

EFECTO DE LA EXPOSICIÓN AL CLORURO DE CADMIO SOBRE LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS BOVINOS

Effects of Cadmium Chloride Exposure on *in vitro* Maturation of Bovine Oocytes

Bellalíz E. Rodríguez Tellez¹, Letty Marcano² y Patricia C. Villamediana Monreal¹

¹Laboratorio de Citogenética. ²Laboratorio de Biología Celular.

Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Apartado Galerías 15692. E-mail: pcvmonreal@cantv.net

RESUMEN

Se estudió el efecto del cadmio sobre la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos. Ovocitos recuperados a partir de ovarios bovinos recolectados en matadero y liberados mediante la técnica de *slicing* fueron madurados en TCM199 durante 24 h a 38,5°C en una atmósfera con 5% CO₂ en aire saturado de humedad, en presencia de 0, 1, 5 y 10 ppm de cloruro de cadmio. Al finalizar el cultivo, los ovocitos fueron fijados en etanol:ácido acético (3/1 v/v) a 4°C durante al menos 24 h para luego teñirlos con aceto-orceína al 1,1%, para evaluar el estadio nuclear bajo microscopio óptico. El ANOVA demostró que el cadmio causa un bloqueo meiótico significativo (F = 150,996; P < 0,01) e induce degeneración ovocitaria (F = 89,92; P < 0,01) de manera dependiente de la concentración. El porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de MII fue superior en el grupo control (P < 0,01) en comparación con los expuestos al metal a las diferentes concentraciones estudiadas. Se establece una correlación inversa altamente significativa entre el porcentaje de ovocitos madurados y la concentración del metal en el medio (r = 0,818; P < 0,01), mientras que el porcentaje de ovocitos degenerados muestra una correlación directa altamente significativa (r = 0,842; P < 0,01). Además se apreciaron aberraciones cromosómicas tales como: picnosis, stekinesis y puentes anafásicos. Se demostró el efecto deletéreo del cadmio sobre los ovocitos bovinos, reflejado en un bloqueo de la maduración *in vitro*, la inducción de degeneración y aberraciones cromosómicas.

Palabras clave: Cadmio, ovocito, bovino, maduración *in vitro*, toxicología.

ABSTRACT

The effects of cadmium chloride on *in vitro* maturation of bovine oocytes were studied. Ovaries were collected from slaughterhouse cows and oocytes recovered by the slicing technique. Oocytes were matured in TCM199 for 24h at 38.5°C in 5%CO₂ in air, in presence of 0, 1, 5 and 10 ppm of cadmium chloride. At the end of culture oocytes were fixed for 24 h in ethanol:acetic acid (3:1 v/v) at 4°C. They were then stained *in toto* with 1.1% acetic orcein and the nuclear stage was observed under optic microscope. The ANOVA showed that cadmium caused a significant blockage of meiotic maturation (F = 150.996; P < 0.01) and induced oocyte degeneration (F = 89.92; P < 0.01) in concentration dependent manner. The percentage of oocytes that reached the MII stage was greater in control group (P < 0.01) than in the cadmium-treated oocytes. A highly significant inverse correlation was established between the percentage of matured oocytes and the metal concentration in the medium (r = 0.818; P < 0.01), while the percentage of oocyte degeneration showed a highly significant direct correlation (r = 0.842; P < 0.01). Furthermore, chromosomal aberrations were observed, such as: picnosis, stekinesis and anaphasic bridges. Hence, a deleterious effect of cadmium chloride on *in vitro* matured oocytes by a blockage of meiotic maturation, induction of degeneration and chromosomal aberrations was established.

Key words: Cadmium, oocytes, bovine, *in vitro* maturation, toxicology.

INTRODUCCIÓN

Los metales pesados constituyen los mayores contaminantes químicos tanto en países desarrollados como subdesarrollados; sus efectos biológicos en organismos expuestos incluyen alteraciones hematológicas, metabólicas, inmunitarias, desarrollo embrionario, e incluso un incremento en la incidencia de neoplasias [20].

Con el desarrollo industrial su presencia se ha incrementado considerablemente, hasta el punto que la Organización Panamericana de la Salud [21], los considera determinantes en los problemas de salud ocupacional. Esto conlleva a que, en suelos agrícolas contaminados con metales pesados, exista la exposición de rumiantes a estos elementos potencialmente tóxicos al pastorear en estas áreas.

