

# Estudio preliminar del efecto del consumo de metales pesados en el desarrollo e histología testicular del macho cabrío (*Capra hircus*)

Gonzaga-Aivar, H.<sup>1</sup>; Escorcia-Reynoso, M.<sup>2</sup>; Delgado-Souto, S.<sup>2</sup>; Núñez-Martínez, G.<sup>1</sup>; Talavera-Mendoza, O.<sup>2</sup>; Martínez-Villalobos, N.<sup>3</sup>; Millán-Orozco, J.<sup>4</sup> y Bottini-Luzardo, M.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia N°2., Universidad Autónoma de Guerrero. México.

<sup>2</sup>Escuela Superior de Ciencias de la Tierra, Universidad Autónoma de Guerrero. México.

<sup>3</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México

<sup>4</sup>Departamento de Ciencias Médico Veterinarias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México

**Resumen:** El objetivo de este estudio fue evaluar el desarrollo testicular y describir la calidad del parénquima testicular de machos cabríos alimentados con pasto, maíz molido y agua obtenidos de campos contaminados con residuos de minería. Se evaluó la concentración de plomo, arsénico y cadmio en sangre y tejido testicular, así como otros indicadores como testosterona, el parénquima testicular, la concentración espermática y porcentaje de espermatozoides malformados. Se encontró mayor concentración de cadmio (Cd) en el parénquima testicular, posiblemente debido a la mayor capacidad de bioacumulación de este metal. El promedio de concentración de testosterona fue de 0.16 mg/dL. El parénquima testicular presentó vacuolización del citoplasma, degeneración del epitelio germinativo con escasas células de Sertoli y Leydig, así como ausencia de espermatogénesis y espermatozoides. La concentración espermática estuvo por debajo de lo reportado como normal. La concentración de espermatozoides y testosterona pudo variar debido a un bajo conteo de células de Leydig y Sertoli. El consumo de alimento y agua contaminados con residuos de minería, permiten que metales pesados como cadmio y arsénico se acumulen en los testículos afectando negativamente el parénquima testicular, pero no el tamaño testicular.

**Palabras clave:** Chivos; testículos; testosterona; metales pesados; jales.

**Abstract:** *Preliminary study of the effect of heavy metal consumption on the development and testicular histology of the male goat (Capra hircus)*

The aim is to evaluate the testicular development and described the quality of the testicular parenchyma of male goats consuming grass, ground corn and water obtained from fields contaminated with mining residues. The concentration of lead, arsenic and cadmium in blood and testicular tissue was evaluated as well as other indicators such as testosterone concentration, testicular parenchyma, sperm concentration and abnormalities sperm. A higher concentration of cadmium (Cd) were found in the testicular parenchyma, possibly due to the increased bioaccumulation capacity of this metal. The average testosterone concentration was 0.16 mg/dL. The testicular parenchyma presented vacuolization of the cytoplasm degeneration of the germinative epithelium with few Sertoli and Leydig cells, as well as absence of spermatogenesis and spermatozoa. The sperm concentration was below that was reported as normal. The concentration of sperm and testosterone could vary due to a low number of Sertoli and Leydig cells. The intake of food and water contaminated with mining residues, allow heavy metals such as cadmium and arsenic to accumulate in the testicles negatively affect testicular parenchyma, but not testicular size in male goats.

**Keywords:** Goat; testicles; testosterone; heavy metals; mining tailing.

## Introducción

La detección de metales como plomo (Pb), cadmio (Cd), arsénico (As) y mercurio (Hg) ha cobrado importancia debido a su toxicidad y a su capacidad de bioacumulación en el organismo (Bustamante et al., 2015; Milam et al., 2015) pudiendo ocasionar trastornos reproductivos

(Siu et al., 2009; M Zubair et al., 2017), tanto en humanos como en animales, donde pueden incluirse los que se utilizan en la producción animal.

La explotación minera, aún después del cese de actividades, pueden continuar siendo el origen de elementos tóxicos, existiendo poca información disponible acerca de la influencia de los metales pesados y el manejo que debe darse a los animales en pastoreo (Guvvala et al., 2019).

Los caprinos, entre los rumiantes, además de ser animales que se adaptan a condiciones de clima muy diversos, ofrecen perspectivas de desarrollo debido a su potencial como productores de leche y las características organolépticas de su carne, además en países en vías de desarrollo constituyen una importante fuente de proteína, siendo los productores caprinos sus principales consumidores (Arechiga et al., 2008).

