



INTEGRIDAD DEL ADN ESPERMÁTICO Y LA TOXICIDAD REPRODUCTIVA DEL NITRATO DE PLOMO EN RATONES MACHOS ADULTOS

SPERM DNA INTEGRITY AND REPRODUCTIVE TOXICITY OF LEAD NITRATE IN ADULTS MALES MICE

Jonathan H. Vásquez Cavelo^{1,2a} , José M. Gonzáles Daga^{1,2b} , Rosmary Y. López Sam^{1,2b} , Pilar V. Pino Velásquez^{1c} 
José L. Pino Gaviño^{1,3a} , Betty Shiga Oshige^{1,3a} 

RESUMEN

Introducción: La toxicidad del plomo se ha relacionado a diferentes patologías en humanos y varias evidencias sugieren una fuerte relación con el daño observado sobre la función reproductiva en humanos y roedores. **Método:** Se proporcionó a ratones una dosis única de nitrato de plomo (NP) (50mg/kg/pc), los cuales fueron eutanizados siete días postinyección con el objetivo de evaluar los espermatozoides que han salido de los túbulos seminíferos y están en tránsito por el epidídimo; además, se evaluó la fragmentación del ADN espermático mediante el ensayo TUNEL. **Resultados:** La disminución del peso corporal en ratones, tratados con NP ($p < 0,05$), sugiere un efecto tóxico sistémico. Sin embargo, no sucedió lo mismo sobre el sistema reproductivo, debido a que los pesos de los testículos, epidídimos, próstata y vesícula seminal no fueron alterados ($p > 0,05$); de igual manera, los valores fisiológicos como conteo y movilidad espermática no disminuyeron con el tratamiento ($p > 0,05$). El tránsito y maduración de los espermatozoides en el epidídimo no sería afectado por el NP, y al observar aumento en la fragmentación del ADN espermático en el grupo tratado ($p > 0,05$), la protaminación espermática estaría cumpliendo su rol protector sobre el material genético murino, por lo que no hubo daños genotóxicos por el NP. **Conclusión:** La administración intraperitoneal de 50mg/kg/pc de NP, por siete días, no causa toxicidad sistémica ni efecto en la espermatogénesis en ratón.

Palabras clave: Concentración espermática; Fragmentación del ADN; Movilidad espermática; Nitrato de plomo, Protaminación espermática. (Fuente: DeCS- BIREME)

ABSTRACT

Introduction: Lead toxicity has been linked to different diseases in humans and several evidences suggest a strong relationship with the observed damage on reproductive function in humans and rodents. **Methods:** Mice were given a single dose of lead nitrate (NP) (50mg/kg/bw), which were euthanized seven days post-injection with the aim of evaluating sperm to come out from the seminiferous tubules and are in transit through the epididymis. Also, the TUNEL test was done to evaluate the sperm DNA fragmentation. **Results:** The decrease in body weight in mice treated with LN ($p < 0.05$), suggest a toxic systemic effect. However, the same didn't happen on the reproductive system because the weights of the testes, epididymis, prostate and seminal vesicles were not altered ($p > 0.05$), in the same way physiological values such as sperm concentration and motility didn't decrease with the treatment ($p > 0.05$). Transit and sperm maturation in the epididymis would not be affected by the LN, and because we did not observe increased sperm DNA fragmentation in the treated group ($p > 0.05$), sperm protamination would be fulfilling its protective role on murine genetic material avoiding genotoxic damage by LN. **Conclusion:** The intraperitoneal administration of 50mg/kg/pc of LN for seven days does not cause systemic toxicity or effect on spermatogenesis in mice.

Keywords: Sperm concentration; DNA fragmentation; Sperm motility; Lead nitrate; Sperm protamination. (Source: MESH-NLM)

¹ Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo, Departamento de Zoología. Instituto de Investigación en Ciencias Biológicas "Antonio Raimondi" (ICBAR). Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Lima, Perú.

² Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal. Instituto de Investigación en Ciencias Biológicas "Antonio Raimondi", Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM. Lima, Perú.

³ Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRNA) Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Lima, Perú.

^a Biólogo

^b Magister en Biología Molecular

^c Magister en Procedimientos en Reproducción Asistida.