Entre los metales pesados considerados como contaminantes ambientales, el cadmio presenta gran interés desde el punto de vista de la toxicología, debido a su gran versatilidad de usos en la fabricación de contenedores de alimentos, alambiques, baterías, pinturas, cueros, aleaciones, etc. [2]. Se encuentra con frecuencia en alimentos, agua y aire, presentando una vida media biológica larga (10-33 años), un bajo nivel de excreción y un poder de acumulación progresivo en el cuerpo, principalmente en el hígado y los riñones [6].

La bioacumulación del cadmio usualmente ocurre en suelos y aguas contaminadas, pasando a los vegetales, de éstos a los animales y finalmente al hombre. Esta cadena se presenta con mayor frecuencia en áreas mineras, aunque también se ha reportado el uso de fosfatos con alto porcentaje de cadmio como fertilizante, por lo que la deposición atmosférica de dicho metal sobre las cosechas en lugares cercanos a las fuentes de emisión y el vertido de lodos contaminados sobre la tierra y el mar, contribuyen en gran medida a la contaminación de los alimentos [2, 29].

En general la vía principal de penetración del cadmio para la población humana es la oral, representando aproximadamente un 70% del metal incorporado por el organismo. La inhalación es otra vía, la cual se ve incrementada en personas fumadoras, ya que el cadmio procedente del tabaco, se incorpora por vía respiratoria [7, 37].

Una vez que el cadmio penetra en el organismo, se fija rápidamente a los tejidos, principalmente en hígado y riñón, combinándose de forma selectiva con una proteína (metalotioneína) compuesta de un alto número de residuos de cisteína [21]; al inducir la actividad de ésta, altera los niveles homeostáticos de cobre y zinc [9]. Al exceder la capacidad de metalotioneína ligada, el cadmio ejerce un efecto tóxico, induciendo alteraciones fisiológicas en el hombre entre las cuales se pueden mencionar neuropatía, alteración del tracto respiratorio, enfisema pulmonar y cáncer de pulmón [4].

Con relación al aparato reproductivo son varios los estudios realizados *in vivo* que relacionan al cadmio con procesos de sensibilidad embriogénica [36], necrosis gonadal, hipertrofia y cariorexis en gametocitos primarios, atresia en gametocitos secundarios [10]; otros tipos de cáncer relacionados con el aparato reproductivo masculino también han sido referidos como consecuencia de la exposición al cadmio [7, 16]. Sin embargo son pocos los estudios *in vitro* que reseñen el efecto del metal sobre el aparato reproductivo femenino, por lo que tomando en consideración los reportes que involucran al cadmio como agente causal de aneuploidías y aberraciones cromosó-

micas [18], alteraciones en la organización microtubular reduciendo la fidelidad del huso mitótico [31]; así como también infertilidad [16, 36], en el presente trabajo se estudió el efecto de diferentes concentraciones de cadmio sobre la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos bovinos, seleccionando para tal efecto las concentraciones consideradas como permisible por la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU: 1×10^{-3} y 5×10^{-3} mg/Kg/día, en agua y comida respectivamente [30].

MATERIALES Y MÉTODOS

Como modelo animal se seleccionaron ovocitos extraídos de ganado bovino, dada la importancia de dicha ganadería en la región. Los ovarios de vacas adultas fueron recogidos en un matadero comercial y transportados en menos de 2 h al laboratorio en PBS (P-4417, Sigma St. Louis, MO, USA), suplementado con gentamicina (50 mg/L; G-1397, Sigma St. Louis, MO, USA) a 35-37°C en contenedores isotérmicos. Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados en PBS + gentamicina a 38,5°C y los complejos cúmulo-ovocito fueron recuperados mediante la técnica de *slicing* que consiste en cortar sucesivamente la superficie del ovario con una hoja de bisturí en una placa de petri conteniendo medio TCM-199 (M-2520, Sigma) suplementado con 2,2 mg/mL NaHCO_3 , 50 µg/mL de gentamicina y 11 mg/L de heparina (H-3393, Sigma), liberándose ovocitos provenientes de folículos de cualquier tamaño [28].

