario, en nuestro estudio, el grupo de Zn+Cd, consideramos que el Zn al proteger el epitelio seminífero como mencionamos anteriormente, influyó en los parámetros de la concentración, vitalidad y morfología espermática del epidídimo. Esto concuerda con estudios previos donde Babaknejad *et al.* (2017) y Chemek *et al.* (2018) describen que el Zn redujo los daños causados por el Cd, tanto en el tamaño del testículo como en las alteraciones histológicas testiculares, epididimarias y en los parámetros espermáticos. Sin embargo, nuestro estudio al administrar previamente con Zn, los resultados mostraron efectos protectores, al prevenir los daños que el Cd podría causar en los epitelios tanto del testículo como del epidídimo, y esa protección se vio reflejada en una mejora de los parámetros espermáticos.

Los efectos del Zn pueden atribuirse a que es muy importante durante el proceso de la espermatogénesis, donde actúa como factor de transcripción en las proteínas de dedos de zinc para iniciar la espermatogénesis. Además de su requerimiento en las células germinales, como en la meiosis de los espermátocitos. Durante la espermiogénesis, en las últimas etapas de diferenciación, el Zn se incorpora al núcleo de las espermátidas, asociándose con las protaminas para formar puentes de Zn y de esa manera poder estabilizar la cromatina para

finalmente dar origen a los espermatozoides, como lo reportan Yamaguchi *et al.* (2009).

Por lo tanto, la acción del Zn en la espermatogénesis, se vio comprometida con la presencia de espermatozoides en nuestro estudio, en las tres regiones del epidídimo, la concentración espermática tuvo un aumento significativo en comparación al grupo de Cd, esto posiblemente debido al papel importante que juega el Zn contra la muerte celular por apoptosis (Roscioli *et al.*, 2013). Hemos abordado que las células germinales deben pasar por varios procesos para convertirse en espermatozoides y se ha demostrado que la deficiencia de Zn está relacionada con el aumento de apoptosis en células de Sertoli, células de Leydig, disminución en el volumen testicular, reducción en el número de células germinales que no llegan a convertirse en espermatozoides, lo que se relaciona con una disminución en el conteo espermático como lo reportan Asadi *et al.* (2017) y Xiong *et al.* (2021).

El aumento en los niveles de EROS es otra causa de apoptosis de células germinales (Vickram *et al.*, 2021). Se ha reportado que el Zn modula el sistema antioxidante en los testículos para mantener la espermatogénesis, reduciendo los niveles de EROS y apoptosis en animales tratados con tetracloruro de carbono (Chen *et al.*, 2020).

Pourhassanali *et al.* (2016) y Xiong *et al.* (2021) sugieren que el Zn regula la apoptosis mediante la expresión de genes y proteínas como Bax, Bcl-2 y caspasa-3, sin embargo, los mecanismos moleculares específicos aún no se comprenden claramente, por lo que se requieren de más estudios para abordar los mecanismos por el cual el Zn modula la función antiapoptótica.

La vitalidad espermática en nuestros resultados tuvo un incremento en las tres regiones del epidídimo en comparación con el grupo de Cd. Un estudio reciente demuestra que los niveles de expresión de transportadores ZIP-12 en espermatogonias y espermatozoides son más altos comparados con otros tipos celulares. ZIP-12 tienen la función de mantener la homeostasis del Zn intracelular y de inhibir el aumento del estrés oxidativo en la viabilidad de las espermatogonias y espermatozoides durante la espermatogénesis y durante el recorrido en el



epidídimo y de esta manera contrarrestar la disminución de la fertilidad masculina como lo reportan Zhu *et al.* (2022). El Zn puede proteger a los espermatozoides al interactuar en la membrana, proporcionándole una capa de recubrimiento mediante la unión de grupos sulfhidrilos en las proteínas, otorgándole estabilidad y fluidez para aumentar el potencial fertilizante (Li *et al.*,2017).

Otra posible explicación de nuestros resultados es que el Zn además de actuar como cofactor de la Cu/Zn-SOD e inducir el aumento de la expresión de las MT, es necesario para modular la regulación transcripcional de CAT (Tate *et al.*, 1997). En un estudio, se implementó el uso de una proteína artificial con funciones similares a CAT, esta proteína denominada “Tau monomérica” que contienen grupos tiol (SH), se observó que estos grupos SH interactúan con Zn en sus sitios activos, induciendo una actividad alta al poder eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que evitaría alteraciones en el recuento y vitalidad en los espermatozoides (Asadollahi *et al.*, 2016).

La evaluación de la morfología espermática en nuestro estudio en el grupo de Zn+Cd presentó una disminución significativa en comparación con el grupo control y el grupo tratado solamente con Zn. Las alteraciones más comunes se observaron en el flagelo, donde se presentaron algunas torsiones, sin embargo, estas anomalías sólo se observaron en espermatozoides de la región de la cola del epidídimo. Mencionamos anteriormente que en esta región se presentó un aumento de la altura del epitelio, y que probablemente estaba relacionado con el esfuerzo del epidídimo al brindar la protección de los espermatozoides en almacenamiento y que este esfuerzo por parte del epidídimo posiblemente se debía a la acumulación de Cd en esta región como lo reportaron Lamas *et al.* (2017). Probablemente el estrés oxidante al que pudo someterse el epidídimo por parte del Cd y la competitividad del Zn por sitios de unión, provocó al aumento de vacuolización en el citoplasma y algunos espermatozoides fueron expuestos a daños por parte del Cd. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Babaknejad *et al.* (2017), sin embargo, ellos usaron administraciones más bajas de Cd (1.0 mg/kg) y de Zn (1.5 mg/ kg), y mostrando que en la región de la cola del epidídimo la morfología tuvo una disminución significativa, además solo evaluaron histología testicular donde el Zn

redujo los daños. A comparación de nuestros resultados donde la administración previa de Zn (4 mg/kg) protegió totalmente el epitelio testicular y epididimario y los parámetros espermáticos en animales expuestos a Cd (2 mg/kg), salvo en la región de la cola del epidídimo donde presentó un aumento en la altura del epitelio.

Estudios demuestran que el Zn reduce las alteraciones en el testículo y epidídimo, brindando protección a las células germinales y aumentando los niveles de Nrf2, SOD y GPx. Por el contrario, en animales con deficiencia de Zn, estos niveles disminuyen, provocando daños en la histología testicular, epididimaria y anomalías en los espermatozoides (Maremanda *et al.*, 2016; Maremanda & Jena, 2017; Sahu *et al.*, 2020).

Estudios en humanos señalan que la concentración de Zn (0.23 - 2.30 mg/mL) en semen, se encuentra relacionada con las muestras de normospermia, lo que comprueba que este elemento tiene un papel vital para la morfología espermática (Vickram *et al.*, 2021). Sin embargo, hacen falta más estudios para identificar algún mecanismo por el cual el Zn proteja la morfología de los espermatozoides.

Pocos estudios han examinado el efecto del Zn en el epidídimo con exposición a Cd, sin embargo, nuestros estudios demuestran que la administración previa de Zn previene el daño que podría causar el Cd al epitelio epididimario y a los espermatozoides en las regiones de la cabeza y cuerpo, y de reducir los daños en la región de la cola del epidídimo. Batra *et al.* (2001) y Anjum *et al.* (2017), reportan que el Zn reduce los daños histológicos, espermáticos y reduce los niveles de lipoperoxidación al aumentar la expresión de enzimas antioxidantes como, SOD y CAT ante el daño causado por Pb.

El epidídimo es un órgano con altas concentraciones de Zn, este elemento se puede encontrar tanto en el lumen como en las células que conforman el epitelio (Marreiro *et al.*, 2017). Además, durante la espermatogénesis, el Zn que se une al flagelo de los espermatozoides para protegerlo de una oxidación prematura es reabsorbido por el epitelio epididimario para que los espermatozoides adquieran movilidad (Henkel *et al.*, 2003). Ha *et al.* (2006) demostraron que es necesario para regular la expresión de enzimas antioxidantes, por ejemplo, la expresión de

glutamato-cisteína ligasa, una enzima que limita la velocidad de síntesis de Novo del glutatión. Por lo que la deficiencia de Zn en el epidídimo conduce a un aumento acelerado de EROS, estrés oxidante y que provoca daños en la estructura del epitelio, así como en la maduración de los espermatozoides, tal y como lo reportan Chabory *et al.* (2009), incluso los propios espermatozoides dependen de Zn para su sobrevivencia y función (Ellis, 2014; Foresta *et al.*, 2014; Mirnamniha *et al.*, 2019).

En el presente estudio, la administración de 2 mg/kg de Cd redujo las concentraciones de T en comparación con el grupo control y los grupos experimentales (Zn y Zn+Cd). Los daños que observamos tanto en el testículo como en el epidídimo; la disminución de pesos en ambos órganos, la disminución en el diámetro de los túbulos seminíferos, los daños en el epitelio seminífero, la ausencia de espermatozoides, los daños en el epitelio epididimario y la disminución de los parámetros espermáticos, también están relacionados con las bajas concentraciones de T que el Cd provocó.

Tanto la estructura y la espermatogénesis en el testículo, así como la función del epidídimo son dependientes de este andrógeno, y al no presentarse las concentraciones adecuadas de T para llevar a cabo estas funciones, se verán reflejados en el potencial reproductivo de los espermatozoides (Ye *et al.*, 2017). Se ha demostrado que el Cd interfiere e inhibe la síntesis y secreción de T en las células de Leydig, donde se han reportado niveles bajos de enzimas esteroidogénicas como la 3 $\beta$ -HSD y 17 $\beta$ -HSD que son esenciales para la síntesis de T (Pandya *et al.* 2012; Alkhedaide *et al.* 2016). Yan *et al.* (2019) y Hernández-Rodríguez *et al.* (2021) sugieren que la exposición a Cd afecta las células de Leydig en la rata, donde induce el aumento de EROS que provocan daño mitocondrial, reduciendo los niveles de expresión de StAR, lo que puede inhibir la secreción de hormonas esteroideas y la síntesis de T. Rajendar *et al.* (2012) demostraron que la exposición a 3 mg/Kg de Cd una vez a la semana por 4 semanas aumenta los niveles de EROS en testículo, reducir la actividad de SOD, CAT y GPx, y causar deterioro en células de Leydig, lo que induce niveles bajos de T. Estos estudios podrían explicar nuestros resultados, donde el Cd pudo haber provocado daño en las células de Leydig, probablemente

generando estrés oxidante mitocondrial inhibiendo su función y provocar la disminución en la síntesis de las enzimas esteroidogénicas y de la síntesis de T.

