



Recibido: 18 de agosto de 2011

Aceptado: 23 de noviembre de 2011

Efecto de la exposición *in vitro* de espermatozoides humanos a cadmio ($CdCl_2$)

Yoeli Méndez,* Francisco Báez,* Patricia Villamediana *

* Laboratorio de Citogenética. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

RESUMEN

El desarrollo de actividades antropogénicas ha permitido la dispersión en el ambiente de metales pesados como el cadmio, evento que se encuentra relacionado con la disminución de la fertilidad masculina. Este estudio se realizó con la finalidad de determinar el efecto que tiene la exposición *in vitro* de espermatozoides humanos a dicho metal. Se procedió a incubar espermatozoides humanos en presencia de $CdCl_2$ bajo concentraciones de 2 y 4 ppm, y se evaluaron movilidad y vitalidad espermática, integridad de membrana, capacitación espermática e integridad de la cromatina espermática. La exposición *in vitro* a $CdCl_2$ causó un efecto significativo sobre los patrones de movilidad moderado ($p = 0.01$) e inmóvil ($p < 0.05$); no se observó un efecto significativo sobre la vitalidad espermática, integridad de membrana, reacción acrosómica, e integridad de la cromatina espermática. El cadmio causa un efecto deletéreo sobre la movilidad espermática; sin embargo, no ocasiona alteraciones de la vitalidad espermática, integridad de membrana o de la estructura de la cromatina espermática bajo las concentraciones estudiadas *in vitro*.

Palabras clave: Cadmio, espermatozoides humanos, movilidad espermática, integridad de la cromatina.

ABSTRACT

The development of anthropogenic activities has allowed environmental dispersion of heavy metals as cadmium; this event is related with decreased male fertility. This study was carried out with the aim of determine the effect of *in vitro* exposure of human spermatozoa to cadmium. Spermatozoa were incubated in presence of $CdCl_2$, in concentrations of 2 ppm and 4 ppm, and motility, vitality, membrane integrity, sperm capacitation and sperm chromatin integrity was assessed. *In vitro* exposure to $CdCl_2$ caused a significant effect on moderate motility pattern ($p = 0.01$) and immobile sperm ($p < 0.05$) whereas it didn't cause a significant effect on viability, membrane integrity, acrosome reaction, sperm chromatin condensation and sperm chromatin fragmentation. Cadmium caused a deleterious effect on sperm motility; nevertheless, it didn't cause decrease on viability, membrane or chromatin structure alterations under the concentrations studied *in vitro*.

Key words: Cadmium, human spermatozoa, sperm motility, chromatin integrity.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se ha observado una disminución en la fertilidad tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, con un subsecuente incremento en la demanda de técnicas de reproducción asistida.¹ Dicha variación puede ser atribuida a diversos factores, entre ellos contaminantes ambientales, estilo de vida y exposición ocupacional.²

El cadmio es un metal de color gris brillante insoluble en agua que es ampliamente utilizado en la industria química. El óxido de cadmio (CdO) es usado en el galvanizado, glaseados de cristal y cerámica y es parte de la materia prima para estabilizadores de calor de cloruro de polivinilo, también conocido como PVC.³ El cloruro de cadmio ($CdCl_2$) es usado en fungicidas y pesticidas, galvanoplastia, como componente de baños y aerosoles de acabados de metal, como un agente

en el fotocopiado y como inhibidor de niebla en emulsiones de películas fotográficas.³

El cadmio se absorbe por vía gastrointestinal, cutánea o por inhalación acumulándose en hígado, pulmón, riñón y sistema reproductivo, sin función biológica conocida. Este metal interacciona con las metalotioneínas, proteínas que tienen como función la protección del sistema enzimático, lo que se refleja en la acumulación del complejo cadmio-metalotioneína en hígado y placenta, generando alteraciones metabólicas. Otros mecanismos de acción de este metal en sistemas biológicos son la fuerte unión a grupos sulfidrilo de proteínas intracelulares, inhibiendo su actividad enzimática, y el desplazamiento del zinc de enlaces disulfuro, interfiriendo en procesos bioquímicos.⁴ Los trabajadores de las industrias de la metalurgia, plástico, cerámicas y soldadura son aquellos que se encuentran continuamente expuestos a altas concentraciones de cadmio,⁵ estando más propensos a sufrir cáncer de próstata,⁶ neumonitis química, disfunción renal y enfisema.⁴

Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* indican que el cadmio es un agente que disminuye la concentración de testosterona,⁷ afecta de manera significativa el tejido testicular por disrupción de la barrera hematotesticular,⁸ disminuye la concentración espermática,^{7,9} la movilidad espermática⁷ y la vitalidad espermática,¹⁰ aumenta la peroxidación lipídica,^{7,11} induce la reacción acrosómica¹⁰ y altera la maduración espermática.⁷

Los resultados obtenidos en investigaciones previas apuntan a que el cadmio ejerce un efecto deletéreo sobre la calidad espermática, principalmente por alteraciones en el proceso de espermatogénesis, bien sea por la ruptura de uniones intercelulares¹² o por alteraciones en la concentración de testosterona.⁷ Uno de los pocos estudios *in vitro* realizados para valorar el efecto del cadmio sobre la calidad espermática se llevó a cabo en ovinos e indicó que este metal causa alteraciones sobre la vitalidad espermática y sobre la reacción acrosómica.¹⁰ La presente investigación se realizó para valorar directamente el efecto del cadmio sobre los parámetros espermáticos humanos en condiciones controladas con el fin de ahondar en el mecanismo bajo el que este metal disminuye el potencial fecundante en hombres en edad reproductiva.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de la muestra

Las muestras de semen ($n = 10$) fueron obtenidas de individuos voluntarios residentes en el Municipio Maracaibo, Estado Zulia, en edades comprendidas entre 20-30 años. Dichos voluntarios autorizaron la evaluación y tratamiento de las muestras suministradas, bajo la protección de la divulgación de las identidades de los mismos.

La toma de la muestra se realizó por masturbación, luego de tres a cinco días de abstinencia sexual, depositándola en un colector estéril. Ésta fue llevada en los próximos 20 minutos al Laboratorio de Citogenética de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia para su evaluación.

Diseño experimental

Luego de colectar y transportar las muestras al laboratorio, se procedió a realizar la evaluación seminal, evaluación de la integridad de la membrana plasmática, evaluación de la capacitación espermática y reacción acrosómica, evaluación de la compactación de la cromatina espermática y evaluación de la fragmentación del DNA espermático.

En seguida se tomaron tres alícuotas de una concentración de 5×10^6 espermatozoides/mL; una de éstas se empleó como control durante cada ensayo mientras que las dos restantes se emplearon para realizar el tratamiento con concentraciones de 2 y 4 ppm $CdCl_2$. Las muestras fueron incubadas por 24 horas en una atmósfera de 5% CO_2 en aire saturado de humedad y a una temperatura de 37 °C en medio definido modificado (mDM)¹³ (**Cuadro I**). Despues de realizar el tratamiento, se procedió a evaluar la movilidad, vitalidad, integridad de membrana plasmática, capacitación espermática y reacción acrosómica, compactación de la cromatina espermática y fragmentación del DNA espermático.

Evaluación seminal

El análisis seminal incluyó evaluación del color, volumen, pH y viscosidad seminal, concentración, movilidad, morfología, y vitalidad espermática, siendo criterio de inclusión de las muestras para el estudio

Cuadro I. Composición del medio mDM.

	g/L	mM
NaCl	6.550	112.00
KCl	0.300	4.02
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.330	2.25
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.106	0.52
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.113	0.83
Rojo fenol	0.002	
Gentamicina	0.050	
NaHCO ₃	3.104	37.00
Glucosa	2.500	13.90
Piruvato sódico	0.1375	1.56
BSA	6.000	
pH	7.4	

la normalidad de las mismas de acuerdo a los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud.¹⁴

Integridad de membrana plasmática

La evaluación de la integridad de membrana se realizó aplicando el test hiposmótico (HOST). En 500 µL de solución hiposmótica (Citrato de sodio al 1%) se colocaron 100 µL de semen y se incubó a 37 °C por 30 min. Para medir el hinchamiento espermático se procedió a observar bajo el microscopio de contraste de fase a 400X, evaluando 100 espermatozoides por muestra; fueron considerados como viables aquellos que presentaron cola curvada o enrollada como reacción al cambio osmótico.¹⁵