Maduración *in vitro* de los ovocitos y tratamientos con el metal

Se seleccionaron aquellos ovocitos con al menos una capa de células del cúmulo compacto y citoplasma homogéneo y se colocaron en el medio de maduración TCM199/HE-PES (M-7528, Sigma) suplementado con 275 mg/L de piruvato sódico, 50 µg/mL de gentamicina, 146 mg/L de L-glutamina, 20% de suero fetal bovino (FBS, F-4135, Sigma St. Louis, MO, USA) [19]. Se prepararon soluciones madre de 100, 500 y 1000 ppm de Cloruro de Cadmio en agua destilada desionizada, las cuales fueron diluidas 1:100 con medio de maduración para llegar a las concentraciones finales de 1, 5 y 10 ppm de Cloruro de Cadmio. Los complejos cúmulo-ovocito fueron cultivados en grupos de 20 en microgotas de 100 µL de medio cubiertas con aceite mineral durante 24 horas a 38,5°C en una atmósfera con 5% de CO_2 en aire saturado de humedad. Se realizaron tres replicas de cada tratamiento con sus respectivos controles, donde la solución de cadmio fue sustituida por medio de maduración.

Evaluación del estadio meiótico

La valoración de la maduración nuclear se llevó a cabo mediante la tinción *in toto* de los ovocitos con acetoorceína. Pasadas las 24 h de MIV, los ovocitos fueron desnudados mediante pipeteo mecánico repetido y fijados en ácido acético:etanol (1:3) durante al menos 24 horas a 4°C, posteriormente se tiñeron con orceína al 1,1% en ácido acético al 45%,

observándose en un microscopio de contraste de fases. Los ovocitos se analizaron de acuerdo al estadio meiótico, clasificándose en Profase I, Metafase I, Anafase-Telofase I y Metafase II. Los que presentaron material nuclear irregular, dificultando el reconocimiento del estadio meiótico, fueron clasificados como degenerados.

Análisis estadístico

Cada tratamiento fue realizado por triplicado y los datos expresados como la media ± ES; así mismo se realizó una correlación simple para evaluar la progresión meiótica y degeneración a las diferentes concentraciones de cadmio expuestas y un análisis de varianza simple (ANOVA) para determinar el efecto del metal sobre la tasa de maduración y la tasa de degeneración.

El análisis fue realizado según el paquete estadístico SPSS para Windows [27].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del cadmio sobre la progresión de la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos

En la TABLA I se presenta un resumen de la evaluación meiótica de los ovocitos control y expuestos a las diferentes concentraciones de cadmio. Luego del cultivo, se observa que de un total de 119 ovocitos del grupo control (0 ppm de cadmio), 59 alcanzaron la maduración nuclear (Metafase II), correspondiendo a un 49,58% (FIG. 1). Por otro lado, de los 295 ovocitos expuestos al cadmio sólo 35 (11,86%), progresaron hasta el estadio de MII. El análisis estadístico reveló una dife-

**TABLA I
RESUMEN DE LA EVALUACIÓN MEIÓTICA DE LOS OVOCITOS BOVINOS CONTROL Y EXPUESTOS A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CADMIO**

ppm	Total ovocitos	Profase I (%)	Metafase I (%)	Ana-Telo I (%)	Metafase II (%)	Degenerados (%)
0	119	27 (22,69)	23 (19,33)	1 (0,84)	59 (49,58)	9 (7,56)
1	96	11 (11,46)	28 (29,16)	11 (11,46)	24* (25,00)	22* (22,92)
5	109	19 (17,43)	34 (31,19)	6 (5,50)	6* (5,50)	44* (40,37)
10	90	4 (4,44)	38 (42,22)	2 (2,22)	5* (5,55)	41* (45,55)

*: Diferencia significativa con respecto al control con una P < 0,001.

