

Título del artículo.

Efectos del Cadmio sobre la calidad y ADN espermático.

Título del artículo en idioma Inglés.

Effects of Cadmium on quality and spermatic DNA.

Autores.

Mayrut Uriostegui-Acosta
Neyra Alvarado-Vergara
Eduardo Escobar-Marrón
Marco Antonio Ramírez-Vargas
Abdiel Galeana-Guzmán
Gerardo Huerta-Beristain
Ma. Elena Moreno-Godínez

Referencia bibliográfica:

MLA

Uriostegui-Acosta, Mayrut, Neyra Alvarado-Vergara, Eduardo Escobar-Marrón, Marco Antonio Ramírez-Vargas, Abdiel Galeana-Guzmán, Gerardo Huerta-Beristain, Ma. Elena Moreno-Godínez. "Efectos del Cadmio sobre la calidad y ADN espermático". *Tlamati* 8.2 (2017): 17-22. Print.

APA

Uriostegui-Acosta, M., Alvarado-Vergara, N., Escobar-Marrón, E., Ramírez-Vargas, M. A., Galeana-Guzmán, A., Huerta -Beristain, G. y Moreno-Godínez, M. A. (2017). Efectos del Cadmio sobre la calidad y ADN espermático. *Tlamati*, 8(2), 17-22.

ISSN: 2007-2066.

Publicado el 30 de Diciembre del 2017

© 2017 Universidad Autónoma de Guerrero

Dirección General de Posgrado e Investigación

Dirección de Investigación

TLAMATI, es una publicación semestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAGro. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.



Efectos del Cadmio sobre la calidad y ADN espermático

Mayrut Uriostegui-Acosta¹
Neyra Alvarado-Vergara¹
Eduardo Escobar-Marrón¹
Marco Antonio Ramírez-Vargas¹
Abdiel Galeana-Guzmán¹
Gerardo Huerta-Beristain¹
Ma. Elena Moreno-Godínez^{1*}

¹Universidad Autónoma de Guerrero. Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas. Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental. Av. Lázaro Cárdenas s/n C.U. Zona Sur. C. P. 39087 Chilpancingo, Guerrero, México. Tel: +52(747) 471 9310 Ext. 3600

*Autor de correspondencia
emoreno20@hotmail.com

Resumen

El cadmio es un metal pesado ampliamente distribuido en el ambiente. La exposición a cadmio a concentraciones similares a las encontradas en el río de Taxco de Alarcón, Gro., sobre el tracto reproductor masculino fue estudiado en ratones macho adultos de la cepa ICR, estos recibieron dosis de 0, 1.6 y 3.2 $\mu\text{Mol/kg/3er d/5d}$ de CdCl_2 en agua de consumo y sacrificados 24-hpt. Los espermatozoides fueron colectados de la CE-CD, se evaluó la calidad espermática en base a lo establecido por la OMS, el daño lipoperoxidativo, se monitoreó a través de la generación de Malondialdehído (MDA) y el daño al ADN se realizó a través del Ensayo Cometa Alcalino ($\text{pH} > 13$). El CdCl_2 alteró la viabilidad>motilidad>morfología espermática en ambas dosis, solo generó daño oxidativo a las dosis más alta de CdCl_2 y generó rupturas en el ADN espermático en ambas dosis. Estos resultados demuestran que la exposición a CdCl_2 vía oral a dosis ambientalmente relevantes pueden afectar la calidad, funcionalidad y generar daño genético, en donde el estrés oxidativo es el principal mecanismo de acción del CdCl_2 y tal vez pueda comprometer la capacidad fertilizante de los espermatozoides o impactar en el desarrollo embrionario.