Por otra parte, encontramos que en el grupo Zn+Cd, el Zn mantuvo las concentraciones de T, esto explicaría la presencia del epitelio seminífero maduro con todos los tipos de células germinales correspondientes a una espermatogénesis completa y espermatozoides en el lumen epididimario, además de que los epitelios del testículo y del epidídimo no presentaron daños histológicos y los parámetros espermáticos no se vieron afectados.

Amara *et al.* (2008) y Said *et al.* (2010) señalan que la administración de Zn en animales expuestos a Cd restableció la concentración de T y el conteo espermático, ante el estrés oxidante que provoca el Cd.

La deficiencia de Zn es una de las causas de los bajos niveles de T, además de inducir daños en los órganos reproductivos. Zhang *et al.* (2018) informan en sus estudios que el suministro de Zn en las células de Leydig es requerido para llevar a cabo la síntesis y secreción de T. Esto se debe a la expresión de transportadores de Zn como ZnT-8 en las células de Leydig y en las mitocondrias. Este transportador está relacionado con la acumulación de Zn, además el Zn regula la fosforilación de StAR para que se lleve a cabo la síntesis de T.

Además, la administración de Zn puede reducir el daño causado por ftalatos y metales tóxicos, al aumentar la expresión de enzimas esteroidogénicas testiculares y la síntesis de T, y se refleja en la reducción de daños en la estructura de los túbulos seminíferos y en el proceso espermatogénico, así como la reducción de los niveles de lipoperoxidación, (Anjum *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2020).

Todos estos estudios apoyan nuestros resultados, debido a que el suministro adecuado de Zn en las células de Leydig es requerido para llevar a cabo la secreción y síntesis de T. Sin embargo, el tratamiento previo de Zn en nuestro estudio pudo haber tenido el efecto de protección en las células de Leydig como lo hizo en los túbulos seminíferos y en el epidídimo, y no de restablecer las concentraciones de T o reducir daños como se mencionan en estudios previos.

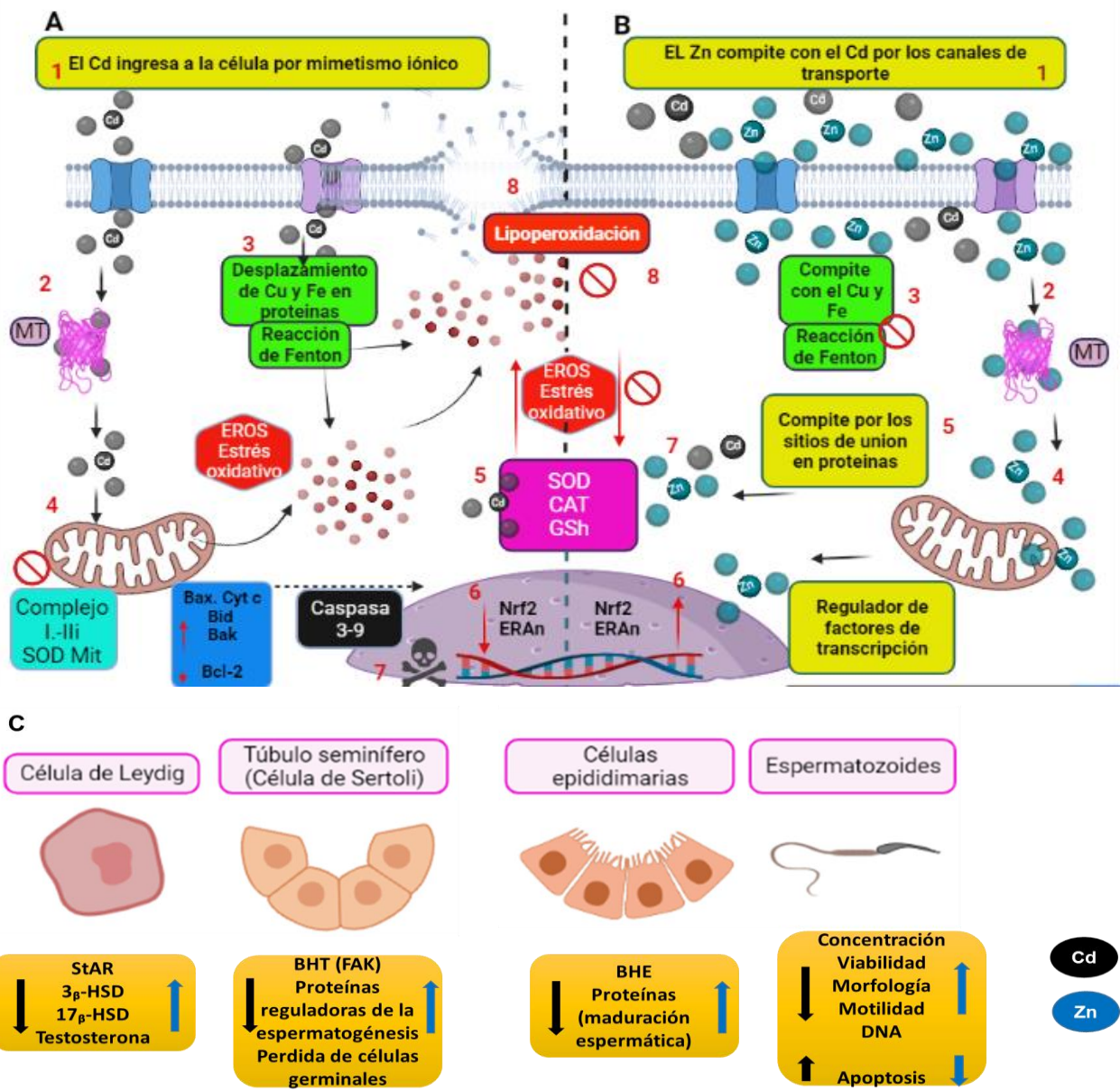
De acuerdo a los resultados observados en este estudio donde el Zn protegió y redujo los daños en testículo y epidídimo que provoca el Cd, se ha propuesto un modelo que trate de explicar el principal mecanismo donde el Zn compite con el Cd por los canales de transporte y por los sitios de unión, es decir, grupos sulfhidrilo en proteínas y enzimas que son necesarias para combatir el estrés oxidante (figura 18).

La captación de Cd en la célula mediante mimetismo iónico puede ocurrir en los sitios de unión de distintos transportadores, en los cuales se incluyen los de Zn (Dalton *et al.*, 2005). Las MT secuestran al Cd, sin embargo, el agotamiento del secuestro por las MT induce a que el Cd interactúe con membranas mitocondriales y otros organelos (Polykretis *et al.*, 2019) El Cd ejerce efectos directos en la mitocondria al inhibir el complejo I y III, altera el potencial de membrana e induce el aumento de EROS. La interferencia del Cd a través del mimetismo molecular en los sitios de unión de los iones Cu, Zn y Se que actúan como cofactores en las enzimas antioxidantes (SOD, CAT Y GPx), desequilibra su función al reducir o inhibir su capacidad reguladora, lo que provoca el aumento de EROS (de Angeli *et al.*, 2017). El Cd también puede desplazar al Fe y Cu de varias proteínas citoplasmáticas y de membrana, lo que provoca la liberación y aumento en la concentración de Fe y Cu libres, los cuales a través de la reacción de Fenton provocan el aumento de EROS (Waisberg *et al.*, 2003; Rani *et al.*, 2014). Además, el Cd puede regular a la baja el factor Nrf2 mediante ERAn e inhibir la expresión de enzimas antioxidantes y provocar el aumento de EROS (Bashir *et al.*, 2019). El aumento de EROS que induce el Cd da como resultado estrés oxidante, el cual provoca lipoperoxidación, además el estrés oxidante puede regular al alza proteínas proapoptóticas como Bax, Bid, Bak y regular a la baja proteínas antiapoptóticas Bcl-2, induciendo la activación de caspasas (3,7,8,9) provocando muerte celular (figura 18A) (Elmallah *et al.*, 2017; Bhardwaj *et al.*, 2021).

Por otra parte, el mecanismo de competitividad del Zn con el Cd se lleva a cabo en los transportadores y canales para ingresar a la célula. Las MT también secuestran al Zn para suministrarlo con ayuda de los transportadores de ZnT y ZIP en sitios diferentes (Blindauer & Leszczyszyn *et al.*, 2010). El resto del Zn citosólico

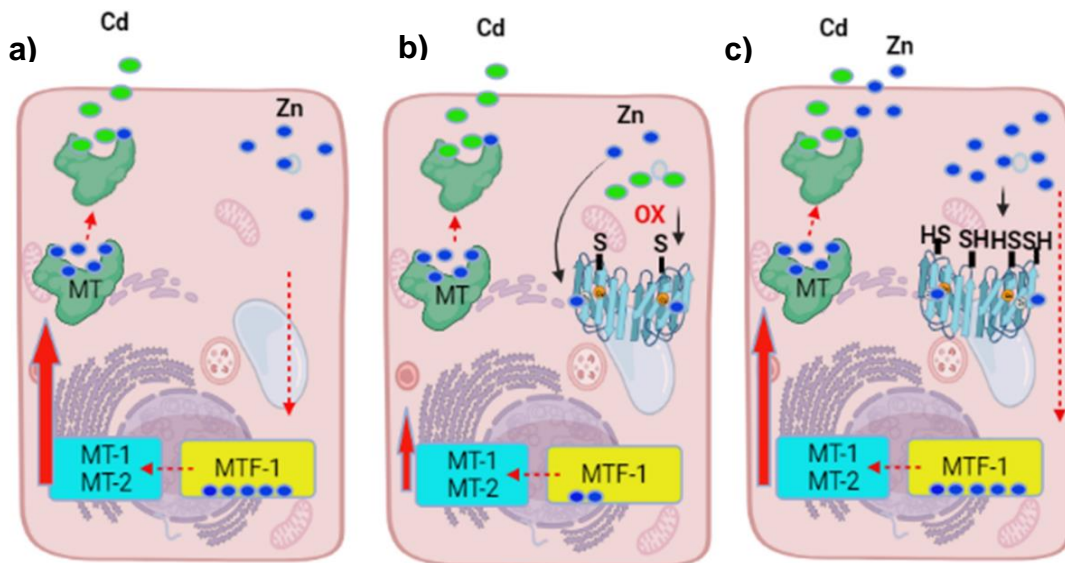
se dirige a organelos para su función, como en la mitocondria, donde puede competir con el Cd y evitar el aumento de EROS (Rahman *et al.*, 2017; Hübner & Haase, 2021). El Zn al estar presente en numerosas proteínas y enzimas puede competir con el Cd en los sitios de unión, impidiendo que el Cd pueda interferir y alterar las funciones metabólicas como en los sitios de unión de Cu/Zn-SOD como defensa antioxidante e impedir el aumento de EROS e inhibir la lipoperoxidación (de Angelis *et al.*, 2017). El Zn en el núcleo actúa como factor de transcripción, regulando al alza el factor Nrf-2 y aumentar la expresión de enzimas antioxidantes. El Zn compite con el Cu y el Fe e inhibe la reacción de Fenton, evitando el aumento de EROS y la lipoperoxidación. Además, el Zn es un regulador antiapoptótico al interactuar e inhibir las caspasas (3, 7, 8, 9) (figura 18B) (Hübner & Haase, 2021).