Citar como: Vásquez Cavelo JH, Gonzáles Daga JM, López Sam RY, Pino Velásquez PV, Pino Gaviño JL, Shiga Oshige B. Integridad del ADN espermático y la toxicidad reproductiva del nitrato de plomo en ratones machos adultos. Rev Fac Med Hum. 2023;23(2):24-30. doi 10.25176/RFMH.v23i2.5637

Journal home page: <http://revistas.urp.edu.pe/index.php/RFMH>

Artículo publicado por la Revista de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Ricardo Palma. Es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons: Creative Commons Attribution 4.0 International, CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada. Para uso comercial, por favor póngase en contacto con revista.medicina@urp.pe





INTRODUCCIÓN

La población, en general, está expuesta a metales a baja concentración en forma voluntaria, por consumo de suplementos alimenticios, o involuntarias, a través de la ingesta de agua o alimentos contaminados y por el contacto con suelos, polvo y aire contaminados⁽¹⁾. Entre los metales pesados, el plomo es un contaminante ampliamente distribuido en todos los sistemas ambientales y biológicos⁽²⁾. La detección y prevención de la toxicidad del plomo es un problema importante de salud pública⁽³⁾. Si bien la exposición de la población al plomo ha disminuido en las últimas tres décadas, con la introducción de pinturas bajas en plomo, petróleo sin plomo y la prohibición de soldaduras de plomo en latas de alimentos⁽⁴⁾, aún permanece la exposición subclínica en otras fuentes como tuberías de plomo, juguetes de plomo, insecticidas, refinerías de petróleo, material de construcción, balas de armas de fuego, rayos-X y subproductos industriales⁽¹⁾. Se debe agregar la alta exposición sobre las poblaciones que habitan cerca de las minas, relaves y depósitos de este metal como en la Oroya y el Callao, donde se han reportado altos niveles de plomo en la sangre de los habitantes, especialmente en niños⁽⁵⁾ e incluso, en recién nacidos⁽⁶⁾, por lo que su potencial riesgo sobre la salud humana es aún un tema de mucho debate.

La toxicidad del plomo se ha relacionado a diferentes patologías en humanos⁽⁷⁾ y se sugiere su relación con el daño observado sobre la función reproductiva en humanos y roedores^(8,9). La mayoría de reportes indican que trabajadores expuestos a Pb+2 exhiben una densidad espermática disminuida y una alta tasa de teratozoospermia⁽¹⁰⁾. El plomo se encuentra en la naturaleza como un óxido o sal; así, el acetato de plomo (AP) ha mostrado producir infertilidad en ratones^(11,12); la evaluación desde la primera a quinta semana postinyección de AP en dosis única de 100 mg/kg de peso corporal (pc), aumentó el estrés oxidativo y las anomalías morfológicas del espermatozoide, mientras que disminuyó el recuento espermático en la cola del epidídimo⁽¹³⁾.

A su vez, el nitrato de plomo (Pb(NO₃)₂) (NP) tiene una multitud de usos y es un producto de importancia económica⁽¹⁴⁾; es embriotóxico en ratas⁽¹⁵⁾ pero no teratogénico⁽¹⁶⁾ y sus efectos genotóxicos aún son muy controversiales^(17,18). Se ha reportado que 44,8 mg/kg/pc de NP induce daño en el ADN de células sanguíneas aún después de siete días de exposición⁽¹⁴⁾.

El mecanismo por el cual el plomo ejercería efectos tóxicos sobre el sistema reproductivo aún no ha sido

consecuente generación de especies reactivas de oxígeno (EROs)^(13,19). El daño por EROs conlleva a infertilidad por dos mecanismos: daño a la membrana espermática que disminuye la movilidad del espermatozoide y su capacidad para fusionarse con el ovocito, y el daño al ADN espermático que altera la contribución genómica paterna hacia el embrión. La fragmentación del ADN espermático se ha relacionado a muchos aspectos reproductivos⁽²⁰⁾ y es predictivo de las tasas de fertilización y embarazo⁽²¹⁾ lo que demuestra la importancia de su evaluación.

En la actualidad, no existe ningún reporte acerca del efecto del NP sobre la integridad del ADN espermático y considerando que la exposición al plomo sigue siendo un serio problema de salud pública, este trabajo intenta esclarecer si una dosis única de NP (50mg/kg/pc) afecta las características reproductivas masculinas y la integridad del ADN espermático evaluadas siete días postinyección.