Palabras clave: Cadmio, estrés oxidativo y daño genético

Abstract

Cadmium is a heavy metal widely distributed in the environment. Exposure to cadmium at concentrations similar to those found in the river of Taxco de Alarcón, Guerrero, México, on the adult male mice reproductive tract was studied in the ICR strain. These mice received doses of 0, 1.6 and 3.2 $\mu\text{Mol /kg/3rd d/5d}$ of CdCl_2 in drinking water and were sacrificed 24-hpt. Spermatozoa were collected from the CE-CD, sperm quality was evaluated based on what was established by the OMS, lipoperoxidative damage was monitored through the generation of Malondialdehyde (MDA) and the DNA damage was carried out through the Alkaline Comet Test ($\text{pH} > 13$). CdCl_2 altered the viability>motility>sperm morphology in both doses, only generated oxidative damage at the highest dose of CdCl_2 and gen-

Como citar el artículo:

Uriostegui-Acosta, M., Alvarado-Vergara, N., Escobar-Marrón, E., Ramírez-Vargas, M. A., Galeana-Guzmán, A., Huerta-Beristain, G. y Moreno-Godínez, M. A. (2017). Efectos del Cadmio sobre la calidad y ADN espermático. *Tlamati*, 8(2), 17-22.

erated breaks in the DNA sperm in both doses. These results demonstrate that exposure to oral CdCl_2 at environmentally relevant doses can affect quality, functionality and generate genetic damage, where oxidative stress is the main mechanism of action of CdCl_2 and may jeopardize the fertilizing capacity of sperm or impact on embryonic development.

Keywords: Cadmium, oxidative stress, genetic damage

Introducción

La minería es una de las actividades económicas más importantes de México desde el siglo XV. El distrito minero de Taxco, en el sur de México fue uno de los mayores productores de metal; sin embargo los residuos mineros que se generaron se han acumulado aledaños a la zona minera (jales), en donde se han encontrado altas concentraciones de cadmio [Cd] (1.0-780 mg/kg), plomo [Pb] y arsénico [As], entre otros (Talavera Mendoza, Yta, Moreno-Tovar, Dótor-Almazán, Flores-Mundo y Duarte-Gutiérrez, 2005; Armienta, Talavera y Barrera 2003). El Cd se encuentra como mineral combinado con otros elementos, entra al suelo, al agua y al aire durante actividades industriales, mineras y durante la combustión de carbón. El Cd se encuentra en la lista de la Organización Mundial de la Salud [OMS] como contaminante prioritario para alimentos (OMS, 1992). La toxicidad del Cd está asociada con un daño severo en varios órganos como riñón, útero y testículos (Goyer, Liu y Waalkes, 2004; Zhang y Jia, 2007). Reportes de nuestro grupo de trabajo han mostrado en niños de la Región de Taxco, Guerrero., la presencia de metales en altas concentraciones, dentro de ellos el Cd (CdU , $4.7 \pm 2.7 \mu\text{g/L}$) (Moreno, Acosta-Saavedra, Meza-Figueroa, Vera, Cebrian, Ostrosky-Wegman y Calderon-Aranda, 2010). Por otro lado, la calidad espermática ha sufrido una disminución en los últimos 50 años (Carlsen, Giwercam, Keiding y Skakkebaek, 1992), atrayendo la atención de científicos en el mundo. Ésta situación, aunada al incremento en la toxicidad reproductiva por los metales, ha provocado preocupación (Moline, Golden, Bar-Chama, Smith, Rauch, Chapin, Perreault et al. 2000). En México el 54% de los varones tienen problemas de fertilidad. En Guerrero de un 10-15% de las parejas tienen dificultad para embarazarse. Una de las posibles causas es la contaminación por