Capacitación espermática y reacción acrosómica

La evaluación del estado de la membrana acrosomal se llevó a cabo mediante el test de clortetraciclina. Se colocaron 100 µL de una suspensión espermática en un vial, posteriormente se añadieron 100 µL de una solución de CTC (20mM Tris-HCl, 130 mM NaCl, 5 mM L-cisteína y 750 mM clortetraciclina) y se mezclaron con cuidado. Luego de 10 segundos se detuvo la reacción por adición de 16 µL de una solución de paraformaldehído al 12.5% v/v en 0.5M de Tris-HCl. Las muestras se mantuvieron a 4 °C en la oscuridad

hasta su evaluación dentro de las 24 h posteriores a la preparación. Se evaluaron 100 espermatozoides por muestra.¹⁶ Los espermatozoides fueron clasificados como: no capacitados (NC), aquellos que presentaron fluorescencia verde brillante distribuida uniformemente en la cabeza del espermatozoide; como capacitados (C), aquellos que presentaron la región acrosomal verde fluorescente y región postacrosomal oscura; y como acrosoma reaccionado (AR), aquellos que presentaron la cabeza del espermatozoide parcialmente teñida de verde fluorescente, verde en la región postacrosomal o sin fluorescencia.

Compactación de la cromatina espermática

Se realizó un frotis de la suspensión espermática y se dejó secar al aire para proceder al tratamiento con el kit Diff-Quick®.¹⁷ A continuación, se colocó la lámina portaobjetos con la muestra en la solución fijadora (Metanol) por 10 segundos, luego se transfirió al colorante 1 (Eosina) y tras 10 segundos se extrajo la lámina y se lavó suavemente. Por último, se tiñó con el colorante 2 (Tiazina) por 10 segundos, se lavó suavemente y se dejó secar al aire. Se evaluaron 100 espermatozoides bajo el microscopio de contraste de fase con aumento de 1000X, clasificándolos como espermatozoides con cromatina compactada aquellos débilmente teñidos, y como espermatozoides con cromatina descompactada, aquellos fuertemente teñidos.

Fragmentación del DNA espermático

El análisis de la fragmentación del DNA espermático se realizó mediante el test de dispersión de la cromatina espermática.¹⁸ Las muestras fueron teñidas con la solución de Wright y se contaron 100 espermatozoides por muestra, clasificándolos como espermatozoides sin DNA fragmentado aquéllos con un halo de DNA grande o mediano; y como espermatozoides con DNA fragmentado, aquéllos con un halo de DNA pequeño, sin halo o degradados.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como media ± desviación estándar. El análisis estadístico fue realizado con el programa SAS¹⁹ mediante el procedimiento lineal general (PROC GLM) y el estadístico LSMEANS. Se calculó el coeficiente

Cuadro II. Efecto del CdCl_2 sobre los parámetros espermáticos tras 24 horas de incubación.

	Control	Cd 2 ppm	Cd 4 ppm
<i>Movilidad</i>			
Moderados	30 ± 20.4 ^a	21.3 ± 18.8 ^{a,b}	17.4 ± 14.4 ^{b*}
No progresivos	21.8 ± 13.3	19.5 ± 8.3	16.5 ± 9.1
Inmóviles	33.2 ± 16.1 ^a	48.2 ± 24.9 ^{b**}	57.6 ± 28 ^{b***}
<i>Vitalidad</i>			
Muertos	58.2 ± 16.5	60.3 ± 12.1	61.6 ± 16.9
<i>Integridad de membrana</i>			
No reaccionados	51.3 ± 16.9	55.4 ± 15.3	49 ± 17
<i>Reacción acrosómica</i>			
Acrosomas reaccionados	51.5 ± 12.9	52.2 ± 8.54	47.7 ± 18.3

Valores en la misma fila con diferentes superíndices difieren significativamente. * $p = 0.01$, ** $p = 0.03$, *** $p = 0.0008$. Media ± DE.

de correlación de Spearman (r) para determinar el grado de correlación entre los parámetros estudiados. El nivel de significancia aceptado fue de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

La movilidad espermática resultó afectada al exponer espermatozoides humanos a la presencia de cadmio (*Cuadro II*). La exposición a cadmio causó una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides móviles moderados a una concentración de 4 ppm ($p = 0.01$) y un incremento en el porcentaje de espermatozoides inmóviles bajo concentraciones de 2 ppm ($p = 0.03$) y 4 ppm ($p = 0.0008$).

El *cuadro II* presenta los datos referidos a vitalidad espermática, integridad de membrana y reacción acrosómica, parámetros que no se vieron afectados tras la exposición a CdCl_2 ($p > 0.05$). El *cuadro III* presenta los coeficientes de correlación para los parámetros seminales tras 24 horas de incubación; se observa una correlación positiva media entre la concentración de CdCl_2 y el porcentaje de espermatozoides inmóviles.