La ganadería caprina en la mayor parte del mundo se caracteriza por ser de baja tecnificación y ubicada en zonas xerófilas con suelos pobres o contaminados (Arechiga et al., 2008; Jubril et al., 2017) como ocurre en la zona de desechos mineros (jales) de Taxco, Guerrero, México, donde investigaciones han corroborado la contaminación de suelo y agua con metales pesados, así como la acumulación de estos en plantas consumidas por los caprinos (Gómez-Bernal et al., 2010; Ruiz-Huerta & Armienta-Hernández, 2012), sin que se haya evaluado si existe un efecto del consumo de alimentos contaminados con metales pesados sobre variables reproductivas del macho caprino. Por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar el desarrollo testicular y describir la calidad del parénquima testicular de machos cabríos alimentados con pasto, maíz molido y agua obtenidos de campos contaminados con residuos de minería.

## Material y Métodos

### Lugar de estudio

El presente estudio se realizó en la zona de “La Cañada” adyacente a los jales “El Fraile” ubicado en las coordenadas 18° 30’ latitud norte y 99° 35’ longitud oeste. El clima de la zona es cálido sub-húmedo con temperatura promedio de 18 °C.

En esta zona los desechos mineros, se han acumulado por casi 50 años (Gómez-Bernal et al., 2010), tiempo en el cual se han continuado desarrollando ganaderías de subsistencia, como la caprina, sobre y alrededor de los jales.

Estudios anteriores han demostrado la presencia de metales pesados en el agua que atraviesan el jale minero El Fraile (Méndez-Ramírez & Armienta Hernández, 2012) y su acumulación en las plantas que crecen sobre y en las adyacencias de este mismo jale (Gómez-Bernal et al., 2010; Ruiz Huerta y Amienta Hernández 2012).

### Animales y tratamiento

Cuatro caprinos criollos (Capr.1, Capr.2, Capr.3 y Capr.4), provenientes de un área no contaminada con metales pesados, de 5 meses de edad, con peso promedio inicial de 10.65±2 kg. Cap.1,2 y 3 consumieron diariamente, 0.20 kg de *Vachellia farnesiana* (Huizache), 0.40 kg de *Paspalum notatum* (zacate) y 0.25 kg de *Zea maiz* (maíz) molido, que crecían en suelos con residuos de minería y 2.5 L de agua del río

\*e-mail: 17906@uagro.mx

Cacalotenango, el cual también está contaminado por los jales (Méndez-Ramírez & Armienta Hernández, 2012). El Capr.4 fue mantenido en un área libre de contaminación de metales pesados, consumiendo 0.60 kg de *Cynodon nlemfuensis* (Pasto estrella) y 0.25 kg de maíz, el agua se proporcionó *ad libitum*. El trabajo se llevó a cabo durante 26 semanas.

El sacrificio de los caprinos se realizó respetando la norma oficial mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, métodos para dar sacrificio a los animales domésticos y silvestres, así como la autorización del Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Guerrero.

#### **Consumo de metales pesados**

Las concentraciones de Cd, As y Pb en el pasto, maíz y huizache se consideraron de informes obtenidos en la zona, en investigaciones anteriores (Díaz-Villaseñor et al., 2017) igual que el caso del agua tomada del río Cacalotenango (Cervantes-Ramírez et al., 2018).

Se determinó el consumo de metales pesados multiplicando la concentración de metales pesados en el pasto, huizache, maíz y agua por los kg y L consumidos de estos.

#### **Peso vivo (PV) y circunferencia escrotal (CE)**

Para la medición del PV se utilizó una balanza TECNIPESA con capacidad de 100 kg. Los testículos fueron medidos empleando un escrotómetro (De la Vega et al., 2006). Dichas medidas fueron tomadas cada 15 días.

#### **Concentración de metales pesados en sangre y testículos**

Se tomó una muestra semanal de sangre, de cada chivo, por venopunción de la vena yugular. La sangre fue recolectada en tubos Vacutainer sin ningún aditivo, posteriormente centrifugada a 3500 rpm/15 min. El plasma sobrenadante fue almacenado en microtubos y congelado a -20°C hasta su procesamiento.

En el caso del tejido testicular, se tomaron muestras de tejido, de ambos testículos, 3cm x 3cm, se colocaron en un contenedor estéril y se preservaron a una temperatura de -20 °C hasta el momento de la digestión y análisis de metales pesados.

Se utilizó el procedimiento de digestión húmeda para el análisis de metales pesados en sangre y tejido testicular. La digestión de las muestras se realizó en el Laboratorio de Geoquímica, de la Universidad Autónoma de Guerrero donde se tomaron 5 mL de sangre y se pesaron 0.5 g de muestra de tejido testicular, en bombas Savillex y se digirieron con ácido nítrico [HNO<sub>3</sub>] y peróxido de hidrógeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] en una plancha caliente a una temperatura de 80 a 100 °C durante una hora más hasta que la muestra terminó el proceso de digestión y mostró un color claro.