metales. Recientemente se ha evaluado que la exposición a dosis únicas de Cd se relaciona con toxicidad a nivel de testículo y de epidídimo, así como daño al ADN en células testiculares, así como con alteraciones del túbulo seminífero (Benoff, Jacob y Hurley, 2000). Se ha reportado que el Cd altera la barrera hematotesticular, genera edema intersticial testicular, rompe las uniones estrechas y reduce la expresión de Ocludina de las células de Sertoli (Siu, Mruk, Porto y Cheng, 2009), y se ha asociado con la generación de daño oxidativo (LPO) en riñón, hígado, cerebros, eritrocitos y testículos (Koizumi y Li, 1992). Hasta el momento no está bien caracterizado el daño que se genera a nivel de células espermáticas. En este trabajo se propone evaluar el efecto sobre la calidad espermática y daño genético de los espermatozoides de ratones expuestos a cloruro de cadmio [CdCl_2] con el fin de tener la caracterización de los sitios blancos de la espermatogénesis por la exposición al CdCl_2 .

Materiales y Métodos

Animales de experimentación

Se emplearon ratones macho (*Mus musculus*) de la cepa ICR de 38-40 g de peso (10-12 semanas de edad) provenientes del biotero del Instituto de Biotecnología IBT-UNAM. Los animales se mantuvieron a una temperatura de 18-23°C, a una humedad relativa del 40-70%, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h y con alimento y agua *ad libitum*. Los ratones fueron aleatoriamente asignados para formar grupos de 3 ratones para los grupos control y tratados con cloruro de cadmio. El cloruro de cadmio grado técnico (ClCd_2 , 55.2% de pureza), se di-

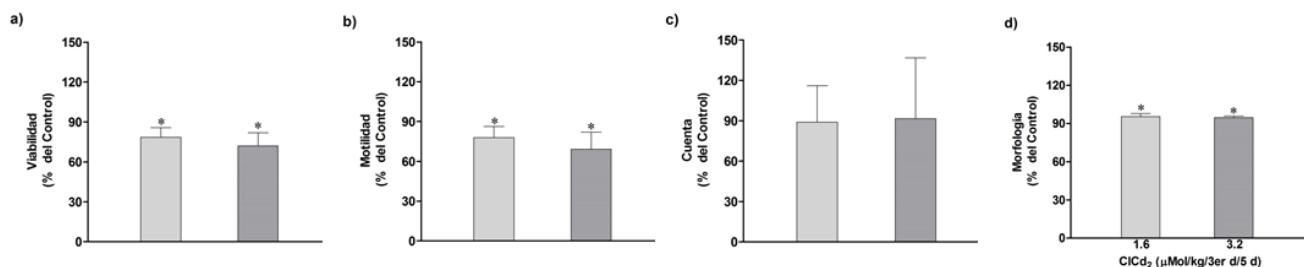


Figura 1. Efecto de la exposición al ClCd_2 sobre los parámetros de la calidad espermática. Se presenta la media $\pm$ DS de 2 experimentos independientes ($n=3$ controles; $n=3$ tratados por dosis por experimento). *Diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control ($p<0.001$) de acuerdo al análisis de ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

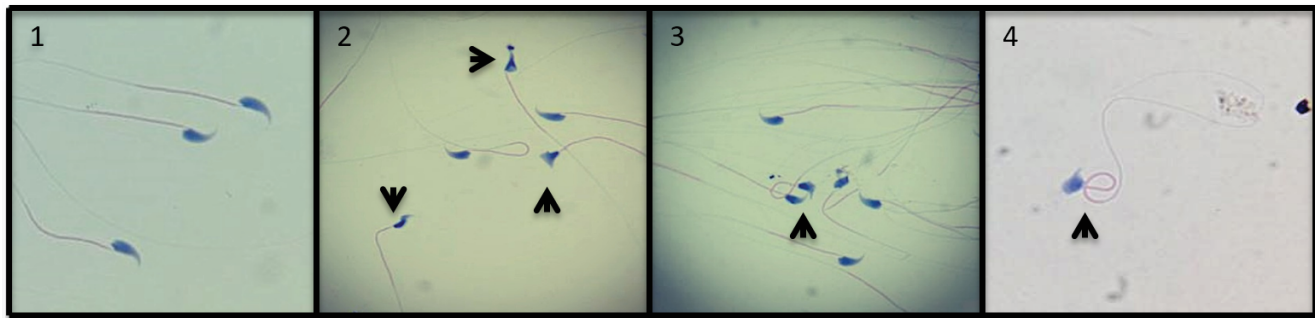


Figura 2. Morfología espermática. Alteraciones morfológicas observadas (Flechas negras). 1) Espermatozoide normal. 2) Cabeza en clavel. 2) Alargamiento de la cabeza. 3) Cabeza en forma de martillo. 4) Cola enrollada.