La evaluación del material nuclear indica que la exposición *in vitro* a CdCl_2 no causa un efecto significativo sobre la integridad de la cromatina

Cuadro III. Coeficiente de correlación de parámetros seminales tras 24 horas de incubación.

	Acrosoma reaccionado	Inmóviles	No reaccionados
[CdCl_2]	NS	0.481	NS
Muertos	-0.424	0.438	0.581
Inmóviles			0.590

Cuadro IV. Efecto del CdCl_2 sobre la cromatina espermática tras 24 horas de incubación.

	Control	Cd 2 ppm	Cd 4 ppm
<i>Integridad de la cromatina espermática</i>			
Descompactados	91 ± 5	89.5 ± 11	90.2 ± 7.5
<i>Fragmentación del DNA espermático</i>			
Fragmentados	95 ± 6.1	89 ± 12.2	93.2 ± 6.3
Media ± DE.			

espermática o sobre la fragmentación del DNA espermático ($p > 0.05$) (*Cuadro IV*).

DISCUSIÓN

Estudios realizados en bovinos y murinos demuestran que la exposición de espermatozoides a cadmio, *in vitro* e *in vivo*, causa un efecto deletéreo sobre la movilidad espermática.^{20,21} Schlingmann y cols.²² demostraron que la vía de señalización Ca/CaM/CaMPKII puede ser inhibida en presencia de antagonistas del calcio al cultivar espermatozoides en un medio que sólo contenga glucosa como fuente energética; sin embargo, al suplementar este medio con piruvato y lactato la movilidad es restablecida, por lo que se sugiere la presencia de una vía alterna Ca/AC-AMPc/PKA, bajo la cual antagonistas del calcio no ejercen un efecto negativo en presencia de sustratos para la respiración oxidativa. En el presente estudio, la exposición a cadmio aumentó significativamente el porcentaje de espermatozoides inmóviles, a pesar del contenido de piruvato en el medio de cultivo. Es conocido que el cadmio compite con el calcio por los sitios de unión a calmodulina, por lo que el efecto observado podría encontrarse relacionado con la interacción de este metal con calmodulina y microtúbulos, como sugieren Lindemann y cols.²³ y Kanous y cols.²⁴ al observar la disminución de la movilidad en espermatozoides murinos y bovinos expuestos a cadmio.

In vivo, el CdCl₂ es conocido por producir la ruptura de la barrera hematotesticular mediante la disociación de las *tight junctions* y *adherens junctions*, generando una falla en la espermiación, pérdida de células germinales del epitelio seminífero, necrosis del tejido y apoptosis.^{25,26} Los resultados de esta investigación indicaron que el CdCl₂ no causó un efecto significativo sobre la vitalidad espermática *in vitro*; esto pudiera deberse a que la vitalidad se vea afectada principalmente como producto de la acción de especies de oxígeno reactivas sobre formas espermáticas inmaduras o del inicio de un proceso apoptótico, condiciones que se desarrollan durante la exposición *in vivo* a este metal.¹¹ Braydich-Stolle y cols.²⁷ demostraron que concentraciones de 1 a 5 ppm CdCl₂ no disminuyen la vitalidad en células germinales de ratón, pero concentraciones de 10 a 25 ppm disminuyen el metabolismo celular y la vitalidad. En contraste, la investigación realizada por Leoni y cols.,⁷ basada en la exposición *in vitro* de espermatozoides ovinos a concentraciones de 0.4 y 4 ppm (2 y 20 μ M) CdCl₂ sugiere que este metal ejerce un efecto negativo sobre la vitalidad espermática.

Estudios realizados indican que existe una relación de competencia entre el cadmio y Ca²⁺ por los sitios de unión a calmodulina.²⁸ La sustitución del Ca²⁺ ocasionaría la interrupción de la vía de señalización Ca²⁺/CaM, inhibiendo la despolarización de la membrana espermática, lo que impediría la expulsión del contenido acrosomal.²⁹ Por otro lado, estudios realizados *in vitro* en pacientes fértiles demuestran la disminución de la expresión de los receptores de manosa e inhibición de la RA.³⁰ Sin embargo, durante esta investigación no se observaron variaciones en el desarrollo de la reacción acrosómica.