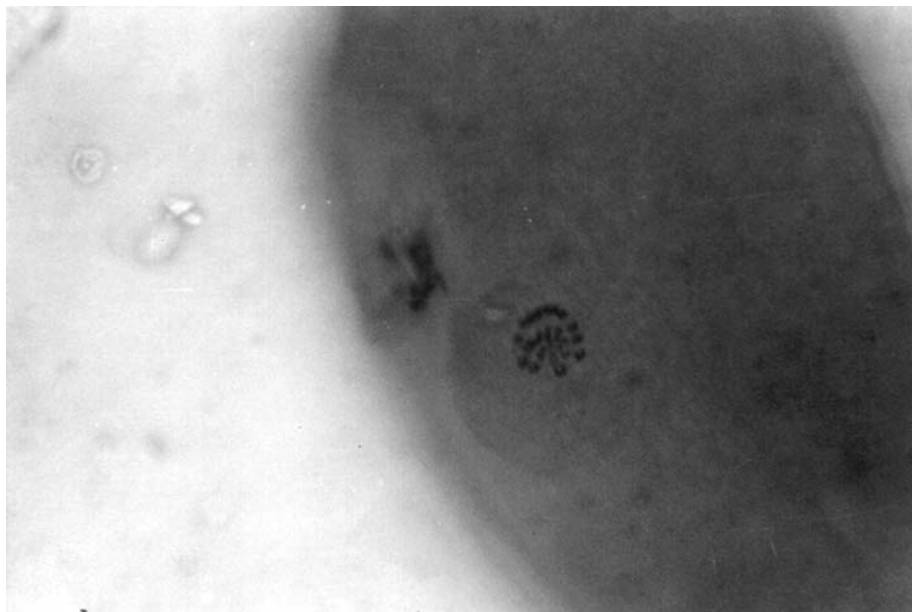


FIGURA 1. OVOCITO CONTROL, SE OBSERVA EL CORPÚSCULO POLAR Y LOS CROMOSOMAS EN ESTADIO DE METAFASE II, INDICANDO MADURACIÓN NUCLEAR. 1000X.

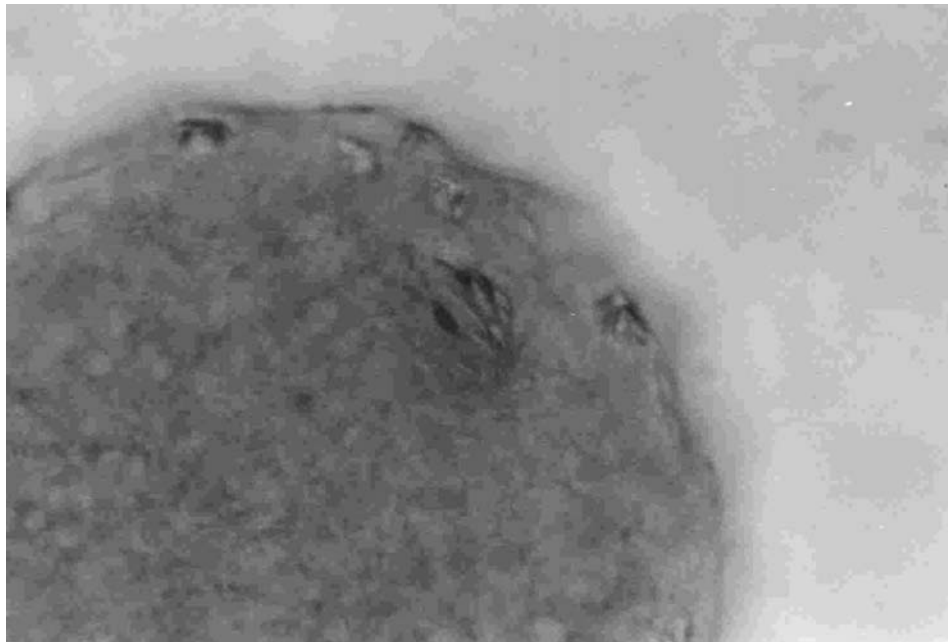


FIGURA 2. OVOCITO TRATADO CON CADMIO⁺² 10 PPM, SE OBSERVA EL MATERIAL NUCLEAR DESORGANIZADO Y PICNÓTICO CARACTERÍSTICO DE DEGENERACIÓN. 1000 X.

rencia significativa ($P < 0,01$) entre los promedios de los controles y los expuestos al metal. Así mismo, el porcentaje de ovocitos clasificados como degenerados (FIG. 2), fue significativamente mayor ($P < 0,01$) en los expuestos al cadmio con respecto a los controles. Al comparar la media de los valores se presenta una diferencia significativa ($P < 0,01$) para todas las concentraciones utilizadas con respecto al control tanto para el porcentaje de ovocitos madurados, como para el porcentaje de degenerados (FIG. 3).

El análisis de correlación de efecto del cadmio se presenta en la TABLA II. En dicho análisis se establece una correlación negativa altamente significativa ($r = -0,825$; $P < 0,01$) del efecto del metal, es decir el porcentaje de ovocitos madurados disminuye conforme se incrementa la concentración del metal; por el contrario la correlación es positiva entre la concentración y el porcentaje de ovocitos degenerados ($r = 0,835$; $P < 0,01$), lo que indica que a mayor concentración del metal, el efecto deletéreo se incrementa; el coeficiente de determinación establece que el 68,1% y 69,9% de los cambios observados en la tasa de maduración y degeneración respectivamente, se deben al efecto del cadmio.