MÉTODOS

Diseño y área de estudio

Estudio experimental preclínico de casos y controles, área de biología experimental.

Población y muestra

La muestra estuvo conformada por ratones machos (N = 20) (*Mus musculus*) de 6-7 semanas de edad, de la cepa Balb C; el grupo casos (GT) (experimental), 10 ratones, a quienes se les administró intraperitonealmente (ip) una dosis única de nitrato de plomo (50 mg/kg/pc); el grupo control (GC) lo integró 10 ratones, los cuales recibieron, por la misma vía, agua bidestilada. Todos fueron mantenidos en condiciones de bioterio: temperatura de 25 °C a 27 °C, con libre acceso a la comida balanceada (Purina-Perú), agua ad libitum y un fotoperíodo de 14/10 horas luz/oscuridad.

Variables

Variables independientes: Sexo (macho, tratamiento ratones machos).

Variable dependiente: Calidad reproductiva del ratón macho. Se realizó una ficha de recolección de datos con todas las variables del estudio de investigación donde se registraron los hallazgos encontrados.

Procedimientos

1. Tratamiento: Los ratones fueron divididos en dos grupos: al grupo tratado (GT) (n = 10) se les administró el NP, siete días postinyección, se registró el peso corporal y los animales fueron eutanizados por





dislocación cervical; se registró el peso de los testículos, epidídimos, próstata y vesícula seminal mediante una balanza analítica con 0,001 g de sensibilidad. Este tiempo de evaluación postinyección permite analizar a los espermatozoides luego de su tránsito por el epidídimo⁽²²⁾. Se registró la concentración y movilidad espermática; la fragmentación del ADN espermático fue evaluada por la técnica TUNEL.

2. Obtención de los espermatozoides: Se diseccionó la cola del epidídimo, se lavó con PBS (pH 7,4) y en 0,5ml de medio Flushing (MediCult®, Copenhagen, Dinamarca), se realizaron varias incisiones, lo que permitió la liberación de los espermatozoides durante 10 minutos a 37 °C, el contenido espermático se recuperó en su totalidad en tubos de polipropileno de 1,5 ml (Axygen Scientific).

3. Evaluación de la Movilidad y concentración espermática: Se consideró que un espermatozoide presentaba movilidad progresiva (MP), cuando se desplazaba, movilidad no progresiva (MNP) a aquellos que no se desplazaban y solo tenían un movimiento in situ e Inmóviles (I), los que no presentaban ningún tipo de movimiento⁽²³⁾. El recuento espermático se realizó en una cámara de Neubauer.

4. Fragmentación del ADN espermático: La fragmentación del ADN espermático se evaluó mediante el ensayo TUNEL, el cual evalúa la presencia de extremos 3'-hidroxil libres, los cuales son identificados por la enzima TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) que cataliza la adición de deoxiuracilos trifosfatos marcados con fluorescencia en las roturas de las hebras del ADN. Se utilizó el Kit In Situ Cell Death (Roche, Perú); en resumen y siguiendo las instrucciones del proveedor, la técnica consiste en fijar los espermatozoides con 4 % de paraformaldehído, lavar en PBS, permeabilizar la membrana

de los espermatozoides e incubar una hora con la enzima TdT a 37 °C y en oscuridad. Se incluyó un control positivo, el cual se incubó con 50 unidades de ADNasas por 30 minutos a 37 °C antes de colocar la enzima, y un control negativo al cual no se añadió enzima. La visualización de los espermatozoides se realizó en un microscopio de fluorescencia y el color verde evidenció daño al ADN espermático. Se analizaron 250 células por cada individuo.

Análisis estadísticos

Los resultados fueron evaluados usando el paquete estadístico SPSS 17,0 para Windows. Se realizó el test de Shapiro Wilk y Leneve para comprobar normalidad y homocedasticidad de los datos. Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante la prueba t-Student (pesos, movilidad y concentración espermática) y U de Mann Whitney (fragmentación del ADN espermático). Los resultados son expresados como media \pm EE (error estándar), n=10. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Aspectos éticos

El cuidado y manejo de los animales se realizó de acuerdo con las pautas éticas de nuestra institución y del Consejo Nacional de Investigación para el cuidado y uso de animales de laboratorio⁽²⁴⁾.