Por lo tanto, el estrés oxidativo que induce el Cd puede provocar regulación a la baja de la expresión de enzimas esteroideogénicas, lo que conduce a una baja concentración de T (Maraghy & Nassar, 2011; Bhardwaj *et al.*, 2021), el Zn puede regular al alza las expresiones de las enzimas esteroideogénicas y la síntesis de T (Gao *et al.*, 2020). Las BHT y BHE son blanco del Cd al interrumpir las uniones celulares y expresiones de proteínas de adhesión, donde puede regular a la baja la expresión de FAK, por otra parte, el Zn regula al alza la expresión de proteínas de adhesión para la formación de las barreras hemáticas (Siu *et al.*, 2009; Miyoshi *et al.*, 2016). El estrés oxidativo por Cd regula a la baja proteínas y factores en células de Sertoli, provocando alteraciones en la espermatogénesis, apoptosis de células germinales, y el Zn actúa en la espermatogénesis mediante factores de transcripción como dedos de Zn, además de regular la función antiapoptótica (Yamaguchi *et al.*, 2009; Siddiqui *et al.*, 2015; Ishizuka *et al.*, 2016). En el epidídimo, el estrés oxidante altera la estructura del epitelio y sus funciones donde regula a la baja expresión de proteínas y enzimas que participan en la maduración espermática (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2021). Los espermatozoides también se ven afectados por el estrés oxidante que el Cd puede inducir, lo que se relaciona con alteraciones en los parámetros espermáticos (figura 18C) (Lamas *et al.*, 2017). Por lo tanto, la competencia por los sitios de unión es uno de los mecanismos plausibles de la protección del Zn sobre la toxicidad inducida por Cd.



**Figura 18.** Modelo esquemático de la competencia del Zn con el Cd en la célula. A) Mecanismo de toxicidad del Cd. B) Mecanismo de competitividad del Zn con el Cd. C) Efectos del Cd y Zn en testículo y epidídimo. Cadmio (Cd), zinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe), metalotioneínas (MT), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión (GSH), factor nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2), elementos respuesta a antioxidante (ERAn), proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), barrera hemato-testicular (BHT), barrera hemato-epididimaria (BHE), proteína quinasa de adhesión focal (FAK) (de Angelis *et al.*, 2017; Bhardwaj *et al.*, 2021).

Otro mecanismo celular del Zn, es el inducir el aumento en la expresión de MT para restablecer el equilibrio redox secuestrando al Cd (figura 19).



**Figura 19.** Inducción de la expresión de MT por Zn. Esquema del mecanismo propuesto de la inducción de MT en función del Cd y Zn. a) cuando SOD no se sobreexpresa, el Cd desplaza al Zn, el Zn activa el MTF-1, lo que induce al aumento de la expresión de MT, los niveles altos de MT ejercen su función al restablecer el equilibrio redox secuestrando al Cd. b) Cuando SOD se sobreexpresa, secuestra al Zn que desplaza el Cd, lo que provoca la disminución de la inducción de MT, por lo que las MT no pueden secuestrar al Cd de manera eficiente, provocando alteraciones redox y esto conduce a la oxidación de SOD. Por otra parte, c) cuando se administran niveles altos de Zn, la SOD se metaliza, y el Zn induce el aumento de MT activando el MTF-1, restaurando el equilibrio redox y evitando la oxidación de SOD. (Adaptado de Polykretis *et al.*, 2019).

## 11. CONCLUSIONES

El Cd provoca alteraciones histológicas en testículo y epidídimo, lo que se relaciona con la pérdida de células germinales y disminución en los parámetros espermáticos, además disminuye la concentración de T.

La administración previa con Zn protege y reduce de los daños tóxicos que provoca el Cd en los órganos reproductivos.



- El Zn protege el epitelio seminífero, la espermatogénesis y la concentración de T ante la exposición a Cd.
- El Zn protege el epitelio de las regiones de la cabeza y cuerpo del epidídimo y reduce los daños del epitelio de la cola del epidídimo y los parámetros espermáticos ante la exposición a Cd.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

Abarikwu, S. O., Oruitemeka, S., Uwadileke, I. A., Omeodu, S. I., Okoye, N. F., Mgbudom-Okah, C. J., & Ohanador, R. (2018). Oral administration of cadmium depletes intratesticular and epididymal iron levels and inhibits lipid peroxidation in the testis and epididymis of adult rats. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, *48*, 213–223.

Abdollahi, S., Toupchian, O., Jayedi, A., Meyre, D., Tam, V., & Soltani, S. (2020). Zinc Supplementation and Body Weight: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, *11*(2), 398–411.

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. *The Scientific World Journal*, 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.

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.

Alaee, S., Talaiekhazani, A., Rezaee, S., Alaee, K. & Yousefian, E. (2014). Cadmium and male infertility. *J Infertil Reprod Biol*, *2* (2), 62-69.

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

Allouche-Fitoussi, D., & Breitbart, H. (2020). The Role of Zinc in Male Fertility. *International journal of molecular sciences*, *21*(20), 7796.

Amanpour, P., Khodarahmi, P., & Salehipour, M. (2020). Protective effects of vitamin E on cadmium-induced apoptosis in rat testes. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, *393*(3), 349–358.

Amara, S., Abdelmelek, H., Garrel, C., Guiraud, P., Douki, T., Ravanat, J. L., Favier, A., Sakly, M., & Ben Rhouma, K. (2008). Preventive effect of zinc against

cadmium-induced oxidative stress in the rat testis. *The Journal of reproduction and development*, 54(2), 129–134.

Andreini, C., & Bertini, I. (2012). A bioinformatics view of zinc enzymes. *Journal of inorganic biochemistry*, 111, 150–156.

Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., & Rosato, A. (2006). Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of proteome research*, 5(1), 196–201.

Anjum, M. R., Madhu, P., Reddy, K. P., & Reddy, P. S. (2017). The protective effects of zinc in lead-induced testicular and epididymal toxicity in Wistar rats. *Toxicology and industrial health*, 33(3), 265–276.

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.

Asadi, N., Bahmani, M., Kheradmand, A., & Rafieian-Kopaei, M. (2017). The Impact of Oxidative Stress on Testicular Function and the Role of Antioxidants in Improving it: A Review. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 11(5), IE01–IE05.

Asadollahi, K., Jasemi, N. S., Riazi, G. H., Katuli, F. H., Yazdani, F., Sartipnia, N., Moosavi, M. A., Rahimi, A., & Falahati, M. (2016). A bio-mimetic zinc/tau protein as an artificial catalase. *International journal of biological macromolecules*, 92, 1307–1312.

Asgharzadeh, F., Roshan-Milani, S., Fard, A. A., Ahmadi, K., Saboory, E., Pourjabali, M., Chodari, L., & Amini, M. (2021). The protective effect of zinc on morphine-induced testicular toxicity via p53 and Akt pathways: An in vitro and in vivo approach. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 67, 126776.

Babaknejad, N., Bahrami, S., Moshtaghi, A. A., Nayeri, H., Rajabi, P., & Iranpour, F. G. (2018). Cadmium Testicular Toxicity in Male Wistar Rats: Protective Roles of Zinc and Magnesium. *Biological trace element research*, 185(1), 106–115.

Badade, Z. G., More, K., Narshetty, J. (2011). Oxidative stress negatively affects spermatogenesis in male infertility. *BiomedicalResearch*. 22 (3): 319-22.

Baker, M. A., Hetherington, L., Weinberg, A., Naumovski, N., Velkov, T., Pelzing, M., Dolman, S., Condina, M. R., & Aitken, R. J. (2012). Analysis of phosphopeptide

changes as spermatozoa acquire functional competence in the epididymis demonstrates changes in the post-translational modification of Izumo1. *Journal of proteome research*, 11(11), 5252–5264.

Balítán Amoretty, C. B., Blanco Knotek, S. A., Cabrera, A., Hernández, Y. A., González Moncada, C. y Dinarte, D. (2015). Factors associated with low sperm quality. *Rev Univ y Cien*, 8(12) 13-26.

Baltaci, A. K., Mogulkoc, R., & Baltaci, S. B. (2019). Review: The role of zinc in the endocrine system. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 32(1), 231–239.

Baltaci, A. K., Mogulkoc, R., & Ozturk, A. (2006). Testosterone and zinc supplementation in castrated rats: Effects on plasma leptin levels and relation with LH, FSH and testosterone. *Life sciences*, 78(7), 746–752.

Bashir, N., Shagirtha, K., Manoharan, V., & Miltonprabu, S. (2019). Themolecular and biochemical insight view of grape seed proanthocyanidins in ameliorating cadmium-induced testes-toxicity in rat model: implication of PI3K/Akt/Nrf-2 signaling. *Bioscience Reports*,39, BSR20180515.

Batra, N., Nehru, B., & Bansal, M. P. (2001). Influence of lead and zinc on rat male reproduction at 'biochemical and histopathological levels'. *Journal of applied toxicology: JAT*, 21(6), 507–512.

Bedford J. M. (2015). Human spermatozoa and temperature: the elephant in the room. *Biology of reproduction*, 93(4), 97.

Bedford J. M. (2015b). The epididymis re-visited: a personal view. *Asian journal of andrology*, 17(5), 693–698.

Bedford J. (1990) Dynamics of spermatozoa in the epididymis. In: Physiology of gametes. Serono Symposium (eds R Asch, JP Balmaceda & I Johnson), pp.53. Serona Symposia, Norwell, MA, USA. USA.

Bekheet S. H. (2011). Comparative effects of repeated administration of cadmium chloride during pregnancy and lactation and selenium protection against cadmium toxicity on some organs in immature rats off springs. *Biological trace element research*, 144(1-3), 1008–1023.

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.

Bertelsmann, H., Sieme, H., Behne, D., & Kyriakopoulos, A. (2007). Is the distribution of selenium and zinc in the sublocations of spermatozoa regulated? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1095, 204–208.

Bhardwaj, J. K., Panchal, H., & Saraf, P. (2021). Cadmium as a testicular toxicant: A Review. *Journal of applied toxicology: JAT*, 41(1), 105–117.

Biblioteca Nacional de Medicina de EE . UU., Base de datos Toxnet. Disponible en línea: <http://toxnet.nlm.nih.gov> (consultado el 5 de diciembre de 2021)

Björndahl, L., & Kvist, U. (2010). Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Molecular human reproduction*, 16(1), 23–29.