La integridad de membrana no se vió afectada al exponer espermatozoides humanos a CdCl₂, lo que concuerda con la investigación realizada por Braydich-Stolle y cols.,²⁷ quienes observaron que concentraciones de 1 a 25 ppm CdCl₂ no causan alteraciones de membrana en células germinales de ratón. Por otro lado, Amara y cols.³¹ observaron que el suministro de 40 ppm (40 mg/L) CdCl₂ a ratas aumenta de manera significativa la peroxidación lipídica a nivel testicular, lo que se encuentra directamente relacionado con la disminución de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, glutatióperoxidasa y catalasa.

Oliveira y cols.²¹ observaron que el cadmio desestabiliza la estructura de la cromatina espermática en ratones y sugieren que tal efecto se produce durante la fase media de la espermiogénesis, donde se realiza la transición de histonas a protaminas. Estudios realizados en espermatozoides de individuos fumadores difieren de estos hallazgos; Sergerie y cols.³² observaron el aumento en la concentración de cadmio en plasma seminal sin efecto en la fragmentación del DNA al comparar con individuos no fumadores, mientras que Sepaniak y cols.³³ evaluaron la fragmentación del DNA en individuos fumadores observando un incremento significativo de la misma. En este estudio no pudieron observarse alteraciones sobre la integridad de la cromatina espermática tras la exposición *in vitro* de espermatozoides humanos a concentraciones de 2 y 4 ppm CdCl₂ probablemente debido a una rápida descondensación de la cromatina de espermatozoides obtenidos tras el proceso de licuefacción del plasma seminal, como sugiere la OMS para el procesamiento del mismo.³⁴

El cadmio es un agente químico que altera significativamente la fertilidad masculina, su acción directa sobre el espermatozoide indica que la incorporación de este metal al sistema reproductivo puede ocasionar

un efecto temprano sobre el potencial fecundante del hombre, aun cuando no se encuentren en desarrollo los signos característicos de una acumulación crónica a lo largo del eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

CONCLUSIONES

La exposición *in vitro* de espermatozoides humanos a $CdCl_2$ causa alteraciones sobre la movilidad espermática; sin embargo, la vitalidad, integridad de membrana, reacción acrosómica e integridad de la cromatina espermática no se ven afectadas por este metal bajo las concentraciones estudiadas.