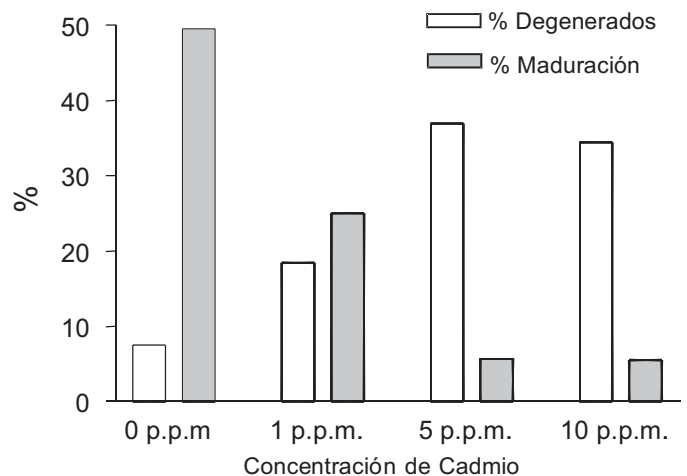


FIGURA 3. EFECTOS DEL CADMIO SOBRE EL PORCENTAJE DE OVOCITOS MADURADOS Y DEGENERADOS.

TABLA II
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (R), NIVEL DE SIGNIFICANCIA (P) Y COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R²)
AL RELACIONAR LA CONCENTRACIÓN DE CADMIO CON EL PORCENTAJE DE MADURACIÓN
Y PORCENTAJE DE DEGENERACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS MADURADOS *IN VITRO*

	N	R	R ²	P
% Degenerado	40	0,835	69,9	< 0,01
% Maduración	40	-0,825	68,1	< 0,01

Los resultados coinciden con los reportes de otros autores que establecen un retardo en la maduración de ovocitos expuesto al cadmio [10, 22]. El efecto inhibitorio del metal sobre la maduración incrementa el riesgo de infertilidad y retardo en la concepción en mujeres con exposición ocupacional al cadmio [14, 37]. También se ha involucrado al metal como causal de infertilidad en el hombre [14-16].

Los resultados del ANOVA (TABLA III), reportan un mayor efecto de la concentración de cadmio sobre la degeneración de los ovocitos que sobre el bloqueo de la maduración de los mismos ($F = 87,38$ vs. $F = 81,08$, respectivamente), no obstante ambos efectos deletéreos son significativos ($P < 0,01$), lo cual coincide con los reportes de otros autores que establecen el efecto tóxico y alteraciones morfológicas inducidas por el metal en otros modelos biológicos. Al respecto Rehm y Waalkes [25], evaluando la toxicidad del cadmio en hámster, ratones y ratas, reportan degeneración y necrosis de ovarios dosis-dependiente de la exposición al metal; resultados similares han sido señalados por otros autores, quienes establecen que las alteraciones de los tejidos causadas por el metal pueden conllevar a efectos degenerativos [10, 11, 18, 23] y carcinogénicos [14, 33] en otros sistemas biológicos.

Cambios morfológicos inducidos por el cadmio sobre los ovocitos

Dentro del grupo de ovocitos degenerados se observaron los efectos letales del cadmio sobre las células germinales femeninas, entre las cuales las más frecuentes fueron: picnosis (FIG. 2), stekinesis (FIG.4a) y puentes anafásicos (FIG. 4b). Estas alteraciones cromosómicas ponen en evidencia un efecto genotóxico del metal sobre los cultivos de ovocitos. La heteropicnosis es indicativa de una condensación inusual de la cromatina que podría conllevar a defectos genéticos; por otro lado la stekinesis, fenómeno producido por el doblamiento erróneo de las cromátidas hermanas que permanecen unidas por puentes subcromatínicos, es considerada como un efecto irreversible e indicador de alta toxicidad, siendo causal de otros tipos de aberraciones tales como rupturas cromosómicas, poliploidías, y formación de puentes anafásicos [18, 34]. La inducción de aberraciones cromosómicas se puede vincular con los reportes que establecen que el cadmio es capaz de producir daños y/o inhibición de los mecanismos de reparación en el DNA [8, 26], así como también de la transcripción de RNAr en cultivos celulares expuestos al metal [17]. El efecto genotóxico inducido por el cadmio ha sido reportado en diversos sistemas biológicos [11, 18, 35].