Björndahl, L., & Kvist, U. (2011). A model for the importance of zinc in the dynamics of human sperm chromatin stabilization after ejaculation in relation to sperm DNA vulnerability. *Systems biology in reproductive medicine*, 57(1-2), 86–92.

Blindauer, C. A., & Leszczyszyn, O. I. (2010). Metallothioneins: unparalleled diversity in structures and functions for metal ion homeostasis and more. *Natural product reports*, 27(5), 720–741.

Boran, C., & Ozkan, K. U. (2004). The effect of zinc therapy on damaged testis in pre-pubertal rats. *Pediatric surgery international*, 20(6), 444–448.

Boughammoura S, Ben Mimouna S, Chemek M, Ostertag A, Cohen-Solal M, Messaoudi I. (2020). Disruption of Bone Zinc Metabolism during Postnatal Development of Rats after Early Life Exposure to Cadmium. *Int J Mol Sci*. 12;21(4):1218.

Breton, S., Nair, A. V., & Battistone, M. A. (2019). Epithelial dynamics in the epididymis: role in the maturation, protection, and storage of spermatozoa. *Andrology*, 7(5), 631–643.

Breton, S., Ruan, Y. C., Park, Y. J., & Kim, B. (2016). Regulation of epithelial function, differentiation, and remodeling in the epididymis. *Asian journal of andrology*, 18(1), 3–9.

Bridges, C. C., & Zalups, R. K. (2005). Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicology and applied pharmacology*, 204(3), 274–308.

Brugo-Olmedo, S., Chillik, C., & Kopelman, S. (2001). Definition and causes of infertility. *Reproductive biomedicine online*, 2(1), 41–53.

Caballero, J., Frenette, G., D'Amours, O., Belleannée, C., Lacroix-Pepin, N., Robert, C., & Sullivan, R. (2012). Bovine sperm raft membrane associated Glioma Pathogenesis-Related 1-like protein 1 (GliPr1L1) is modified during the epididymal transit and is potentially involved in sperm binding to the zona pellucida. *Journal of cellular physiology*, 227(12), 3876–3886.

Calvo, A., Pastor, L. M., Bonet, S., Pinart, E., & Ventura, M. (2000). Characterization of the glycoconjugates of boar testis and epididymis. *Journal of reproduction and fertility*, 120(2), 325–335.

Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Henry-Berger, J., Vernet, P., Cadet, R., Saez, F., & Drevet, J. R. (2010). Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *Journal of animal science*, 88(4), 1321–1331.

Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Kauselmann, G., Kern, H., Zevnik, B., Garrel, C., Saez, F., Cadet, R., Henry-Berger, J., Schoor, M., Gottwald, U., Habenicht, U., Drevet, J. R., & Vernet, P. (2009). Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(7), 2074–2085.

Chemek, M., Venditti, M., Boughamoura, S., Mimouna, S. B., Messaoudi, I., & Minucci, S. (2018). Involvement of testicular DAAM1 expression in zinc protection against cadmium-induced male rat reproductive toxicity. *Journal of cellular physiology*, 233(1), 630–640.

Chen, Y., Yang, J., Wang, Y., Yang, M., & Guo, M. (2020). Zinc Deficiency Promotes Testicular Cell Apoptosis in Mice. *Biological trace element research*, 195(1), 142–149.

Cheng, C. Y., Wong, E. W., Yan, H. H., Mruk, D. D. (2010). Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances. *Molecular and cellular endocrinology*, 315:49-56.

Chia, S. E., Ong, C. N., Chua, L. H., Ho, L. M., & Tay, S. K. (2000). Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *Journal of andrology*, 21(1), 53–57.

Chmielowska-Bąk, J., Izbiańska, K., & Deckert, J. (2013). The toxic Doppelgänger: on the ionic and molecular mimicry of cadmium. *Acta biochimica Polonica*, 60(3), 369–374.

Colagar, A. H., Marzony, E. T., & Chaichi, M. J. (2009). Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, 29(2), 82–88.

Cornwall G. A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Human reproduction update*, 15(2), 213–227.

Cuasnicu PS, Cohen DJ, Ellerman DA, Busso D, Da Ros VG, Morgenfel MM. (2002). Changes in sperm-specific proteins during epididymal maturation. In: Robaire B, Hinton BT, editors. *The epididymis: from molecules to clinical practice*. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic / Plenum Publishers; pp. 389–403.

Cupertino, M. C., Novaes, R. D., Santos, E. C., Neves, A. C., Silva, E., Oliveira, J. A., & Matta, S. (2017). Differential Susceptibility of Germ and Leydig Cells to Cadmium-Mediated Toxicity: Impact on Testis Structure, Adiponectin Levels, and Steroidogenesis. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 3405089.

Da Silva, N., Cortez-Retamozo, V., Reinecker, H. C., Wildgruber, M., Hill, E., Brown, D., Swirski, F. K., Pittet, M. J., & Breton, S. (2011). A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction (Cambridge, England)*, 141(5), 653–663.

Dai, X., Nie, G., Cao, H., Xing, C., Hu, G., & Zhang, C. (2019). In vivo assessment of molybdenum and cadmium co-induced the mRNA levels of heat shock proteins, inflammatory cytokines and apoptosis in shaoxingduck (*Anas platyrhynchos*) testicles. *Poultry Science*, 98, 5424–5431.

Dalton, T. P., He, L., Wang, B., Miller, M. L., Jin, L., Stringer, K. F., Chang, X., Baxter, C. S., & Nebert, D. W. (2005). Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), 3401–3406.

de Angelis, C., Galdiero, M., Pivonello, C., Salzano, C., Gianfrilli, D., Piscitelli, P., Lenzi, A., Colao, A., & Pivonello, R. (2017). The environment and male reproduction: The effect of cadmium exposure on reproductive function and its implication in fertility. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 73, 105–127.

De Grava Kempinas, W., & Klinefelter, G. R. (2015). Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis*, 4(2), e979114.

de Souza Predes, F., Monteiro, J. C., Matta, S. L., Garcia, M. C., & Dolder, H. (2011). Testicular histomorphometry and ultrastructure of rats treated with cadmium and Ginkgo biloba. *Biological trace element research*, 140(3), 330–341.

Dias, G. M., López, M. L., Ferreira, A. T., Chapeaurouge, D. A., Rodrigues, A., Perales, J., & Retamal, C. A. (2014). Thiol-disulfide proteins of stallion epididymal spermatozoa. *Animal reproduction science*, 145(1-2), 29–39.

Dissanayake, D., Wijesinghe, P., Ratnasooriya, W., & Wimalasena, S. (2010). Relationship between seminal plasma zinc and semen quality in a subfertile population. *Journal of human reproductive sciences*, 3(3), 124–128.

Domeniconi, R. F., Souza, A. C., Xu, B., Washington, A. M., & Hinton, B. T. (2016). Is the Epididymis a Series of Organs Placed Side By Side? *Biology of reproduction*, 95(1), 10.

Dubé, E., & Cyr, D. G. (2012). The blood-epididymis barrier and human male fertility. *Advances in experimental medicine and biology*, 763, 218–236.

Duvilanski, B.H., Cabilla, J.P. (2014). El cadmio como citotóxico y como metalohormona: efectos sobre el eje hipotálamo-hipofisario; Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias; Ciencia e Investigación; 64; 5; 8-2014; 5-19.

Ecco, G., Imbeault, M., & Trono, D. (2017). KRAB zinc finger proteins. *Development (Cambridge, England)*, 144(15), 2719–2729.

Eickhoff, R., Wilhelm, B., Renneberg, H., Wennemuth, G., Bacher, M., Linder, D., Bucala, R., Seitz, J., & Meinhardt, A. (2001). Purification and characterization of macrophage migration inhibitory factor as a secretory protein from rat epididymis: evidences for alternative release and transfer to spermatozoa. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 7(1), 27–35.

Eleawa, S. M., Alkhateeb, M. A., Alhashem, F. H., Bin-Jaliah, I., Sakr, H. F., Elrefaey, H. M., ... Khalil, M. A. (2014). Resveratrol reverses cadmiumchloride-induced testicular damage and subfertility by downregulating p53 and Bax and upregulating gonadotropins and Bcl-2 gene expression. *Journal of Reproduction and Development*, 60(2), 115–127



Elfgen, V., Mietens, A., Mewe, M., Hau, T., & Middendorff, R. (2018). Contractility of the epididymal duct: function, regulation and potential drug effects. *Reproduction (Cambridge, England)*, 156(4), R125–R141.

Elgazar, V., Razanov, V., Stoltenberg, M., Hershinkel, M., Huleihel, M., Nitzan, Y. B., Lunenfeld, E., Sekler, I., & Silverman, W. F. (2005). Zinc-regulating proteins, ZnT-1, and metallothionein I/II are present in different cell populations in the mouse testis. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 53(7), 905–912.

Ellis, R. E., & Stanfield, G. M. (2014). The regulation of spermatogenesis and sperm function in nematodes. *Seminars in cell & developmental biology*, 29, 17–30.

Elmallah, M. I. Y., Elkhadrogy, M. F., Al-Olayan, E. M., & Moneim, A. E. A. (2017). Protective effect of *Fragaria ananassa* crude extract on cadmium-induced lipid peroxidation, antioxidant enzymes suppression, and apoptosis in rat testes. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 957.

El-Maraghy, S. A., & Nassar, N. N. (2011). Modulatory effects of lipoic acid and selenium against cadmium-induced biochemical alterations in testicular steroidogenesis. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 25(1), 15–25.

Fallah, A., Mohammad-Hasani, A., & Colagar, A. H. (2018). Zinc is an Essential Element for Male Fertility: A Review of Zn Roles in Men's Health, Germination, Sperm Quality, and Fertilization. *Journal of reproduction & infertility*, 19(2), 69–81.

Falvo, S., Di Fiore, M. M., Burrone, L., Baccari, G. C., Longobardi, S., & Santillo, A. (2016). Androgen and oestrogen modulation by D-aspartate in rat epididymis. *Reproduction, fertility, and development*, 28(12), 1865–1872.

Famurewa, A. C., & Ugwuja, E. I. (2017). Association of Blood and Seminal Plasma Cadmium and Lead Levels with Semen Quality in Non-Occupationally Exposed Infertile Men in Abakaliki, South East Nigeria. *Journal of family & reproductive health*, 11(2), 97–103.

Foresta, C., Garolla, A., Cosci, I., Menegazzo, M., Ferigo, M., Gandin, V., & De Toni, L. (2014). Role of zinc trafficking in male fertility: from germ to sperm. *Human reproduction (Oxford, England)*, 29(6), 1134–1145.

Frenette, G., & Sullivan, R. (2001). Protasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Molecular reproduction and development*, 59(1), 115–121.