solvió en agua. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a lineamientos establecidos para el uso y manejo de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999 (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [SAGARPA], 1999)

Estrategia experimental

El grupo tratado fue administrado con dosis cada tercer día de CdCl_2 (1.6 ó 3.2 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal, cada tercer día/5 días (d, v.o.) disuelto en agua y el grupo control recibió solo el vehículo. La exposición de 5 días se eligió considerando que la maduración del espermatozoide en el epidídimo está completa en aproximadamente 4-6 días (Adler, 1996). Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los espermatozoides fueron extraídos y colectados de la cola del epidídimo-conducto deferente [CE-CD] después de la última administración, 24 horas post-tratamiento [hpt], de tal manera que se evaluó el efecto en células espermáticas que al momento de la exposición se encontraban en la etapa de espermatozoide maduro. Se realizaron al menos 2 experimentos independientes por dosis de tratamiento.

Obtención de los espermatozoides de la cola del epidídimo-conducto deferente (CE-CD)

Después de sacrificar a los animales a los tiempos de interés, el conducto deferente y la cola del epidídimo fueron extraídos y los espermatozoides fueron obtenidos por perfusión con 1 ml de solución salina [NaCl 0.9%].

Evaluación de la calidad espermática

Los parámetros de motilidad, viabilidad, y cuenta espermáticas se evaluaron de acuerdo a los lineamientos establecidos por la OMS (2010) en donde se reportó el resultado como porcentaje; mientras que en la cuenta se contaron los espermatozoides morfológicamente maduros con colas y el resultado se expresó en millones de células espermáticas/ml. Finalmente la morfología espermática se evaluó en base a la técnica de tinción de Papanicolaou modificada establecida por Wyrobek, Meistrich, Furrer y Bruce. (1983). Se expresó el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal.

Evaluación del daño oxidante en la membrana de los espermatozoides

Esta determinación se realizó utilizando el kit para el ensayo de lipoperoxidación [LPO] de Oxford Biomedical Research® (Cat. # FR12). Este ensayo se basa en la reacción del reactivo cromogénico *N*-metil-2-fenilindol (R1, proporcionado por el proveedor) con el MDA a 45°C: una molécula de MDA reacciona con 2 moléculas del R1 formando un cromóforo estable. Se preparó una gráfica de calibración empleando una solución estándar de MDA de 0 -15 μM . Se registró la absorbancia a 586 nm en un NaNodrop 2000c (Thermo Scientific®). Se utilizó un control positivo de daño H_2O_2 30 μM . Los resultados se expresaron como μM de MDA/5 x 10^6 espermatozoides/ml.

Evaluación del daño al ADN en los espermatozoides

El daño al ADN se evaluó por el ensayo cometa bajo condiciones alcalinas [pH 13]. En base a lo citado por Urióstegui-Acosta, Hernández-Ochoa, Solís-Heredia, Martínez-Aguilar y Quintanilla-Vega, (2012). Éste es un método sensible y rápido, el cual permite cuantificar el daño al ADN detectando rupturas en la cadena sencilla. El análisis se realizó usando el software Comet Assay IV®. Los parámetros evaluados fueron: el porcentaje de ADN en la cola [%ADN], definido como el porcentaje de rupturas de ADN en la cola del cometa y el momento de la cola [OTM], definido como el producto de la longitud de la cola y el ADN total de la cola del cometa.