TABLA III

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CADMIO SOBRE EL PORCENTAJE DE DEGENERADOS Y PORCENTAJE DE MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS MADURADOS *IN VITRO*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados	F	P
% Degenerados	4023,853	1	4023,853	87,383	$P < 0,01$
Residual	1749,849	38			
% Maduración	8876,356	1	8876,356	81,088	$P < 0,01$
Residual	4159,692	38	109,466		

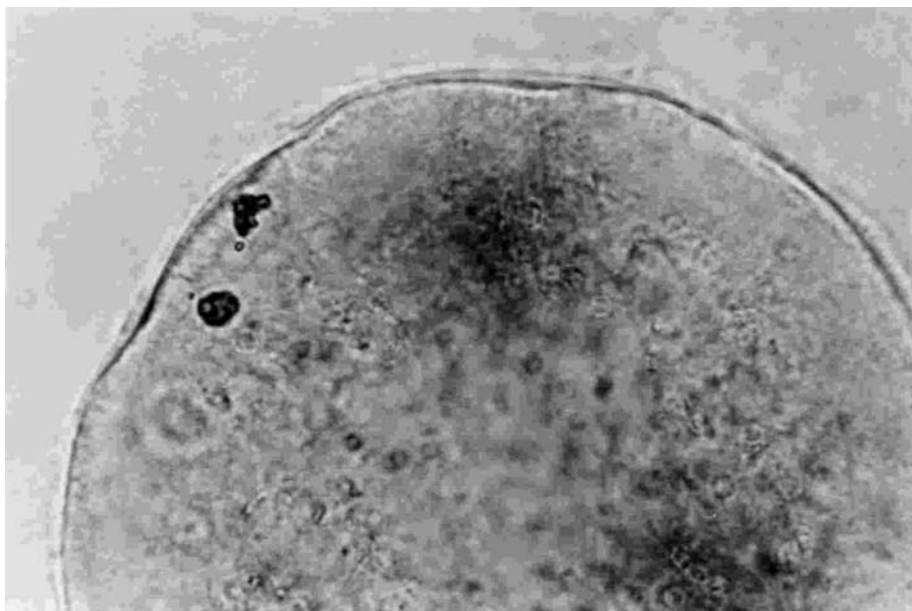


FIGURA 4A. OVOCITO TRATADO CON CADMIO⁺² 5 PPM, SE OBSERVA MATERIAL NUCLEAR DESORGANIZADO SIN DIFERENCIACIÓN COMO ESTRUCTURAS INDIVIDUALIZADA DE LOS CROMOSOMAS EN METAFASE II PRODUCTO DE LA STEKINESIS. 1000X.



FIGURA 4B. OVOCITO TRATADO CON CADMIO⁺² 5 PPM, SE OBSERVA LA FORMACIÓN DE PUENTES ANAFÁSICOS (←) POR EL EFECTO STEKINÉTICO INDUCIDO POR EL CADMIO. 1000X.

El mecanismo por el cual el cadmio induce su toxicidad en el material biológico estudiado podría estar relacionado con su efecto antagónico con el calcio, interfiriendo con una gran variedad de procesos metabólicos [32]; por ejemplo se conoce que inhibidores del Ca^{+2} bloquean la ruptura de la vesícula germinal por elevación de los niveles de AMPc en los ovocitos con la consecuente inhibición de la maduración [29]; también se ha reportado un efecto inhibitorio del cadmio sobre la proteína quinasa dependiente del AMPc (PK-A) [1], enzima responsable de la fosforilación de proteínas necesarias para la ruptura de la vesícula germinal en la maduración de los ovocitos [24].

El efecto degenerativo podría ser consecuencia de la acción del metal sobre factores que alteren el estado de oxidoreducción intracelular o la permeabilidad de la membrana plasmática; se ha demostrado que un aumento en la concentración intracelular de glutatión reductasa induce la progresión de vesícula germinal al estado de metafase II [5]; al respecto, Watjen y Beyersmann [34], señalan una disminución en la concentración de glutatión reductasa intracelular inducido por el cadmio, originando un efecto apoptótico debido al estrés oxidativo; Carageorgiou y col. [3], también relacionan la toxicidad ejercida por el cadmio con el estrés oxidativo causado al inhibir la actividad de enzimas como la acetilcolinesterasa, ATPasa Na^+/K^+ y ATPasa Mg^{+2} . Por otro lado, Koizumi y col. [12], establecen que el cadmio produce inhibición de la ATPasa $\text{Na}^{+2}-\text{K}^{+2}$, produciéndose un incremento del Na^{+2} intracelular por lo que ocurre una retención de agua e histólisis celular. Korotkov y col. [13], señalan cambios de permeabilidad de la membrana mitocondrial interna causada por el metal, por lo

cual se da un incremento de la permeabilidad al K^{+2} e H^{+2} . Todas o algunas de estas alteraciones metabólicas podrían ser las responsables de la degeneración de los ovocitos obtenida en este estudio.