Fu, Z., & Xi, S. (2020). The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicology mechanisms and methods*, 30(3), 167–176.

Gabrielsen J, Lipshultz L, Lamb D. (2018). MP43-02 Serum cadmium levels predict erectile dysfunction in men. *J Urol*;199(4): e580.

Gandhi, J., Hernandez, R. J., Chen, A., Smith, N. L., Sheynkin, Y. R., Joshi, G., & Khan, S. A. (2017). Impaired hypothalamic-pituitary-testicular axis activity, spermatogenesis, and sperm function promote infertility in males with lead poisoning. *Zygote (Cambridge, England)*, 25(2), 103–110.

Gangwar, D. K., & Atreja, S. K. (2015). Signalling Events and Associated Pathways Related to the Mammalian Sperm Capacitation. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 50(5), 705–711.

Gao, H. T., Di, Q. N., Qian, L. L., Lu, L., Li, R. X., Cao, W. X., & Xu, Q. (2020). Zinc supplement ameliorates phthalates-induced reproductive toxicity in male rats. *Chemosphere*, 246, 125828.

Geissmann, F., Gordon, S., Hume, D. A., Mowat, A. M., & Randolph, G. J. (2010). Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nature reviews. Immunology*, 10(6), 453–460.

Genuis, S. J., & Kyrillos, E. (2017). The chemical disruption of human metabolism. *Toxicology mechanisms and methods*, 27(7), 477–500.

Gervasi, M. G., & Visconti, P. E. (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology*, 5(2), 204–218.

Girouard, J., Frenette, G., & Sullivan, R. (2011). Comparative proteome and lipid profiles of bovine epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the caput and cauda epididymidis. *International journal of andrology*, 34(5 Pt 2), e475–e486.

Griswold, M. D. (2018). 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells. *Biology of reproduction*, 99(1), 87–100.

Guiton, R., Henry-Berger, J., Drevet, J. R. (2013). The immunobiology of the mammalian epididymis: the black box is now open! *Basic Clin Androl*. 23:8.

GUNN, S. A., GOULD, T. C., & ANDERSON, W. A. (1963). The selective injurious response of testicular and epididymal blood vessels to cadmium and its prevention by zinc. *The American journal of pathology*, 42(6), 685–702.

Ha, K. N., Chen, Y., Cai, J., & Sternberg, P., Jr (2006). Increased glutathione synthesis through an ARE-Nrf2-dependent pathway by zinc in the RPE: implication for protection against oxidative stress. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(6), 2709–2715.

Hai, Y., Hou, J., Liu, Y., Liu, Y., Yang, H., Li, Z., & He, Z. (2014). The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, 29, 66–75.

Henkel, R., Baldauf, C., & Schill, W. B. (2003). Resorption of the element zinc from spermatozoa by the epididymal epithelium. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 38(2), 97–101.

Henson, M. C., & Chedrese, P. J. (2004). Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 229(5), 383–392.

Herak-Kramberger, C. M., Sabolić, I., Blanusa, M., Smith, P. J., Brown, D., & Breton, S. (2000). Cadmium inhibits vacuolar H (+) ATPase-mediated acidification in the rat epididymis. *Biology of reproduction*, 63(2), 599–606.

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.

Hess R. (2002). The Efferent Ducts: Structure and Functions. in the epididymis. From Molecules to Clinical Practice (eds B Robaire and BT Hinton), pp. 49 - 80 . Kluwer Academic/Plenum, New York.

Holstein, A. F., Schulze, W., & Davidoff, M. (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 1, 107.

Hu, S. G., Zou, M., Yao, G. X., Ma, W. B., Zhu, Q. L., Li, X. Q., Chen, Z. J., & Sun, Y. (2014). Androgenic regulation of beta-defensins in the mouse epididymis. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 12, 76.

Huang T, Yan G, Guan M. (2020). Zinc Homeostasis in Bone: Zinc Transporters and Bone Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 12;21(4):1236.

Hübner C, Haase H. (2021). Interactions of zinc- and redox-signaling pathways. *Redox Biol.* May;41:101916.

Ishizuka, M., Ohtsuka, E., Inoue, A., Odaka, M., Ohshima, H., Tamura, N., Yoshida, K., Sako, N., Baba, T., Kashiwabara, S., Okabe, M., Noguchi, J., & Hagiwara, H. (2016). Abnormal spermatogenesis and male infertility in testicular zinc finger protein Zfp318-knockout mice. *Development, growth & differentiation*, 58(7), 600–608.

Jalón Monzón, A., Martín Benito, J.L., Álvarez Múgica, M., García Rodríguez, J., Fernández Gómez, J.M., Viña Alonso, L., Jalón Monzón, M. (2006). Infertilidad masculina. *SEMERGEN - Medicina de Familia*, Volume 32, Issue 5, 223-232.

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.

Jarosz, M., Olbert, M., Wyszogrodzka, G., Młyniec, K., & Librowski, T. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF-κB signaling. *Inflammopharmacology*, 25(1), 11–24.

Jeng, H. A., Huang, Y. L., Pan, C. H., & Diawara, N. (2015). Role of low exposure to metals as male reproductive toxicants. *International journal of environmental health research*, 25(4), 405–417.

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

Johnsen S. G. (1970). Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, 1(1), 2–25.

Jurowski, K., Szewczyk, B., Nowak, G., & Piekoszewski, W. (2014). Biological consequences of zinc deficiency in the pathomechanisms of selected diseases. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 19(7), 1069–1079.

Kambe T., Geiser J., Lahner B., Salt D.E., Andrews G.K. (2008). Slc39a1 to 3 (subfamily II) Zip genes in mice have unique cell-specific functions during adaptation to zinc deficiency. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294: R1474–R1481.

Kambe, T., Hashimoto, A., & Fujimoto, S. (2014). Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 71(17), 3281–3295.

Kaur, G., Thompson, L. A., & Dufour, J. M. (2014). Sertoli cells--immunological sentinels of spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, 30, 36–44.

Kawakami, T., Sugimoto, H., Furuichi, R., Kadota, Y., Inoue, M., Setsu, K., Suzuki, S., & Sato, M. (2010). Cadmium reduces adipocyte size and expression levels of adiponectin and Peg1/Mest in adipose tissue. *Toxicology*, 267(1-3), 20–26.

Kerns, K., Zigo, M., & Sutovsky, P. (2018). Zinc: A Necessary Ion for Mammalian Sperm Fertilization Competency. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 4097.

Kerns, K., Zigo, M., Drobnis, E. Z., Sutovsky, M., & Sutovsky, P. (2018). Zinc ion flux during mammalian sperm capacitation. *Nature communications*, 9(1), 2061.

Khorami, H., Eidi, A., Mortazavi, P., & Modaresi, M. (2020). Effect of sodium molybdate on cadmium-related testicular damage in adult male Wistar rats. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 62, 126621.

Kimura, T., & Kambe, T. (2016). The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspective. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 336.

Kirchhoff, C., & Hale, G. (1996). Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Molecular human reproduction*, 2(3), 177–184.

Kothari, R. P., & Chaudhari, A. R. (2016). Zinc Levels in Seminal Fluid in Infertile Males and its Relation with Serum Free Testosterone. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 10(5), CC05–CC8.

Krapf, D., Ruan, Y. C., Wertheimer, E. V., Battistone, M. A., Pawlak, J. B., Sanjay, A., Pilder, S. H., Cuasnicu, P., Breton, S., & Visconti, P. E. (2012). cSrc is necessary for epididymal development and is incorporated into sperm during epididymal transit. *Developmental biology*, 369(1), 43–53.

Krzastek, S. C., Farhi, J., Gray, M., & Smith, R. P. (2020). Impact of environmental toxin exposure on male fertility potential. *Translational andrology and urology*, 9(6), 2797–2813.

Kumar, S., & Sharma, A. (2019). Cadmium toxicity: effects on human reproduction and fertility. *Reviews on environmental health*, 34(4), 327–338.

La Vignera, S., Condorelli, R. A., Vicari, E., Lotti, F., Favilla, V., Morgia, G., Maggi, M., & Calogero, A. E. (2013). Seminal vesicles and diabetic neuropathy: ultrasound evaluation after prolonged treatment with a selective phosphodiesterase-5 inhibitor. *Andrology*, 1(2), 245–250.

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.

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.

Lee, J.M., Johnson, J.A. (2004) An important role of Nrf2- ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 37:139-143.

Lee, S. R. (2018). Critical Role of Zinc as Either an Antioxidant or a Prooxidant in Cellular Systems. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 9156285.

Leung, G. P., Cheung, K. H., Leung, C. T., Tsang, M. W., & Wong, P. Y. (2004). Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Molecular and cellular endocrinology*, 216(1-2), 5–13.

Levaot, N., & Hershinkel, M. (2018). How cellular Zn<sup>2+</sup> signaling drives physiological functions. *Cell calcium*, 75, 53–63.

Li, X., Liu, J., Wu, S., Zheng, W., Li, H., Bao, S., Chen, Y., Guo, X., Zhang, L., & Ge, R. S. (2018). In utero single low-dose exposure of cadmium induces rat fetal Leydig cell dysfunction. *Chemosphere*, 194, 57–66.

Li, Z., Li, Y., Zhou, X., Cao, Y., & Li, C. (2017). Preventive effects of supplemental dietary zinc on heat-induced damage in the epididymis of boars. *Journal of thermal biology*, 64, 58–66.

Lichten, L. A., & Cousins, R. J. (2009). Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annual review of nutrition*, 29, 153–176.

Liu, J., Qu, W., & Kadiiska, M. B. (2009). Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and applied pharmacology*, 238(3), 209–214.

Liu, X. R., Wang, Y. Y., Fan, H. R., Wu, C. J., Kumar, A., & Yang, L. G. (2016). Preventive effects of  $\beta$ -cryptoxanthin against cadmium-induced oxidative stress in the rat testis. *Asian journal of andrology*, 18(6), 920–924.

Loveland K, Schlatt S. (1997). Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: lessons originating from Mother Nature's gene knockouts. *Endocrinol*; 153(3):337-44.

Lu, Q., Haragopal, H., Slepchenko, K. G., Stork, C., & Li, Y. V. (2016). Intracellular zinc distribution in mitochondria, ER and the Golgi apparatus. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*, 8(1), 35–43.

Luca, G., Lilli, C., Bellucci, C., Mancuso, F., Calvitti, M., Arato, I., Falabella, G., Giovagnoli, S., Aglietti, M. C., Lumare, A., Muzi, G., Calafiore, R., & Bodo, M. (2013). Toxicity of cadmium on Sertoli cell functional competence: an in vitro study. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 27(3), 805–816.

Machado-Neves M. (2021). Effect of heavy metals on epididymal morphology and function: An integrative review. *Chemosphere*, 133020. Advance online publication.