Resultados

Efecto del CdCl_2 sobre el peso corporal y relativo de los órganos

El efecto de la exposición al CdCl_2 de manera alterna sobre el peso corporal de los ratones, mostró diferencias significativas con respecto al grupo control a la dosis de 3.2 $\mu\text{Mol/Kg/3er d/5 d}$. Con respecto al peso relativo de órganos de importancia solo se vio incrementado el peso de los testículos con ambas dosis, esto comparado con el grupo control (véase tabla 1).

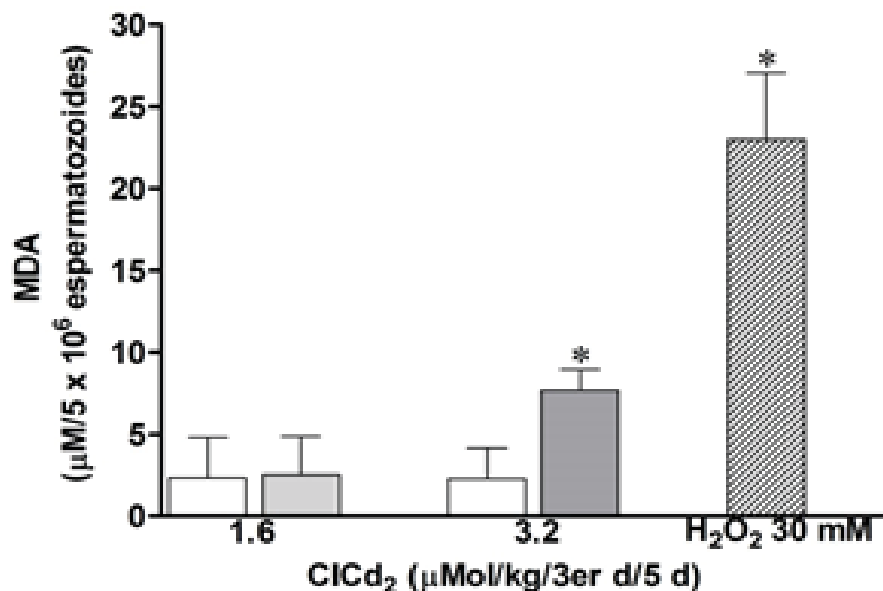


Figura 3. Daño oxidante en la membrana espermática por la exposición al CdCl_2 . Se presenta la media $\pm$ DE de 2 experimentos independientes (n=3 controles; n=3 tratados por dosis por experimento). *Diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control ($p>0.05$) de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. $\text{H}_2\text{O}_2 = 30 \text{ mM}$, como control positivo.

Efectos del CdCl_2 sobre la calidad espermática

La exposición alternas al CdCl_2 (1.6 ó 3.2 $\mu\text{Mol/kg/3er d/5d}$) alteró los parámetros de viabilidad (22% y 28%; respectivamente (véase figura 1a) y la motilidad espermáticas (22% y 31%; respectivamente (véase figura 1b) a 24-hpt, la morfología de los espermatozoides se alteró ligeramente a ambas dosis 4.6% y 5.3% (véase figura 1c), presentando principalmente alteraciones en la cabeza como: cabeza en forma de banana, gigantes y sin acrosoma (véanse tabla 2 y figura 2).

Daño oxidante sobre la membrana espermática por la exposición al CdCl_2

La exposición a dosis repetidas de CdCl_2 no causó daño oxidante sobre la membrana de los espermatozoides, evaluado por la producción de MDA. No se observó un incremento significativo en la generación de MDA en los espermatozoides colectados a la dosis de 1.6 $\mu\text{Mol/kg/3er d/5d}$, mientras a la dosis más alta usada se observó un incremento de 2.5 veces ($p>0.05$) comparados con el grupo control (véase figura 3). El control positivo (H_2O_2 30 mM) mostró un incremento de 9 veces respecto al grupo control.