CONCLUSIÓN

Se concluye que el cadmio ejerce un efecto deletéreo dependiente de la concentración sobre la maduración, degeneración e inducción de aberraciones cromosómicas en ovocitos bovinos, lo cual pone de manifiesto el riesgo de este contaminante ambiental sobre la capacidad reproductiva del ganado bovino. Se recomienda realizar estudios con otros metales pesados considerados como contaminantes, así como también determinar los niveles de contaminación en zonas de pastoreo del ganado bovino.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia por el financiamiento otorgado para la realización del trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BEYERSMANN, D.; HECHTENBERG, S. Cadmium, gene regulation, and cellular signaling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144(2):247-255. 1997.

- [2] CABRERA, C.; LORENZO, ML.; LOPEZ, MC. Lead and cadmium contamination in dairy products and its repercussion on total dietary intake. **J. of Agricult. Food Chemis.** 43: 1605-1609. 1995.
- [3] CARAGEORGIOU, H.; TZOTZES, V.; PANTOS, C.; MOUROUZIS, C.; ZARROS, A.; TSAKIRIS, S. *In vivo* and *in vitro* effects of cadmium on adult rat brain total antioxidant status, acetylcholinesterase, (Na⁺, K⁺)-ATPase and Mg²⁺-ATPase activities: protection by L-cysteine. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** 94(3):112-8. 2004.
- [4] CROUTE, F.; BEAU, B.; ARRABIT, C.; GAUBIN, Y.; DELMAS, J.; SOLEILHAVOUP, J. Patter of stress protein expression in human lung cell-line A549 after short- or long- term exposure to Cadmium **Environ. Health Perspec.** 108 (1):55-60. 2000.
- [5] EPPIG, L. Further reflections on culture systems for the growth of oocytes *in vitro*. **Hum. Reprod.** 9: 974-981. 1994.
- [6] FOX, M.R.S. Assessment of cadmium, lead and vanadium status of large animals as related to the human food chain. **J. Anim. Sci.** 65, 17.744-52. 1987.
- [7] GROTEN, J. P.; VAN BLADEREN, P. J. Cadmium bioavailability and health risk in food. **Trends Food Sci. Technol.** 5: 50-55. 1994.
- [8] ISHIDO, M.; HOT SUBO, R.; ADACHI, T.; KUNIMOTO, M. Attenuation of both apoptotic and necrotic action of cadmium by bcl-2. **Environ. Health Perspect.** 110: 37-42. 2002.
- [9] KENNISH, M.J. **Ecology of Estuaries: Anthropogenic effects.** CRC Press: Boca Ratón, Fl. ISBN/ISSN: 08493804. 1992.
- [10] KOGAN, M.; LOPEZ, LS.; ROMANO, LA; RODRÍGUEZ, EM. Effects of cadmium on somatic and gonadal growth of juvenil females of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Brachyura: Grapsidae). **Zoological Studies.** 39(4):344-350. 2000.
- [11] KOIZUMI, S.; YAMADA, H. DNA microarray analysis of altered gene expression in cadmium-exposed human cells. **J. Occup. Health.** 45(6):331-4. 2003.
- [12] KOIZUMI, T., SHIRAKURA, H.; KUMAGAI, H.; TATSU-MOTO, H.; SUZUKI, T. Mechanism of cadmium induce cytotoxicity in rat hepatocytes: cadmium induce active oxygen-related permeability changes of the plasma membrane. **Toxicol.** 114:125 - 134. 1996.
- [13] KOROTKOV, S.; SKUISKII, I.; GIAZUNOV, V. Cd⁺² effects on respiration and swelling of rat liver mitochondria were modified by monovalent cations. **J. of Inorganic Biochem.** 70:17 - 23. 1998.
- [14] LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; DEINA, G.; BERLINGUER, F.; ROSATI, I.; PINTUS, P.; LEDDA, S.; NAITANA, S. Influence of cadmium exposure on *in vitro* gamete dysfunction. **Reprod. Toxicol.** 16 (4):371-7. 2002.
- [15] LIENESCH, L.; DOMONT, J.; BANTLE, J. The effect of cadmium on oogenesis in *Xenopus laevis*. **Chemosphere.** 41 (10):1651-8. 2000.
- [16] LYMBEROPOULOS, A.G. KOTSAKI-KOVATSI, V.P.; TAYLOR, A.; PAPPATIOANNOU, N.; BRIKAS, P. Effects of cadmium chloride administration on the macroscopic and microscopic characteristics of ejaculates from chios ram-lambs. **Theriogenol.** 54:1145-1157. 2000.
- [17] MARCANO DE M. L., CARRUYO. I., DEL CAMPO, A. MONTIEL. X. Effect of Cadmium on the nucleoli meristematic cells of *Allium cepa*. L. An Ultraestructural Study. **Envirom Res.** 88:30-35. 2002.
- [18] MARCANO, L.; MONTIEL, X.; CARRUYO, I.; BRACHO, M.; ATENCIO, L. Efectos mitotóxicos y genotóxicos del cadmio en células meristemáticas de cebolla (*Allium cepa* L.). **Ciencia** 6: 93-99. 1998.
- [19] MARQUANT-LE GENE, B.; GERARD, M.; SOLARI, A.; THIBAUT, C. *In vitro* culture of bovine egg fertilize either *in vivo* or *in vitro*. **Reprod. Fertil. and Develop.** 29:559-568. 1989.
- [20] NRIAGU, J. Global metal pollution: Poisoning the biosphere. **Environment.** 32:7-11.1990.
- [21] OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH ADMINISTRATION (OSHA). **Occupational exposure to cadmium.** Std. 29 CFR. 1910-1027 pp. 1992.
- [22] PISA, J.; CIBILKA, J.; PTACEK, M. Effect of subcutaneous application of a single cadmium dose on oocyte maturation *in vitro*. **Physiol. Bohemoslov.** 39(2):185-190. 1990.
- [23] POTTS, RJ.; WATKIN, RD.; HART, BA. Cadmium exposure down-regulates 8-oxoguanine DNA glycosylase expression in rat lung and alveolar epithelial cells. **Toxicol.** 3; 184(2-3):189-202. 2003.
- [24] RACAWSKY, C. Effect of forskolin on the spontaneous maturation and cyclic AMP content of rat oocyte-cumulus complex. **J. Reprod. Fertil.** 72:107-15. 1984.
- [25] REHM, S.; WAALKES. Cadmium-induced ovarian toxicity in hamster, mice and rats. **Fundam. Appl. Toxicol.** 10(4):635-47. 1988.
- [26] RIZKI, M.; KOSSATZ, E.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxicity modulation by cadmium treatment: Studies in the *Drosophila* wing spot test. **Environ. Mol. Mutagen.** 43:196-203, 2004.
- [27] SPSS 10.0 for windows Publications US Export Sales Office Simon & Schuster International. International Customer Service Group. 200 Old Tappan Road. Old Tappan, NJ 07675. USA. 1999.