Mahmoudi, R., Azizi, A., Abedini, S., Hemayatkhah Jahromi, V., Abidi, H., & Jafari Barmak, M. (2018). Green tea improves rat sperm quality and reduced cadmium chloride damage effect in spermatogenesis cycle. *Journal of medicine and life*, 11(4), 371–380.

Maldera, J. A., Vasen, G., Ernesto, J. I., Weigel-Muñoz, M., Cohen, D. J., & Cuasnicu, P. S. (2011). Evidence for the involvement of zinc in the association of CRISP1 with rat sperm during epididymal maturation. *Biology of reproduction*, 85(3), 503–510.

Mandon, M., Hermo, L., & Cyr, D. G. (2015). Isolated Rat Epididymal Basal Cells Share Common Properties with Adult Stem Cells. *Biology of reproduction*, 93(5), 115.

Maremanda, K. P., & Jena, G. B. (2017). Methotrexate-induced germ cell toxicity and the important role of zinc and SOD1: Investigation of molecular

mechanisms. *Biochemical and biophysical research communications*, 483(1), 596–601.

Maremanda, K. P., Khan, S., & Jena, G. B. (2016). Role of Zinc Supplementation in Testicular and Epididymal Damages in Diabetic Rat: Involvement of Nrf2, SOD1, and GPX5. *Biological trace element research*, 173(2), 452–464.

Maret, W. (2019). The redox biology of redox-inert zinc ions. *Free radical biology & medicine*, 134, 311–326.

Marettová, E., Mareta, M., & Legáth, J. (2010). Changes in the peritubular tissue of rat testis after cadmium treatment. *Biological trace element research*, 134(3), 288–295.

Marreiro, D. D., Cruz, K. J., Morais, J. B., Beserra, J. B., Severo, J. S., & de Oliveira, A. R. (2017). Zinc and Oxidative Stress: Current Mechanisms. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 6(2), 24.

Maxel, T., Smidt, K., Larsen, A., Bennetzen, M., Cullberg, K., Fjeldborg, K., Lund, S., Pedersen, S. B., & Rungby, J. (2015). Gene expression of the zinc transporter ZIP14 (SLC39a14) is affected by weight loss and metabolic status and associates with PPAR $\gamma$  in human adipose tissue and 3T3-L1 pre-adipocytes. *BMC obesity*, 2, 46.

Mínguez-Alarcón, L., Mendiola, J., Roca, M., López-Espín, J. J., Guillén, J. J., Moreno, J. M., Moreno-Grau, S., Martínez-García, M. J., Vergara-Juárez, N., Elvira-Rendueles, B., García-Sánchez, A., Ten, J., Bernabeu, R., & Torres-Cantero, A. M. (2012). Correlations between Different Heavy Metals in Diverse Body Fluids: Studies of Human Semen Quality. *Advances in urology*. 420893.

Minutoli, L., Micali, A., Pisani, A., Puzzolo, D., Bitto, A., Rinaldi, M., Pizzino, G., Irrera, N., Galfo, F., Arena, S., Pallio, G., Mecchio, A., Germanà, A., Bruschetta, D., Laurà, R., Magno, C., Marini, H., Squadrito, F., & Altavilla, D. (2015). Flavocoxid Protects Against Cadmium-Induced Disruption of the Blood–Testis Barrier and Improves Testicular Damage and Germ Cell Impairment in Mice [corrected]. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 148(1), 311–329.

Mirnamniha, M., Faroughi, F., Tahmasbpour, E., Ebrahimi, P., & Beigi Harchegani, A. (2019). An overview on role of some trace elements in human reproductive health, sperm function and fertilization process. *Reviews on environmental health*, 34(4), 339–348.



Miyoshi Y, Tanabe S, Suzuki T. (2016). Cellular zinc is required for intestinal epithelial barrier maintenance via the regulation of claudin-3 and occludin expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1;311(1): G105-16.

Mohamed, D. A., & Abdelrahman, S. A. (2019). The possible protective role of zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) on testicular and epididymal structure and sperm parameters in nicotine-treated adult rats (a histological and biochemical study). *Cell and tissue research*, 375(2), 543–558.

Mouro, V., Martins, A., Silva, J., Menezes, T. P., Gomes, M., Oliveira, J. A., Melo, F., & Matta, S. (2019). Subacute Testicular Toxicity to Cadmium Exposure Intraperitoneally and Orally. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 3429635.

Napoli, E., Ross-Inta, C., Wong, S., Omanska-Klusek, A., Barrow, C., Iwahashi, C., Garcia-Arocena, D., Sakaguchi, D., Berry-Kravis, E., Hagerman, R., Hagerman, P. J., & Giulivi, C. (2011). Altered zinc transport disrupts mitochondrial protein processing/import in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Human molecular genetics*, 20(15), 3079–3092.

Nemmiche S. (2017). Oxidative Signaling Response to Cadmium Exposure. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 156(1), 4–10.

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.

Noblanc, A., Kocer, A., & Drevet, J. R. (2012). Protection post-testiculaire des gamètes mâles contre les dommages radicalaires: le rôle de l'épididyme [Post-testicular protection of male gametes from oxidative damage. The role of the epididymis]. *Medecine sciences: M/S*, 28(5), 519–525.

O'Dell B. L. (2000). Role of zinc in plasma membrane function. *The Journal of nutrition*, 130(5S Suppl), 1432S–6S.

O'Donnell L. (2015). Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis*, 4(2), e979623.

O'Flaherty C. (2019). Orchestrating the antioxidant defenses in the epididymis. *Andrology*, 7(5), 662–668.

Olayo-Lortia, J., Ferreira-Nuño, A., Morales-Otal, A. (2015). The multiple partner choice arena: An innovative model for studying rapid ejaculation in rats. *Rev Mex Neuroci*, 16(2): 16-26.

Olesen, I. A., Joensen, U. N., Petersen, J. H., Almstrup, K., Rajpert-De Meyts, E., Carlsen, E., McLachlan, R., Juul, A., & Jørgensen, N. (2018). Decrease in semen quality and Leydig cell function in infertile men: a longitudinal study. *Human reproduction (Oxford, England)*, 33(11), 1963–1974.

Omu, A. E., Al-Azemi, M. K., Al-Maghrebi, M., Mathew, C. T., Omu, F. E., Kehinde, E. O., Anim, J. T., Oriowo, M. A., & Memon, A. (2015). Molecular basis for the effects of zinc deficiency on spermatogenesis: An experimental study in the Sprague-dawley rat model. *Indian journal of urology: IJU: journal of the Urological Society of India*, 31(1), 57–64.

Othmman, M. S., Nada, A., Zaki, H. S., & Moneim, A. E. A. (2014). Effect of *Physalis peruviana* L. on cadmium-induced testicular toxicity in rats. *Biological Trace Element Research*, 159, 278–287.

Ozturk, A., Baltaci, A.K., Mogulkoc, R., Oztekin, E., & Kul, A. (2005). The effects of zinc deficiency and testosterone supplementation on leptin levels in castrated rats and their relation with LH, FSH and testosterone. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 26: 548-554.

Pandurangan, M., Jin, B.Y., & Kim, D.H. (2016). ZnO nanoparticles positively regulate adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Biological Trace Element Research*, 170 (1), 201-207.

Pandya, C., Pillai, P., Nampoothiri, L. P., Bhatt, N., Gupta, S., & Gupta, S. (2012). Effect of lead and cadmium co-exposure on testicular steroid metabolism and antioxidant system of adult male rats. *Andrologia*, 44 Suppl 1, 813–822.

PARIZEK J. (1957). The destructive effect of cadmium ion on testicular tissue and its prevention by zinc. *J Endocrinol.*15(1):56-63.

Păunescu, T. G., Shum, W. W., Huynh, C., Lechner, L., Goetze, B., Brown, D., & Breton, S. (2014). High-resolution helium ion microscopy of epididymal epithelial cells and their interaction with spermatozoa. *Molecular human reproduction*, 20(10), 929–937.

Pérez Díaz, M., Plateo Pignatari, M. G., Filippa, V. P., Mohamed, F. H., Marchevsky, E. J., Gimenez, M. S., & Ramirez, D. C. (2019). A soybean-based diet modulates cadmium-induced vascular apoptosis. *Journal of trace elements in*

*medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 52, 239–246.

Picut CA, Ziejewski MK, Stanislaus D. (2018). Comparative Aspects of Pre- and Postnatal Development of the Male Reproductive System. *Birth Defects Res*;110(3):190-227.

Plant T. M. (2015). 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *The Journal of endocrinology*, 226(2), T41–T54.

Plum, L. M., Rink, L., & Haase, H. (2010). The essential toxin: impact of zinc on human health. *International journal of environmental research and public health*, 7(4), 1342–1365.

Plunk, E. C., & Richards, S. M. (2020). Endocrine-Disrupting Air Pollutants and Their Effects on the Hypothalamus-Pituitary-Gonadal Axis. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 9191.

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.

Pourhassanali, N., Roshan-Milani, S., Kheradmand, F., Motazakker, M., Bagheri, M., & Saboory, E. (2016). Zinc attenuates ethanol-induced Sertoli cell toxicity and apoptosis through caspase-3 mediated pathways. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 61, 97–103.

Prasad A. S. (2013). Discovery of human zinc deficiency: its impact on human health and disease. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 4(2), 176–190.

Prasad A. S. (2014). Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 28(4), 357–363.

Prasad A. S. (2014b). Zinc is an Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent: Its Role in Human Health. *Frontiers in nutrition*, 1, 14.

Predez, F., Diamante, M. A., Foglio, M. A., & Dolder, H. (2016). Effects of *Arctium lappa* on Cadmium-Induced Damage to the Testis and Epididymis of Adult Wistar Rats. *Biological trace element research*, 173(2), 362–371.

Prozialeck, W. C., Edwards, J. R., & Woods, J. M. (2006). The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life sciences*, 79(16), 1493–1506.

Prozialeck, W. C., Edwards, J. R., Nebert, D. W., Woods, J. M., Barchowsky, A., & Atchison, W. D. (2008). The vascular system as a target of metal toxicity. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 102(2), 207–218.

Rahman MM, Ukiana J, Uson-Lopez R, Sikder MT, Saito T, Kurasaki M. (2017). Cytotoxic effects of cadmium and zinc co-exposure in PC12 cells and the underlying mechanism. *Chem Biol Interact.* 269:41-49.

Rajendar, B., Bharavi, K., Rao, G. S., Kishore, P. V., Kumar, P. R., Kumar, C. S., & Kumar, D. S. (2011). Protective effect of alpha-tocopherol on biochemical and histological alterations induced by cadmium in rat testes. *Indian journal of physiology and pharmacology*, 55(3), 213–220.