Efecto del CdCl_2 sobre el daño al ADN espermático

Se evaluó el daño al ADN generado por la exposición a CdCl_2 a través del ensayo cometa bajo condiciones alcalinas (pH 13). Se observaron rupturas en el ADN en los espermatozoides colectados a ambas dosis, siendo el daño más marcado a la dosis de 3.2 $\mu\text{Mol/kg/3er d/5d}$, con respecto al grupo control (datos no mostrados).

Discusión

En este estudio se observaron los efectos a nivel reproductivo en ratones macho por la exposición a CdCl_2 vía oral a dosis de relevancia biológica (1.6 y 3.2 $\mu\text{Mol/kg/3er/5d}$ de CdCl_2). Con el conocimiento de que la contaminación por Cadmio es alta en Taxco de Alarcón, Gro. y en donde en algunas comunidades la población utiliza los lixiviados como una fuente alternativa de agua para uso doméstico durante las estaciones secas (invierno/primavera), de acuerdo con Talavera-Mendoza, Armienta Hernández, Abundis y Mundo (2006). Sumado a que la susceptibilidad de ciertas etapas de la espermatogénesis puede verse afectada exposición a metales pesados, el presente estudio, evaluó los efectos del cadmio sobre la calidad, daño oxidativo y genético en células espermáticas de ratones macho ICR-CD1 expuestos a CdCl_2 . Los resultados obtenidos nos indican que a partir de dosis muy bajas de CdCl_2 se observaron alteraciones en los parámetros de calidad espermática, aunque las alteraciones en la calidad fueron mayores a la dosis más alta (viabilidad>motilidad>morfología). Los ratones expuestos a la dosis de 3.2 $\mu\text{Mol/kg/3er d/5d}$ de CdCl_2 tuvieron una reducción en el peso corporal, así como un incremento en el peso relativo de los testículos, aunque el peso de los testículos se vio afectado de igual manera a la dosis bajas comparado con el control. Esto se relaciona con el trabajo de Sadik (2008), donde mostró que el cadmio afecta varios tejidos y órganos como los testículos y que su efecto nocivo sobre estos últimos es en la degeneración de la célula germinal y defectos en la esteroidogénesis testicular.

Existen otros reportes que indican la disminución

Tabla 1. Efecto de la exposición al CdCl₂ sobre el peso corporal y relativo de los órganos a dosis de 1.6 y 3.2 µMol/kg/3er d/5d sacrificados 24-hpt.

Grupo	Peso corporal	Pesos relativos (%)					
		Hígado	Riñón	Testículos	Vesículas seminales y Glándulas coagulantes	Próstata	Bazo
Control	43.48±2.29	5.74±0.68	1.67±0.31	0.59±0.13	0.76±0.15	0.025±0.002	0.34±0.11
1.6 µMol/kg/3^{er}d/5d	42.65±3.92	5.62±0.39	1.56±0.15	0.75±0.19*	0.67±0.11	0.026±0.002	0.31±0.11
	39.43±1.79						
3.2 µMol/kg/3^{er}d/5d	*	5.45±0.25	1.51±0.34	0.72±0.09*	0.72±0.12	0.025±0.001	0.39±0.15

Se presenta la media±DS (n=3 controles, n=3 tratados por dosis por experimento). *p<0.05 comparado con respecto al grupo control, de acuerdo a la prueba de *t* de Student. 2 experimentos independientes. hpt= horas post-tratamiento.