RESULTADOS

Se observaron diferencias significativas entre los pesos corporales final e inicial durante el experimento; fue menor y negativa en el grupo NP ($p < 0,05$) (Tabla 1). Los pesos de los órganos reproductivos: testículos, epidídimos, próstata, vesícula seminal (Tabla 1), los valores fisiológicos de movilidad (Figura 1) y concentración espermática (Figura 2).

Tabla 1. Diferencia del peso corporal, pesos de testículo, epidídimo, próstata, vesícula seminal en el grupo de tratamiento Pb(NO₃)₂ (50mg/kg/pc) vs Control (H₂O). * $p < 005$, Student's test. Media \pm Error estándar (EE), n=10.

	Control (H ₂ O)	Pb(NO ₃) ₂ (50mg/kg/pc)
Δ Peso Corporal	1,7752 \pm 0,5694*	0,1632 \pm 0,0991
Peso Testículo	0,0913 \pm 0,0030	0,0932 \pm 0,0037
Peso Epidídimo	0,0295 \pm 0,0011	0,0302 \pm 0,0016
Peso Próstata	0,0122 \pm 0,0012	0,0129 \pm 0,0011
Peso Vesícula Seminal	0,2591 \pm 0,0291	0,2675 \pm 0,0476

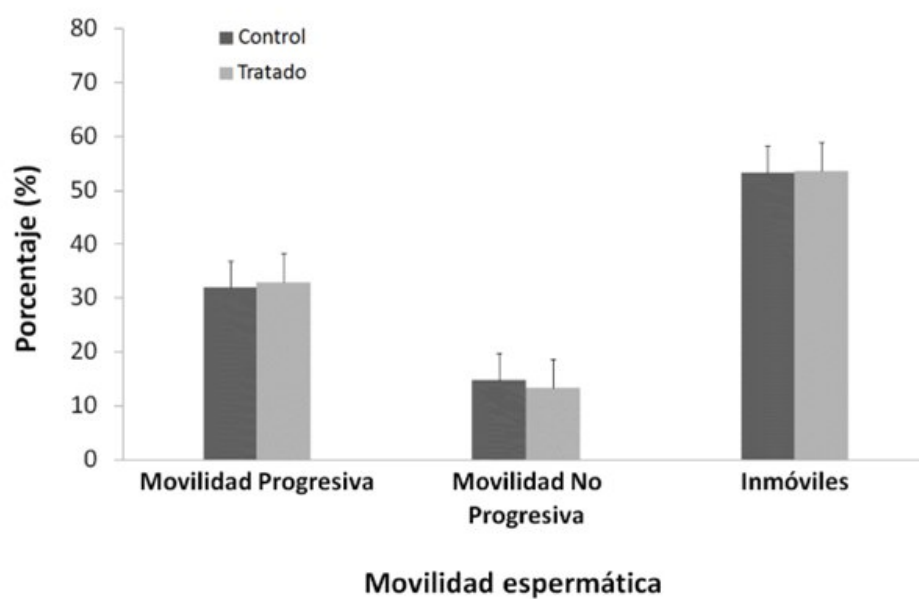


Figura 1. Movilidad espermática en el grupo de tratamiento $Pb(NO_3)_2$ (50mg/kg/pc) vs Control (H_2O). Student's test. Media \pm Error estándar (EE), n=10.