Ramos-Treviño, J., Bassol-Mayagoitia, S., Hernández-Ibarra, J. A., Ruiz-Flores, P., & Nava-Hernández, M. P. (2018). Toxic Effect of Cadmium, Lead, and Arsenic on the Sertoli Cell: Mechanisms of Damage Involved. *DNA and cell biology*, 37(7), 600–608.

Rani, A., Kumar, A., Lal, A., & Pant, M. (2014). Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *International journal of environmental health research*, 24(4), 378–399.

Razavi, S., Khadivi, F., Hashemi, F., & Bakhtiari, A. (2019). Effect of Zinc on Spermatogenesis and Sperm Chromatin Condensation in Bleomycin, Etoposide, Cisplatin Treated Rats. *Cell journal*, 20(4), 521–526.

Rehman, K., Fatima, F., Waheed, I., & Akash, M. (2018). Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *Journal of cellular biochemistry*, 119(1), 157–184.

Renne, A., Luo, L., Jarow, J., Wright, W. W., Brown, T. R., Chen, H., Zirkin, B. R., & Friesen, M. D. (2012). Simultaneous quantification of steroids in rat intratesticular fluid by HPLC-isotope dilution tandem mass spectrometry. *Journal of andrology*, 33(4), 691–698.

Rinaldi, V. D., Donnard, E., Gellatly, K., Rasmussen, M., Kucukural, A., Yukselen, O., Garber, M., Sharma, U., & Rando, O. J. (2020). An atlas of cell types in the mouse epididymis and vas deferens. *eLife*, 9, e55474.

Roan, N. R., Liu, H., Usmani, S. M., Neidleman, J., Müller, J. A., Avila-Herrera, A., Gawanbacht, A., Zirafi, O., Chu, S., Dong, M., Kumar, S. T., Smith, J. F., Pollard, K. S., Fändrich, M., Kirchhoff, F., Münch, J., Witkowska, H. E., & Greene, W. C. (2014). Liquefaction of semen generates and later degrades a conserved semenogelin peptide that enhances HIV infection. *Journal of virology*, *88*(13), 7221–7234.

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

Robaire, B., & Hamzeh, M. (2011). Androgen action in the epididymis. *Journal of andrology*, *32*(6), 592–599.

Rodríguez J, Mandalunis PM. (2016). Effect of cadmium on bone tissue in growing animals. *Exp Toxicol Pathol.* *68*(7):391-7.

Roscioli, E., Hamon, R., Lester, S., Murgia, C., Grant, J., & Zalewski, P. (2013). Zinc-rich inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) as regulatory factors in the epithelium of normal and inflamed airways. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, *26*(2), 205–227.

Ruan, Y. C., Shum, W. W., Belleannée, C., Da Silva, N., & Breton, S. (2012). ATP secretion in the male reproductive tract: essential role of CFTR. *The Journal of physiology*, *590*(17), 4209–4222.

Sadik N. A. (2008). Effects of diallyl sulfide and zinc on testicular steroidogenesis in cadmium-treated male rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, *22*(5), 345–353.

Sahu, C., Dwivedi, D. K., & Jena, G. B. (2020). Zinc and selenium combination treatment protected diabetes-induced testicular and epididymal damage in rat. *Human & experimental toxicology*, *39*(9), 1235–1256.

Saïd, L., Banni, M., Kerkeni, A., Saïd, K., & Messaoudi, I. (2010). Influence of combined treatment with zinc and selenium on cadmium induced testicular pathophysiology in rat. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, *48*(10), 2759–2765.

Scarlata, E., & O'Flaherty, C. (2020). Antioxidant Enzymes and Male Fertility: Lessons from Knockout Models. *Antioxidants & redox signaling*, *32*(8), 569–580.

Sen Gupta, R., Sen Gupta, E., Dhakal, B. K., Thakur, A. R., & Ahnn, J. (2004). Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. *Molecules and cells*, *17*(1), 132–139.

Serre, V., & Robaire, B. (1998). Segment-specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis. *Biology of reproduction*, *58*(2), 497–513.

Setchell B. P. (2008). Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis. *Advances in experimental medicine and biology*, *636*, 212–233.

Sharma, U., Conine, C. C., Shea, J. M., Boskovic, A., Derr, A. G., Bing, X. Y., Belleannee, C., Kucukural, A., Serra, R. W., Sun, F., Song, L., Carone, B. R., Ricci, E. P., Li, X. Z., Fauquier, L., Moore, M. J., Sullivan, R., Mello, C. C., Garber, M., & Rando, O. J. (2016). Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science (New York, N.Y.)*, *351*(6271), 391–396.

Sheng, J., Gadella, B. M., Orlachs, N. K., Kaloyanova, D. V., & Helms, J. B. (2021). The less conserved metal-binding site in human CRISP1 remains sensitive to zinc ions to permit protein oligomerization. *Scientific reports*, *11*(1), 5498.

Shi, X., & Fu, L. (2019). Piceatannol inhibits oxidative stress through modification of Nrf2-signaling pathway in testes and attenuates spermatogenesis and steroidogenesis in rats exposed to cadmium during adulthood. *Drug Design, Development and Therapy*, *13*, 2811–2824.

Shum, W. W., Da Silva, N., Belleannée, C., McKee, M., Brown, D., & Breton, S. (2011). Regulation of V-ATPase recycling via a RhoA- and ROCKII-dependent pathway in epididymal clear cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, *301*(1), C31–C43.

Shum, W. W., Da Silva, N., McKee, M., Smith, P. J., Brown, D., & Breton, S. (2008). Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell*, *135*(6), 1108–1117.

Shum, W. W., Smith, T. B., Cortez-Retamozo, V., Grigoryeva, L. S., Roy, J. W., Hill, E., Pittet, M. J., Breton, S., & Da Silva, N. (2014). Epithelial basal cells are distinct from dendritic cells and macrophages in the mouse epididymis. *Biology of reproduction*, *90*(5), 90.

Siddiqui W.A., Ahad A., Ahsan H. (2015). The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: An update. *Arch. Toxicol.* *89*:289–317.

Sinclair A. (1994). The cloning of SRY. In: Wachtel SS, editor. *Molecular genetics of sex determination*. New York: Academic Press. pp. 23–40.

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.

Siu, E. R., Wong, E. W., Mruk, D. D., Porto, C. S., & Cheng, C. Y. (2009b). Focal adhesion kinase is a blood-testis barrier regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(23), 9298–9303.

Skalny, A. V., Aschner, M., & Tinkov, A. A. (2021). Zinc. *Advances in food and nutrition research*, 96, 251–310.

Skoracka, K., Eder, P., Łykowska-Szuber, L., Dobrowolska, A., & Krela-Kaźmierczak, I. (2020). Diet and Nutritional Factors in Male (In)fertility-Underestimated Factors. *Journal of clinical medicine*, 9(5), 1400.

Smith, L. B., & Walker, W. H. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in cell & developmental biology*, 30, 2–13.

Sullivan R. (2015). Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. *Asian journal of andrology*, 17(5), 726–729.

Sullivan R. (2016). Epididymosomes: Role of extracellular microvesicles in sperm maturation. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 8, 106–114.

Sullivan, R., & Belleannee, C. (2018) Cell biology of the epididymis. In: *Reproduction Encyclopedia*, 2nd edn (Eds B Jegou and M Skinner), pp. 286-291. Elsevier, New York, NY, USA. USA.

Sullivan, R., & Mieusset, R. (2016). The human epididymis: its function in sperm maturation. *Human reproduction update*, 22(5), 574–587.

Sullivan, R., & Saez, F. (2013). Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction (Cambridge, England)*, 146(1), R21–R35.

Sullivan, R., Frenette, G., & Girouard, J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian journal of andrology*, 9(4), 483–491.

Sullivan, R., Légaré, C., Lamontagne-Proulx, J., Breton, S., & Soulet, D. (2019). Revisiting structure/functions of the human epididymis. *Andrology*, 7(5), 748–757.

Svechnikov, K., Landreh, L., Weisser, J., Izzo, G., Colón, E., Svechnikova, I., & Söder, O. (2010). Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Hormone research in paediatrics*, 73(2), 93–101.

Tang, E. I., Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2016). Regulation of microtubule (MT)-based cytoskeleton in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, 59, 35–45.

Tang, L., Qiu, R., Tang, Y., & Wang, S. (2014). Cadmium-zinc exchange and their binary relationship in the structure of Zn-related proteins: a mini review. *Metallomics: integrated biometal science*, 6(8), 1313–1323.

Tate, D. J., Jr, Miceli, M. V., & Newsome, D. A. (1997). Zinc induces catalase expression in cultured fetal human retinal pigment epithelial cells. *Current eye research*, 16(10), 1017–1023.

Taylor, A. B., Smith, B. S., Kitada, S., Kojima, K., Miyaura, H., Otwinowski, Z., Ito, A., & Deisenhofer, J. (2001). Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences. *Structure (London, England: 1993)*, 9(7), 615–625.

Taylor, A., Robson, A., Houghton, B. C., Jepson, C. A., Ford, W. C., & Frayne, J. (2013). Epididymal specific, selenium-independent GPX5 protects cells from oxidative stress-induced lipid peroxidation and DNA mutation. *Human reproduction (Oxford, England)*, 28(9), 2332–2342.

Teclé, E., & Gagneux, P. (2015). Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Molecular reproduction and development*, 82(9), 635–650.

Thévenod F. (2009). Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicology and applied pharmacology*, 238(3), 221–239.

Thévenod, F., Fels, J., Lee, W. K., & Zarbock, R. (2019). Channels, transporters and receptors for cadmium and cadmium complexes in eukaryotic cells: myths and facts. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 32(3), 469–489.

Thévenod, F., Lee, W. K., & Garrick, M. D. (2020). Iron and Cadmium Entry Into Renal Mitochondria: Physiological and Toxicological Implications. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 848.



Thévenod, F., Lee, W. K., & Garrick, M. D. (2021). Corrigendum: Iron and Cadmium Entry Into Renal Mitochondria: Physiological and Toxicological Implications. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 687810.

Thimon, V., Frenette, G., Saez, F., Thabet, M., & Sullivan, R. (2008). Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. *Human reproduction (Oxford, England)*, 23(8), 1698–1707.

Thomas, P., Converse, A., & Berg, H. A. (2018). ZIP9, a novel membrane androgen receptor and zinc transporter protein. *General and comparative endocrinology*, 257, 130–136.

Tian, H., Chen, S., Leng, Y., Li, T., Li, Z., Chen, H., & Zhang, Q. (2018). Exposure to cadmium during gestation and lactation affects development and function of Leydig cells in male offspring. *Environmental toxicology*, 33(3), 351–360.

Tournade A. (1913). Différence de motilité des spermatozoides prélevés dans les divers segments de l'épididyme. *CR Soc Biol.* 1913; 74: 738–739.