REFERENCIAS

- Skakkebaek N, Jorgensen N, Main K; Rajpert-De Meyts E, Leffers H, Andersson A et al. Is human fecundity declining? *Int J Androl* 2006; 29: 2-11.
- Ten J, Mendiola J, Torres-Cantero A, Moreno-Grau J, Moreno-Grau S, Roca M et al. Occupational and lifestyle exposures and male infertility: A mini review. *The Open Reproductive Science Journal* 2008; 1: 16-21.
- OSHO, Occupational safety and health office. Exposición ocupacional a cadmio; regla final. Departamento del Trabajo y los Recursos Humanos de Puerto Rico. 1992.
- Ramírez A. Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *An Fac Med, Univ Mayor San Marcos* 2002; 63: 51-64.
- OSHA, Occupational Safety And Health Administration. Cadmium. U.S Department of Labor. OSHA 3136-06R 2004.
- Benoff S, Jacob A, Hurley I. Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Hum Reprod Upd* 2000; 6: 107-21.
- Monsefi M, Alaee S, Moradshahi A, Rohani L. Cadmium-induced male infertility in male mice. *Environ Toxicol* 2009; 25: 94-102.
- Chung N, Cheng Y. Is cadmium chloride-induced inter-sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable *in vitro* model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? *Endocrinology* 2001; 142: 1878-88.
- Benoff S, Centola G, Millan C, Napolitano B, Maumar J, Hurley I. Increased seminal plasma lead levels adversely affect the fertility potential of sperm in IVF. *Hum Reprod* 2003; 18: 374-83.
- Leoni G, Bogliolo L, Deiana G, Berlinguer F, Rosati I, Pintus P et al. Influence of Cadmium exposure on *in vitro* ovine gamete dysfunction. *Reprod Toxicol* 2002; 16: 371-7.
- El-Shahat A, Gabr A, Meki A, Mehana E. Altered testicular morphology and oxidative stress induced by cadmium in experimental rats and protective effect of simultaneous green tea extract. *Int J Morphol* 2009; 27: 757-64.
- Wong C, Mruk D, Lui W, Cheng C. Regulation of blood-testis barrier dynamics: an *in vivo* study. *J Cell Sci* 2004; 117: 783-98.
- Younis A, Zuelke K, Harper K, Oliveira M, Brackett B. *In vitro* fertilization of goat oocytes. *Biol Reprod* 1991; 44: 1177-82.
- WHO, World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Switzerland: World Health Organization; 2010.
- Giraldo N, Correa J, Vásquez N. Evaluación del efecto de la refrigeración sobre la calidad del semen equino. *Revista CES* 2006; 2: 8-16.
- Valeris R, Villamediana P, Quintero A, Parra O, Sandoval J, Ghebrehiwet B. Expression and distribution of the complement receptor gC1qR in bovine sperm. *Revista Científica, FCV-LUZ* 2008; 18: 22-7.
- Sousa A, Tavares R, Velez J, Figueiredo H, Almeida V, Almeida-Santos T et al. Dual use of Diff-Quick-like stains for the simultaneous evaluation of human sperm morphology and chromatin status. *Hum Reprod* 2009; 24: 28-36.
- Fernández J, Muriel L, Rivero M, Goyanes V, Vázquez R, Alvarez J. The sperm chromatin dispersion test: A simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003; 24: 59-66.
- SAS, Statistical Analysis System Institute. Sas/stat user's guide, 8.2 edition. Cary, NC. USA. 2001.
- Arabi M, Mohammadpour A. Adverse effects of cadmium on bull spermatozoa. *Vet Res Commun* 2006; 30: 943-51.
- Oliveira H, Spanò M, Santos C, Pereira M. Adverse effects of cadmium exposure on mouse sperm. *Reprod Toxicol* 2009; 28: 550-5.
- Schlingmann K, Michaut M, McElwee J, Wolff C, Travis A, Turner R. Calmodulin and CaMKII in the sperm principal piece: Evidence for a motility-related calcium/calmodulin pathway. *J Androl* 2007; 28: 706-16.
- Lindemann C, Gardner T, Westbrook E, Kanous K. The calcium-induced curvature reversal of rat sperm is potentiated by cAMP and is inhibited by anti-calmodulin. *Cell Motil Cytoskel* 1991; 20: 316-24.
- Kanous K, Casey C, Lindemann C. Inhibition of microtubule sliding by Ni²⁺ and Cd²⁺: evidence for a differential response of certain microtubule pairs within the bovine sperm axoneme. *Cell Motil Cytoskel* 1993; 26: 66-76.
- Lee N, Cheng C. Adaptors, junction dynamics and spermatogenesis. *Biol Reprod* 2004; 71: 392-404.
- Wong C, Mruk D, Lui W, Cheng C. Regulation of blood-testis barrier dynamics: an *in vivo* study. *J Cell Sci* 2004; 117: 783-98.
- Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager J, Hofmann M. *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline of stem cells. *Toxicol Sci* 2005; 88: 412-9.
- Ingersoll R, Wasserman R. Vitamin D-induced calcium-binding protein. *J Biol Chem* 1971; 246: 2808-14.
- Brandelli A, Miranda P, Tezon J. Voltage-dependent calcium channels and Gi regulatory protein mediate the human sperm acrosomal exocytosis induced by N-acetyl-glucosaminyl/mannosyl neoglycoproteins. *J Androl* 1996; 17: 552-529.
- Benoff S, Hurley I, Mandel F, Cooper G, Herslag A. Induction of the human sperm acrosome reaction with mannose-containing neoglycoprotein ligands. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 827-837.
- Amara S, Abdelmelek A, Garrel C, Guiraud P, Douki T, Ravnat J et al. Preventive effect of zinc against cadmium-induced oxidative stress in the rat testis. *J Reprod Develop* 2008; 54: 129-134.

32. Sergerie M, Ouhilal S, Bissonnette F, Brodeur J, Bleau G. Lack of association between smoking and DNA fragmentation in the spermatozoa of normal men. *Hum Reprod* 2000; 15: 1314-1321.
33. Sepaniak S, Forges T, Gerard H, Foliguet B, Bene M, Monnier-Barabarino P. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology* 2006; 223: 54-60.
34. Björndahl L, Kvist U. Human sperm chromatin stabilization: A proposed model including zinc bridges. *Mol Hum Reprod* 2010; 16: 23-29.

Correspondencia:

Lcda. Yoeli Méndez.

Asistente de Investigación.
Laboratorio de Citogenética.
Facultad Experimental de Ciencias.
Universidad del Zulia.
Maracaibo, Venezuela.
Correo electrónico: joe4_ml@hotmail.com