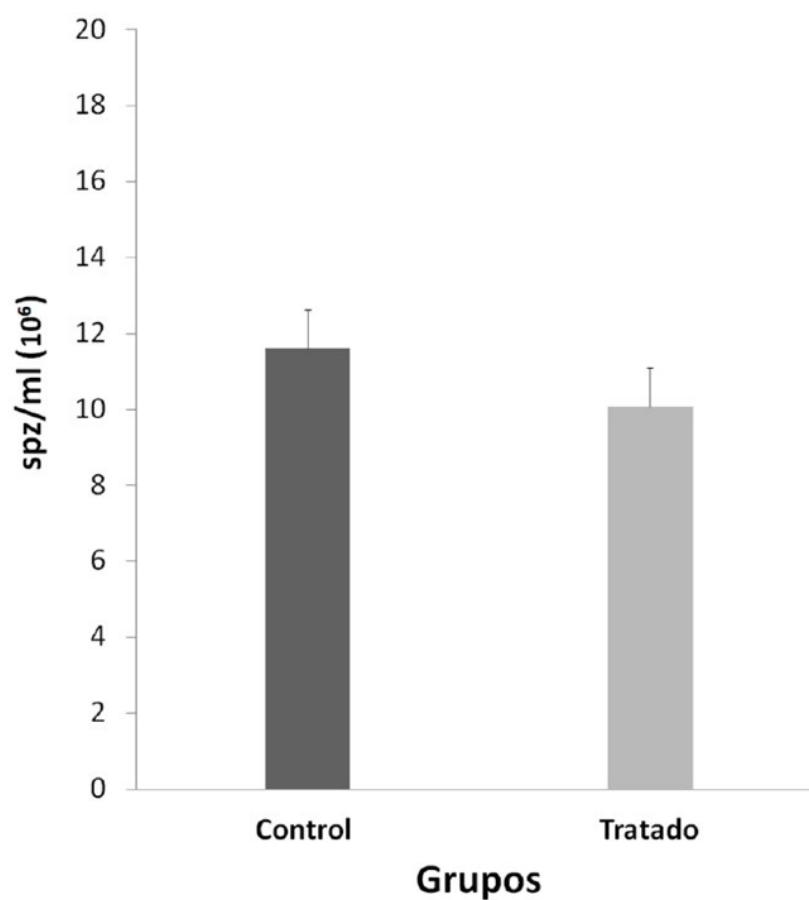


Figura 2. Concentración espermática en el grupo de tratamiento $Pb(NO_3)_2$ (50mg/kg/pc) vs Control (H_2O). Student's test. Media \pm Error estándar (EE), n=10.

Tabla 2. Test de fragmentación del DNA (TUNEL) de células espermáticas de ratón tratadas con nitrato de plomo frente al control.

	Control (H ₂ O)	Pb(NO ₃) ₂ (50mg/kg/pc)
Fragmentación del ADN	0,2	0,8

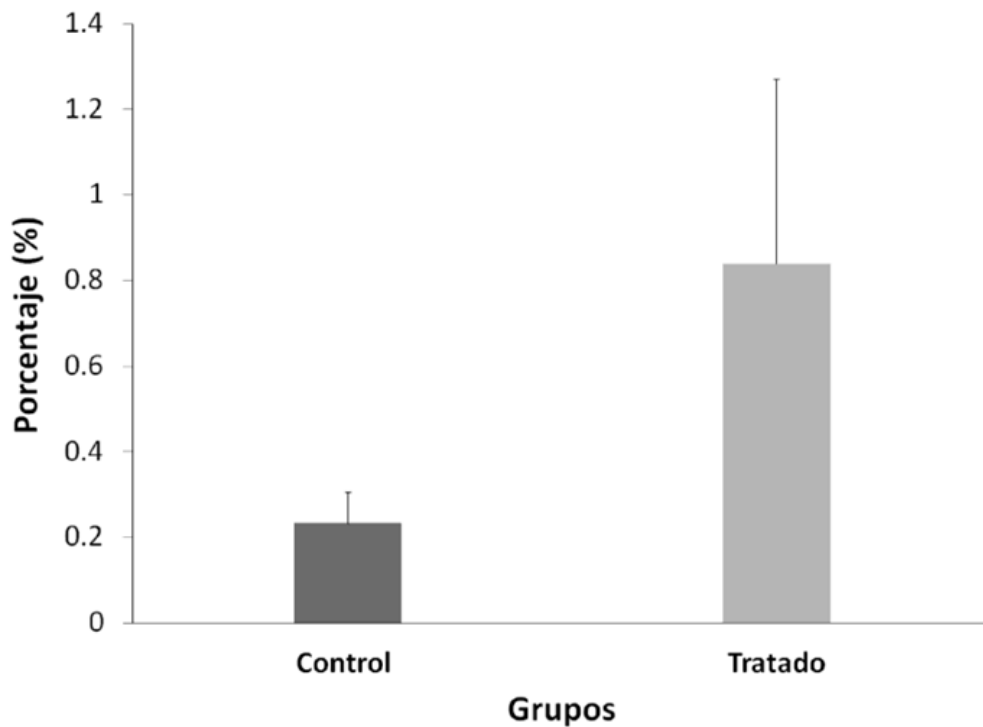


Figura 3. Fragmentación del ADN espermático en el grupo de tratamiento Pb(NO₃)₂ (50mg/kg/pc) vs Control (H₂O). Mann-Whitney U-test. Media ± Error estándar (EE), n=10.