en la motilidad espermática por exposición a CdCl₂, en donde puede explicarse los efectos de esta exposición sobre los microtúbulos, ya que estudios previos refieren que el cadmio inhibe el deslizamiento de microtúbulos en el espermatozoide (Kanous, Casey y Lindemann, 1993), ya que el cadmio compite con el calcio para la unión calmodulina, siendo esta importante para la motilidad y de igual manera impacta en la viabilidad espermática tal y como lo reportaron Leoni, Bogliolo, Deiana, Berlinguer, Rosati y Pintus (2002), ya que la exposición a 2 y 20 µM de cadmio afecta la viabilidad de los espermatozoides. Por su parte Oliveira, Spano, Santos y Pereira (2009) reportaron que ratones administrados a una sola dosis de 1-3 mg/kg/S.C. (vía subcutánea) de CdCl₂ y sacrificados a las 24h y 35d, mostraban incrementos en las alteraciones de calidad espermática (morfología y motilidad). Con respecto a las alteraciones sobre la morfología espermática se observaron alteraciones principalmente de cabeza; mientras que los resultados sobre el daño oxidativo de la membrana espermática mostró un incremento significativo solo a la dosis

de 3.2 µMol/kg/3er d/5d de 2.5 veces (p>0.05), comparado con el grupo control. Esto se relaciona por lo reportado por Ige, Olaleye, Akhigbe, Oyekunle y Udoh (2013) en donde la administración de dosis únicas de CdSO₄ y sacrificados al 3er día de administración, mostró una disminución de la morfología espermática, así como un daño testicular, relacionándolo con un incremento del estado de lipoperoxidación de las células testiculares.

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el cadmio induce el estrés oxidativo debido a las especies de oxígeno reactivo [ROS] de acumulación, en su mayoría de aniones superóxido radical, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Waisberg, Joseph, Hale, y Beyersmann, 2003). ROS puede afectar la motilidad espermática por la peroxidación de los lípidos de la membrana la reducción de la fosforilación de proteínas axonemal o mediante la reducción de los niveles de ATP; así como el daño al ADN espermático, ya que se ha reportado que el cadmio es capaz de inhibir la condensación de la cromatina espermática, tal y como lo describen Monsefi, Alae, Mo-

Tabla 2. Principales alteraciones morfológicas observadas en los grupos expuestos a CdCl₂ y grupo control.

Grupo	Cabeza anormal	Cola anormal	Parte media anormal	Normales
Control	4.08±1.56	---	1.06±0.66	94.83±1.75
1.6 µMol/Kg/3^{er}d/5d	7±2.73*	0.2±0.45	1.8±0.45*	91±2.12
3.2 µMol/Kg/3^{er}d/5d	7.67±2.58*	0.17 ±0.41	1.5±1.05	90.67±2.80

Se presenta la media ± DE entre las dosis de CdCl₂

radshahi y Rohani (2009), en donde en los espermatozoides maduros el ADN se fragmenta como resultado de una mala condensación de la cromatina.

Conclusión

Este trabajo subraya que la exposición al CdCl_2 a dosis de 1.6 y 3.2 $\mu\text{Mol/Kg}/3^{\text{er}}\text{d}/5\text{d}$, además de ser altamente tóxico para la espermatogénesis del ratón, se ve reflejado en la variedad de los parámetros funcionales espermáticos afectados: motilidad, vitalidad y morfología, sugiriendo que estos parámetros son sensibles a la toxicidad del cadmio. Además, la fragmentación de ADN espermático que se produjo en este momento aumenta las posibilidades de poner en riesgo el éxito de la fertilización del óvulo y el posterior desarrollo del embrión.