- [28] SUSS, U.; MADISON, V. Morphology and meiotic development of bovine oocytes culture *in vitro*. **Arch. Androl.** 11:217-218. 1983
- [29] TSUCHIYA, K. Causation of ouch-ouch disease I. Nature of the disease. **Keijo J. Med.** 18(4): 181-194. 1999.
- [30] U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Chronic Toxicity Summary. Cadmium and Cadmium Compounds. CAS Registry Number: 7440: 43-49 pp. 2001.
- [31] VOUTSINAS, G.; ZARANI, F.; KAPPAS, A. The effect of environmental aneuploidy-inducing agents on the microtubule architecture of mitotic meristematic root cells in *Hordeum vulgare*. **Cell. Biol. Int.** 21: 411-418. 1997.
- [32] WANG, Z.; TEMPLETON, D.M. Cellular Factors Mediate Cadmium- Dependent Actin Depolymerization. **Toxicol. and Appl. Pharmacol.** 139: 115-121. 1996.
- [33] WATANABE, T.; ENDO, A. Cytogenetic effects of cadmium on unfertilized oocytes in short-term zinc deficiency in hamsters. **Mutat. Res.** 395(2-3):113-118. 1997.
- [34] WATJEN, W.; BEYERSMANN, D. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. **Biometals.** 17(1):65-78. 2004.
- [35] YAMADA, H.; KOIZUMI, S. DNA microarray analysis of human gene expression induced by a non-lethal dose of cadmium. **Ind. Health.** 40(2):159-66. 2002.
- [36] ZENZES, M.T. Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. **Hum. Reprod. Update.** 6(2):122-131. 2000.
- [37] ZENZES, M.T.; KRISHNAN, S.; KRISHNAN, B.; ZHANG, H.; CASPER, RF. Cadmium accumulation in follicular fluid of women in vitro fertilization-embryo transfer is higher in smokers. **Fertil. Steril.** 64 (3):599-603. 1995.