La fragmentación espermático evaluada con TUNEL entre ambos grupos no fue alterada después del tratamiento con NP ($p > 0.05$) (Figura 3); el control positivo en esta prueba fue 99% y el control negativo, 0%. Las fragmentaciones del ADN no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

El presente trabajo intenta investigar los efectos de una dosis única de NP en espermatozoides de ratón. Se evidenció un efecto tóxico sistémico del NP al disminuir el peso corporal de los ratones tratados (Tabla 1, $p < 0,05$). Sin embargo, los pesos de los testículos, epidídimos, próstata y vesícula seminal, que son órganos blanco dependientes de andrógenos (25), no disminuyeron, por lo cual el NP no estaría ejerciendo un efecto tóxico ni antiandrogénico sobre el sistema

reproductor masculino (Tabla 1, $p > 0,05$). El NP no ejercería un efecto localizado sobre la fisiología espermática, debido a que no se observaron diferencias significativas en la movilidad y concentración espermática entre ambos grupos (Figura 1 y Figura 2, $p > 0,05$); el tránsito y maduración de los espermatozoides en el epidídimo no sería afectada por el NP. En esta investigación, dentro del ciclo espermatogénico del ratón, se evaluaron los espermatozoides depositados en el epidídimo (22), los que ya han intercambiado sus histonas por protaminas; ello permite condensar fuertemente el genoma paternal dentro del núcleo (26). Mientras que las histonas de una célula somática compactan el ADN y forman nucleosomas; las protaminas, proteínas exclusivas de los espermatozoides, enrollan y condensan el ADN en subunidades mucho más grandes, conocidas como

toroides⁽²⁶⁾. De esta manera, la cromatina espermática experimenta una fuerte compactación, seis veces más que en una célula somática⁽²⁷⁾ y protege la integridad del ADN espermático^(25,27,28).

Sin embargo, los múltiples residuos de cisteína que rodean el núcleo espermático son oxidados para formar puentes disulfuros entre las protaminas y estabilizar la cromatina durante los estados finales de la maduración espermática⁽²⁸⁾, con lo que se consigue la completa protección del ADN espermático recién en el propio epidídimo. Devi⁽¹⁴⁾ observó daño en el ADN de células sanguíneas en ratones evaluados siete días postadministración de una dosis de NP (44,8 mg/kg/pc), concentración similar usada en este trabajo (50 mg/kg/pc). Por ello, se esperaba que el NP cause daño al ADN de los espermatozoides; sin embargo, nuestros resultados demuestran lo contrario (Figura 3, $p > 0,05$), lo que pone en evidencia la importancia de la protaminación como mecanismo de protección del espermatozoide frente al NP⁽²⁹⁾.

A su vez, el epidídimo al poseer una gran cantidad de enzimas antioxidantes⁽³⁰⁾, podría contrarrestar de manera adecuada el bien documentado efecto del

plomo sobre la inducción de EROs en distintos tejidos⁽³¹⁾. En otro aspecto, se ha demostrado que los efectos del plomo sobre el sistema reproductivo dependen del tiempo de exposición y retornan a valores normales después de un tiempo prolongado de exposición⁽³²⁾, lo que sugiere que un animal expuesto a este metal es capaz de adaptarse a sus efectos tóxicos; en el presente trabajo, al administrar dosis única de NP se descarta la posibilidad de no observar daño al sistema reproductor, fisiología espermática e integridad del ADN espermático, debido a un prolongado tiempo de exposición al NP. Como limitaciones del estudio, se tuvo la naturaleza logística en la institución donde se desarrolló el trabajo, principalmente de índole de cortes de luz durante los fines de semana que perjudicó la dosificación y la continuidad del seguimiento de los animales. Además, la imposibilidad de ingreso los días domingo al pabellón de investigación por falta de personal de vigilancia. Todo esto ocasionó retrasos y repetición del diseño experimental.

CONCLUSIÓN

Una dosis única de nitrato de plomo 50mg/kg/pc no altera parámetros reproductivos ni ejerce daño sobre al ADN espermático en ratones.