Las concentraciones de Pb, Cd y As fueron determinadas en un Espectrómetro de Emisión por Acoplamiento de Plasma Inducido (ICP-AES) Perkin Elmer Optima 3200, en el Laboratorio de Geoquímica, de la Escuela Superior de Ciencias de la Tierra en la Universidad Autónoma de Guerrero. La exactitud y precisión de los métodos analíticos fue monitoreada utilizando el estándar de referencia Lyphochek Whole Blood Metals Control, Level 3, #529, para la cuantificación de Pb, Cd y As en sangre, orina, músculo y tejidos blandos. Para la cuantificación de la concentración de Pb, Cd y As, el equipo se calibró con los estándares de rutina para determinación de metales, obteniendo las curvas de calibración correspondientes para cada elemento (Pb, Cd y As). El límite de detección del equipo fue de 0.010 mg/L.

#### **Concentración de testosterona en sangre**

Para la determinación de testosterona se utilizó un kit de Elisa siguiendo las recomendaciones del fabricante (MEXLAB). Las placas fueron leídas con un lector de Elisa Mod. Stat Fax 4700 (Palm City, FL, USA). La sensibilidad de la prueba es de 0.075 ng/mL.

#### **Histología**

El parénquima testicular fue evaluado utilizando el método de inclusión en parafina y tinción con hematoxilina-eosina (Tinciones Alvarez®, Granada-España). Las muestras se observaron en un microscopio Labomed LX40 (Lab. América Inc-USA) con aumento de 40 y 100X. Se tomaron fotografías de 10 campos de un mismo corte histológico, utilizando una cámara Lamine 117 Histología de Ross Rowell, adaptada al microscopio. Como indicativo de la calidad del parénquima testicular se evaluó la integridad del epitelio seminífero, integridad de las células de Sertoli y Leydig, así como la presencia de espermatozoides en diferentes estadios (Berndtson, 1977).

#### **Características espermáticas**

##### **Obtención y evaluación de semen**

La cola y parte del cuerpo del epidídimo fueron disectados asépticamente del testículo y colocados en una capsula de Petri, donde inmediatamente se procedió al lavado de los epidídimos con 10 mL de solución Ringer Lactato para limpiar las impurezas. Posteriormente se obtuvieron los espermatozoides según el método de desmenuzamiento del epidídimo descrito por (Benítez-González et al., 2017).

##### **Concentración espermática**

Para determinar la concentración espermática del eyaculado se tomó 0.05 mL del semen obtenido y se diluyó en 9.95 mL de solución fisiológica con formaldehído al 10% (Carrillo et al., 2010). La concentración espermática fue evaluada empleando una cámara de Bürker. El número total de espermatozoides por mL se calculó según lo señalado por (Christensen et al., 2005).

##### **Malformaciones espermáticas**

Se tomaron alícuotas de 2 µL de semen, obtenido por desmenuzamiento del epidídimo, las cuales fueron teñidas con tinción eosina-nigrosina (Barth, 2007), posteriormente se realizaron 3 frotis con cada alícuota. Los frotis fueron evaluados empleando un microscopio Labomed LX40 (Lab. América Inc-USA) con aumento de 100X.

##### **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de medidas repetidas para la circunferencia escrotal, peso vivo y concentración de testosterona, donde el efecto fijo fue el tratamiento y el efecto aleatorio el animal, los resultados se expresaron como media ± desviación estándar. Se empleó un nivel de significancia de  $P \leq 0.05$ . Para todos los procedimientos estadísticos se utilizó el software JPM (SAS 2020, USA).

#### **Resultados**

##### **Consumo de metales pesados y concentración en sangre**

En la presente investigación los caprinos consumieron 0.15 mg de Pb/d, 1.18 mg de Cd/d y 0.12 mg de As/d.

El análisis de sangre no muestra la presencia de As y las concentraciones de Pb y Cd fueron iguales, 0.001 mg/dL.

##### **Peso vivo (PV) y circunferencia escrotal (CE)**

Los resultados de circunferencia escrotal y el peso vivo se muestran en la tabla 1.

##### **Metales pesados en testículos, concentración de testosterona en sangre, histología y características espermáticas.**

La concentración de Cd en tejido testicular fue de 0.0010, 0.0014 y 0.0020 mg/g en Capr.1, Capr.2 y Capr.3 respectivamente. En cuanto al arsénico fueron iguales a las de Cd en el Capr.2 y Capr.3, pero superior en el Capr.1 con 0.0021 mg/g. No se detectó plomo en tejido testicular. No se encontró ningún metal pesado en los testículos del caprino control.