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.

Tulsiani, D. R., & Abou-Haila, A. (2012). Biological Processes that Prepare Mammalian Spermatozoa to Interact with an Egg and Fertilize It. *Scientifica*. 607427.

Tuncay, G., Karaer, A., Tanrikut, E., & Ozgul, O. (2021). The effect of seminal plasma cadmium and lead levels on semen parameters in male subjects of infertile couples: a prospective cohort study. *Journal of obstetrics and gynaecology: the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, 41(6), 946–950.

Vallee, B. L., & Auld, D. S. (1992). Functional zinc-binding motifs in enzymes and DNA-binding proteins. *Faraday discussions*, (93), 47–65.

Vallee, B. L., & Falchuk, K. H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological reviews*, 73(1), 79–118.

Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical biochemistry*, 62, 2–10.

Vickram, S., Rohini, K., Srinivasan, S., Nancy Veenakumari, D., Archana, K., Anbarasu, K., Jeyanthi, P., Thanigaivel, S., Gulothungan, G., Rajendiran, N., &

Vigueras-Villaseñor R.M, Molina-Ortiz D, Reyes-Torresa G, Del Ángel D.S, Morena-Mendoza NA, Garcia cruza M.E, Cuevas-Alpuchea O, Rojas Castañedas J.C (2008). Effect of allopurinol on damage caused by free radicals to cryptorchid testes. *Acta histochemical* 111 (2009) 127—137.

Srikumar, P. S. (2021). Role of Zinc (Zn) in Human Reproduction: A Journey from Initial Spermatogenesis to Childbirth. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 2188.

Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*. 192:95–117.

Wan, H. T., Mruk, D. D., Tang, E. I., Xiao, X., Cheng, Y. H., Wong, E. W., Wong, C. K., & Cheng, C. Y. (2014). Role of non-receptor protein tyrosine kinases in spermatid transport during spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, 30, 65–74.

Wang, D., Kamijima, M., Okamura, A., Ito, Y., Yanagiba, Y., Jia, X. F., Naito, H., Ueyama, J., & Nakajima, T. (2012). Evidence for diazinon-mediated inhibition of cispermethrin metabolism and its effects on reproductive toxicity in adult male mice. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 34(4), 489–497.

Wang, J., Zhu, H., Wang, K., Yang, Z., & Liu, Z. (2020). Protective effect of quercetin on rat testes against cadmium toxicity by alleviating oxidative stress and autophagy. *Environmental science and pollution research international*, 27(20), 25278–25286.

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

Wang, L., Xu, T., Lei, W. W., Liu, D. W., Li, Y. J., Xuan, R. J., & Ma, J. J. (2011). Cadmium-induced oxidative stress and apoptotic changes in the testis of freshwater crab, *Sinopotamon henanense*. *PLoS ONE*, 6(11), e27853.

Wani AL, Parveen N., Ansari MO, Ahmad MF, Ja-meel S., Shadab G. (2017). Zinc: An element of great medical importance. *Curr. Medicina. Res. Pract*, 7: 90–98.

Wen, Q., Tang, E. I., Xiao, X., Gao, Y., Chu, D. S., Mruk, D. D., Silvestrini, B., & Cheng, C. Y. (2016). Transport of germ cells across the seminiferous epithelium during spermatogenesis-the involvement of both actin- and microtubule-based cytoskeletons. *Tissue barriers*, 4(4), e1265042.

Wessels, I., Maywald, M., & Rink, L. (2017). Zinc as a Gatekeeper of Immune Function. *Nutrients*, 9(12), 1286.

Wong, W. Y., Flik, G., Groenen, P. M., Swinkels, D. W., Thomas, C. M., Copius-Peereboom, J. H., Merkus, H. M., & Steegers-Theunissen, R. P. (2001). The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 15(2), 131–136.

World Health Organization. WHO, (2010). Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th Ed. Geneva: World Health Organization.

World Health Organization. WHO, (2019) . Preventing disease through healthy environments: exposure to cadmium: a major public health concern. World Health Organization.

Xiao, X., Mruk, D. D., Cheng, F. L., & Cheng, C. Y. (2012). C-Src and c-Yes are two unlikely partners of spermatogenesis and their roles in blood-testis barrier dynamics. *Advances in experimental medicine and biology*, 763, 295–317.

Xiao, X., Mruk, D. D., Tang, E. I., Wong, C. K., Lee, W. M., John, C. M., Turek, P. J., Silvestrini, B., & Cheng, C. Y. (2014). Environmental toxicants perturb human Sertoli cell adhesive function via changes in F-actin organization mediated by actin regulatory proteins. *Human reproduction (Oxford, England)*, 29(6), 1279–1291.

Xiong, Y., Li, J., & He, S. (2021). Zinc Protects against Heat Stress-Induced Apoptosis via the Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress in TM3 Leydig Cells. *Biological trace element research*, 10.1007/s12011-021-02673-7. Advance online publication.

Yamaguchi, S., Miura, C., Kikuchi, K., Celino, F. T., Agusa, T., Tanabe, S., & Miura, T. (2009). Zinc is an essential trace element for spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(26), 10859–10864.

Yan, M., Li, L., Mao, B., Li, H., Li, S., Mruk, D., Silvestrini, B., Lian, Q., Ge, R., & Cheng, C. Y. (2019). mTORC1/rpS6 signaling complex modifies BTB transport function: an in vivo study using the adjuvin model. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 317(1), E121–E138.

Ye, L., Li, X., Li, L., Chen, H., & Ge, R. S. (2017). Insights into the Development of the Adult Leydig Cell Lineage from Stem Leydig Cells. *Frontiers in physiology*, 8, 430.

Ye, S. J., Ying, L., Ghosh, S., de França, L. R., & Russell, L. D. (1993). Sertoli cell cycle: a re-examination of the structural changes during the cycle of the seminiferous epithelium of the rat. *The Anatomical record*, 237(2), 187–198.

You, X., Wei, L., Fan, S., Yang, W., Liu, X., Wang, G., Man, Y., Pan, Z., & Feng, W. (2017). Expression pattern of Zinc finger protein 185 in mouse testis and its role in regulation of testosterone secretion. *Molecular medicine reports*, 16(2), 2101–2106.

Yu, H. T., Zhen, J., Leng, J. Y., Cai, L., Ji, H. L., & Keller, B. B. (2021). Zinc as a countermeasure for cadmium toxicity. *Acta pharmacologica Sinica*, 42(3), 340–346.

Yuyan, L., Junqing, W., Wei, Y., Weijin, Z., & Ersheng, G. (2008). Are serum zinc and copper levels related to semen quality? *Fertility and sterility*, 89(4), 1008–1011.

Zhang, M., He, Z., Wen, L., Wu, J., Yuan, L., Lu, Y., Guo, C., Zhu, L., Deng, S., & Yuan, H. (2010). Cadmium suppresses the proliferation of piglet Sertoli cells and causes their DNA damage, cell apoptosis and aberrant ultrastructure. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 8, 97.

Zhang, X., Guan, T., Yang, B., Chi, Z., Wang, Z. Y., & Gu, H. F. (2018). A novel role for zinc transporter 8 in the facilitation of zinc accumulation and regulation of testosterone synthesis in Leydig cells of human and mouse testicles. *Metabolism: clinical and experimental*, 88, 40–50.

Zhang, Y., & Zheng, J. (2020). Bioinformatics of Metalloproteins and Metalloproteomes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(15), 3366.

Zhang, Y., Li, Y., Zhang, J., Qi, X., Cui, Y., Yin, K., & Lin, H. (2021). Cadmium induced inflammation and apoptosis of porcine epididymis via activating RAF1/MEK/ERK and NF- $\kappa$ B pathways. *Toxicology and applied pharmacology*, 415, 115449.

Zhao, Y., Zhao, H., Zhai, X., Dai, J., Jiang, X., Wang, G., Li, W., & Cai, L. (2013). Effects of Zn deficiency, antioxidants, and low-dose radiation on diabetic oxidative damage and cell death in the testis. *Toxicology mechanisms and methods*, 23(1), 42–47.

Zheng, W., Zhang, S., Chen, X., Jiang, S., Li, Z., & Li, M. (2021). Case Report: Dendritic Cells and Macrophages Capture Sperm in Chronically Inflamed Human Epididymis. *Frontiers in immunology*, 12, 629680.

Zhou, R., Wu, J., Liu, B., Jiang, Y., Chen, W., Li, J., He, Q., & He, Z. (2019). The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 76(14), 2681–2695.

Zhou, W., Stanger, S. J, Anderson, A. L., Bernstein, I. R., De Iulii, G.N., McCluskey, A., McLaughlin, E.A., Dun, M. D., Nixon, B. (2019). Mechanisms of clamping and charge transfer during epididymosome-sperm interactions. *BMC Biol.* 17: 35.

Zhu X, Yu C, Wu W, Shi L, Jiang C, Wang L, Ding Z, Liu Y. (2022). Zinc transporter ZIP12 maintains zinc homeostasis and protects spermatogonia from oxidative stress during spermatogenesis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2022 Jan 22;20(1):17.

Zhu, Q., Li, X., & Ge, R. S. (2020). Toxicological Effects of Cadmium on Mammalian Testis. *Frontiers in genetics*, 11, 527.

Zirkin, B. R., & Papadopoulos, V. (2018). Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biology of reproduction*, 99(1), 101–111.

Zwolak I. (2020). The Role of Selenium in Arsenic and Cadmium Toxicity: An Updated Review of Scientific Literature. *Biological trace element research*, 193(1), 44–63.

## 13. ANEXOS

### ANEXO I

**Índice de maduración (Índice de Johnsen)** (Johnsen, 1970).

<b>Puntaje</b>	<b>Maduración</b>
10	Espermatogénesis completa con gran cantidad de espermatozoides.
9	Espermatogénesis completa con poca cantidad de espermatozoides.
8	Presencia de espermátidas maduras en diferenciación. No hay espermatozoides maduros.
7	Gran cantidad de espermátidas sin signos de diferenciación.
6	Presencia de pocas espermatides.
5	Gran cantidad de espermatocitos presentes.
4	Pocos espermatocitos presentes.
3	Presencia solamente de espermatogonias.
2	Sin presencia de células germinales, solamente presencia de células de Sertoli.
1	No hay ningún tipo de células en el túbulo seminífero.

### ANEXO II

**Índice histopatológico** (Vigueras-Villaseñor *et al.*, 2008).

<b>Puntaje</b>	<b>Alteraciones histológicas</b>
1	Plegamiento de la lámina basal
1	Descamación celular
2	Vacuolización epitelial
2	Cinsicio celular
2	Picnosis
3	Tubos sin espermatides
4	Tubos sin espermatocitos