Contribuciones de autoría: Los autores participaron en la génesis de la idea, diseño del proyecto, desarrollo, recolección e interpretación de data, análisis de resultados y preparación del manuscrito.

CVCH participó en la conceptualización, investigación, metodología, recursos y redacción del borrador original.

Financiamiento: Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Proyecto con fondos monetarios, Código 091001301).

Correspondencia: José Luis Rafael Pino Gaviño.

Dirección: Av. German Amézaga 375, cercado Lima-Perú.

Teléfono: 992169186

Correo electrónico: jpino@unmsm.edu.pe

Conflictos de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de interés en la publicación de este artículo.

Recibido: 21 de Noviembre, 2022.

Aprobado: 13 de Febrero, 2023.

REFERENCIAS

1. Meeker J., M. Rossano, B. Protas et al. Cadmium, Lead, and Other Metals in Relation to Semen Quality: Human Evidence for Molybdenum as a Male Reproductive Toxicant. *Environmental Health Perspectives* 2008; 116(11):1473-1479. doi: [10.1289/ehp.11490](https://doi.org/10.1289/ehp.11490)
2. Beliles, R. Metals. En: *Toxicology. The basic science of poison*. 1975; 454-502. Eds. Casarett L. and Doull J. Macmillan Publishing Co. New York. Disponible en: https://jawaidzai.files.wordpress.com/2013/09/casarett_and_doull_s_toxicology_the_basic_science_of_poisons_7th_edition_2008.pdf
3. Hamadouche A., M. Slimani, B. Merad-Boudia, et al. Reproductive Toxicity of Lead Acetate in Adult Male Rats. *Am. J. Sci. Res.* 2009; 3:38-50. doi: [10.4172/2157-7099.1000293](https://doi.org/10.4172/2157-7099.1000293)
4. Spivey A. The weight of lead: effects add up in adults. *Environ. Health. Perspect.* 2001; 115:131-136. doi: [10.1289/ehp.115-a30](https://doi.org/10.1289/ehp.115-a30)
5. Astete J., W. Cáceres, M. Gastañaga, et al. Intoxicación por plomo y otros problemas de salud en niños de poblaciones aledañas a relaves mineros. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública* 2009; 26:15-19. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v26n1/a04v26n1.pdf>
6. Pebe G., H. Villa, L. Escat, et al. Niveles de plomo sanguíneo en recién nacidos de La Oroya, 2004-2005. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública* 2008; 25:355-360. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v25n4/a02v25n4.pdf>