Referencias

- Adler, I. D. (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutation Research*. 352, 169-172.
- Armienta, M., Talavera, O. y Barrera, M. (2003). Geochemistry of Metals from Mine Tailings in Taxco, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 71, 387-393.
- Benoff, S., Jacob, A. y Hurley, I. (2000). Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Human Reproduction Update*. 6, 107-121.
- Carlsen, E., Giwercam, A., Keiding, N. y Skakkebaek, N. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal*. 305, 609-613.
- Goyer, R. A., Liu, J. y Waalkes, M. P. (2004). Cadmium and cancer of prostate and testis. *Biometals*, 17, 555-558.
- Ige, S., Olaleye, S., Akhigbe, R., Oyekunle, O. y Udoh, U. (2013). Testicular toxicity and sperm quality following cadmium exposure in rats: Ameliorative potentials of Allium cepa. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 5, 37-41.
- Kanous, K., Casey, C. y Lindemann, C. (1993). Inhibition of microtubule sliding by Ni^{2+} and Cd^{2+} evidence for a differential response of certain microtubule pairs within the bovine sperm axoneme. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 26, 66-76.
- Koizumi, T. y Li, Z.G. (1992). Role of oxidative stress in single-dose, cadmium-induced testicular cancer. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 37, 25-36.
- Leoni, G., Bogliolo, L., Deiana, G., Berlinguer, F., Rosati, I. y Pintus, P. (2002). Influence of Cadmium exposure on in vitro ovine gamete dysfunction. *Reproductive Toxicology*. 16, 371-7.
- Moline, J. M., Golden, A. L., Bar-Chama, N., Smith, E., Rauch, M. E., Chapin, R. E., Perreault, S. D., Schrader, S. M., Suck, W. A. y Landrigan, P. J. (2000). Exposure to hazardous substances and male reproductive health: a research framework. *Environmental Health Perspectives*. 108, 803-813.
- Monsefi, M., Alaei, S., Moradshahi, A. y Rohani, L. (2010). Cadmium-induced infertility in male mice. *Environmental Toxicology*. 25, 94-102.
- Moreno, M. E., Acosta-Saavedra, L. C., Meza-Figueroa, D., Vera, E., Cebrian, M. E., Ostrosky-Wegman, P. y Calderon-Aranda E.S. (2010). Biomonitoring of metal in children living in a mine tailings zone in Southern Mexico: A pilot Study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213, 252-258.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (1999). *Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. SAGARPA
- Oliveira, H., Spano, M., Santos, C., Pereira, M. (2009). Adverse effects of cadmium exposure on mouse sperm. *Reproductive Toxicology*. 28, 550-555.
- Organización Mundial de la Salud. (1992). Environmental Health Criteria 134. *Cadmium, International Programme on Chemical Safety (IPCS)*, Geneva.
- (2010). *Manual de laboratorio de la Organización Mundial de la Salud para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical*. Editorial Médica Panamericana. 6ª. Edición. Nueva York.
- 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, 345-353.
- Siu, E. R., Mruk, D. D., Porto, C. S. y Cheng, C. Y. (2009). Cadmium-induced testicular injury. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238, 240-249.
- Talavera Mendoza, O., Armienta Hernández, M. A., Abundis, J. G. y Mundo, N. F. (2006). Geochemistry of leachates from the El Fraile sulfide tailings piles in Taxco, Guerrero, Southern Mexico. *Environmental Geochemistry and Health*. 28, 243-55.
- Talavera-Mendoza, O., Yta, M., Moreno-Tovar, R., Dótor-Almazán, A., Flores-Mundo, N. y Duarte-Gutiérrez, C. (2005). Mineralogy and geochemistry of sulfide-bearing tailings from silver mines in the Taxco, Mexico area to evaluate their potential environmental impact. *Geofísica Internacional*, 44, 49-64.
- Urióstegui-Acosta, M., Hernández-Ochoa, I., Solís-Heredia, M. D., Martínez-Aguilar, G. y Quintanilla-Vega, B. (2012). Comparative effect of technical and commercial formulations of methamidophos on sperm quality and DNA integrity in mice. *Environmental Toxicology*. En prensa.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale B., Beyersmann, D. (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192: 95-117.
- Wyrobek, A. J., Meistrich, M. L., Furrer, R., Bruce, W. R. (1983). Physical characteristics of mouse sperm nuclei. *Biophysical Journal*, 16, 811-825.
- Zhang, W. C., Jia, H. M. (2007). Effect and mechanism of cadmium on the progesterone synthesis of ovaries. *Toxicology*, 239, 204-212.