7. Kumar B. and Krishnaswamy K. Detection of subclinical lead toxicity in monogametes. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1995; 54:863-869. doi: [10.1007/BF00197971](https://doi.org/10.1007/BF00197971)
8. Bonde J., M. Joffe, P. Apostoli, et al. Sperm count and chromatin structure in men exposed to inorganic lead: lowest adverse effect levels. Occup. Environ. Med. 2002; 59:234-42. doi: [10.1136/oem.59.4.234](https://doi.org/10.1136/oem.59.4.234)
9. Graca A., J. Ramalho-Santos, M. de Lourdes Pereira. Effect of lead chloride on spermatogenesis and sperm parameters in mice. Asian Journal of Andrology 2004; 6:237-241. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15273874/>
10. Benoff S., A. Jacob, I. Hurley. Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. Hum. Reprod. Update 2000; 6:107-121. doi: [10.1093/humupd/6.2.107](https://doi.org/10.1093/humupd/6.2.107)
11. Varma M., S. Joshi, A. Adeyami. 1974. Mutagenicity and infertility following administration to lead sub-acetate to swiss male mice. Experientia 30:486-487. doi: [10.1007/BF01926307](https://doi.org/10.1007/BF01926307)
12. Hackett P., J. Hess, M. Sikov. 1983. Effect of dose level and pregnancy on the distribution and toxicity of intravenous lead in rats. J. Toxicol. Environ. Health 9:1007- 1020. doi: [10.1080/15287398209530221](https://doi.org/10.1080/15287398209530221)
13. Acharya U., Acharya S., Mishra M. Lead Acetate induced cytotoxicity in male germinal cells of Swiss Mice. Industrial Health 2003; 41(3):291-4. doi: [10.2486/indhealth.41.291](https://doi.org/10.2486/indhealth.41.291)
14. Devi K., B. Banu, P. Grover, et al. Genotoxic effect of lead nitrate on mice using SCGE (comet assay). Toxicology 2000; 14:195-201. doi: [10.1016/S0300-483X\(00\)00154-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00154-2)
15. McClain R. and B. Becker. Teratogenicity, fetal toxicity and placental transfer of lead nitrate in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1975; 31:72-82. doi: [10.1016/0041-008X\(75\)90053-8](https://doi.org/10.1016/0041-008X(75)90053-8)
16. McClain R. and J. Sierkierka. The effects of various chelating agents on the teratogenicity of lead nitrate in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1975; 31:434-442. doi: [10.1016/0041-008X\(75\)90266-5](https://doi.org/10.1016/0041-008X(75)90266-5)
17. Zelikoff J., J. Li, A. Hartwig, et al. Genetic toxicology of lead compounds. Carcinogenesis 1988; 9:1727-1732. doi: [10.1093/carcin/9.10.1727](https://doi.org/10.1093/carcin/9.10.1727)
18. Lin R., C. Lee, W. Chen, et al. Studies on cytotoxic and genotoxic effects of cadmium nitrate and lead nitrate in Chinese hamster ovary cells. Environ. Mol. Mutagen. 1994; 23:143-149. doi: [10.1002/em.2850230212](https://doi.org/10.1002/em.2850230212)
19. Hsu P., M. Liu, L. Chen, et al. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in rat sperm. Toxicology 1998; 128:169-179. doi: [10.1016/S0300-483X\(98\)00068-7](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(98)00068-7)
20. Aitken John, De Luliis, Geoffry, McLachlan Robert. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. Inter. J. Androl 32(1):46-56. doi: [10.1111/j.1365-2605.2008.00943.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2008.00943.x)
21. Lewis S. and R. Aitken. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. Cell Tissue Res. 2005; 322:33-41. doi: [10.1007/s00441-005-1097-5](https://doi.org/10.1007/s00441-005-1097-5)
22. Piña-Guzmán B., M. Solís-Heredia, B. Quintanilla-Vega. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2005; 202:189-198. doi: [10.1016/j.taap.2004.06.028](https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.06.028)
22. Piña-Guzmán B., M. Solís-Heredia, B. Quintanilla-Vega. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2005; 202:189-198. doi: [10.1016/j.taap.2004.06.028](https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.06.028)
23. World Health Organization. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 2010., fifth ed. Switzerland. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44261>
24. National Research Council. 1996. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academy Press. Washington, D.C. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK232589/>
25. Trentacoste S., A. Friedmann, R. Youker, et al. Atrazine effects on testosterone levels and androgen-dependent reproductive organs in peripubertal male rats. J. Androl. 2001; 22:142-148. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11191080/>
26. Aoki Vincent, Carrell Douglas. Human protamines and the developing spermatid: Their structure, function, expression and relationship with male infertility. Asian J. Androl. 2004; 5(4):315-24. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14695982/>
27. Balhorn R., L. Brewer, M. Corzett. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. Mol. Reprod. Dev. 2000; 56:230-234. doi: [10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200006\)56:2<230::AID-MRD3>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200006)56:2<230::AID-MRD3>3.0.CO;2-V)
28. McLay D. and H. Clarke. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. Reproduction 2003; 125:625-33. doi: [10.1530/rep.0.1250625](https://doi.org/10.1530/rep.0.1250625)
29. Oliva R. and G.H. Dixon. Cohn W.E, Moldave K., eds. In: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. Academic Press, San Diego. 1991; Pp. 26-96. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/progress-in-nucleic-acid-research-and-molecular-biology/cohn/978-0-12-540056-5>
30. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility - a clinical perspective. Hum. Reprod. Update 2008; 14:243-258. doi: [10.1093/humupd/dmn004](https://doi.org/10.1093/humupd/dmn004)
31. Patrick L. Lead toxicity part II: The role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. Altern. Med. Rev. 2006. 11:114-127. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16813461/>
32. Gorbel F., M. Boujelbene, F. Makni-Ayadi, et al. Cytotoxic effects of lead on the endocrine and exocrine sexual function of pubescent male and female rats. Demonstration of apoptotic activity. Compens Rendus Biologies 2002; 325:927-940. doi: [10.1016/S1631-0691\(02\)01492-0](https://doi.org/10.1016/S1631-0691(02)01492-0)