La concentración promedio de testosterona se reporta en la tabla 1. No encontrándose diferencias entre tratamientos. Por su parte Zubair et al. (2016) señala, en machos cabríos, una disminución en la concentración

**Tabla 1.** *Peso vivo, circunferencia escrotal, concentración de testosterona y características espermáticas de caprinos consumiendo forraje, maíz y agua contaminados con metales pesados.*

Característica	Caprino metales pesados	Capr. control	Valor P
Peso vivo final (kg)	17.5±1.6	18.5±1.2	0.6
Circunferencia escrotal final (cm)	19.9±1.4	18.4±1.5	0.7
Concentración de testosterona ng/mL	0.4±0.7	0.5±0.5	0.8

de testosterona atribuida a la disminución en la concentración de LH debido a la secreción de corticosteroides que inhiben la secreción de GnRH, por efecto del consumo de 5mg/kg de arsénico, lo que es mucho mayor al consumo registrados en el presente estudio, por lo que probablemente no se vio afectado el mecanismo hipotálamo-hipofis-gónadas.

El estudio histológico reveló que el parénquima testicular de los 3 caprinos consumiendo metales pesados, presentaron las mismas características (Fig.1), observándose vacuolización del citoplasma degeneración del epitelio germinativo con escasas células de Sertoli y Leydig, así como ausencia de la espermatogénesis y espermatozoides. A diferencia del caprino que consumió alimentos libres de metales pesados.



**Figura 1.** Sección transversal de túbulos seminíferos (TS). Vacuolización del citoplasma en la línea germinal y las células epiteliales germinales (V) y desprendimiento de algunas células (D) degeneración del epitelio germinativo (DEG) con escasas células de Sertoli y ausencia de células de Leydig.

En la tabla 2, se observa que la concentración espermática, fue menor en los animales consumiendo alimento y agua contaminada con metales pesados, con respecto al caprino control. El porcentaje de malformaciones fue similar en ambos tratamientos.

**Tabla 2.** *Características espermáticas de caprinos consumiendo forraje, maíz y agua contaminados con metales pesados.*

Característica	Capr. 1	Capr. 2	Capr. 3	Capr.4 (control)
Concentración espermática millones/mL.	52.84 x10 <sup>6</sup>	49.50 x10 <sup>6</sup>	50.20 x10 <sup>6</sup>	1.3 x10 <sup>8</sup>
Malformaciones (%)	10	8	8	7

**Discusión**

El mayor consumo de Cd puede ser debido a la alta capacidad de este

metal para acumularse en los forrajes, en comparación con el arsénico y plomo (Arroyave et al., 2010). El análisis de sangre no muestra la presencia de As y las concentraciones de Pb y Cd fueron iguales, 0.001 mg/dL, lo cual resulta bajo según su consumo. Este hecho puede ser explicado por la presencia bezoares en el rumen de los caprinos hallados durante la necropsia.

Los bezoares se forman por la presencia de elementos indigestibles o nocivos para el animal impidiendo que se distribuyan en el organismo y constituyendo un método de defensa en rumiantes (Espinoza-González, 2016).

(Escorcía-Reynoso, 2020), señala que los bezoares son capaces de acumular gran cantidad de metales pesados, impidiendo que estos permanezcan circulando en sangre. Sin embargo, esto no impidió que se acumulara Cd y As en tejido testicular. Las concentraciones encontradas de Cd son menores a las reportadas por (Massányi et al., 2004) en semen de borregos.

Estudios realizados en caprinos en zonas tropicales consumiendo alimentos libres de metales pesados reportan concentraciones entre 1.89 (Chentouf et al., 2009) y 2.07 billones de espermatozoides/mL, (Kabiraj et al., 2011) lo cual es superior a lo encontrado en el presente estudio (Tabla 1) en los caprinos consumiendo metales pesados. Los resultados hallados difieren de otro estudio donde la concentración espermática disminuyó por el consumo de arsénico (M. Zubair et al., 2016)

En cuanto al porcentaje de malformaciones son similares a los reportados por (Sultana et al., 2013) en machos cabríos sanos y fértiles.

A pesar del efecto negativo sobre el epitelio seminífero, la circunferencia escrotal no se vio afectada en ninguno de los tres caprinos consumiendo metales pesados, coincidiendo con lo reportado por (Haouem et al., 2008) y (Blanco et al., 2007) quienes encontraron daño en el parénquima testicular, sin decremento del tamaño testicular, en ratones suplementados, con alimentos contaminados con Cd. Sin embargo, difieren de lo encontrado por otro estudio que reportan disminución del tamaño testicular en ratones a los que se les suministró alimento contaminado con arsénico (Uygun et al., 2014) y borregos a los que se les suministró cadmio (Lymberopoulos et al., 2000).

Estudio posterior señalan necrosis y degeneración en los túbulos seminíferos en borregos a los que se les suministró cadmio en el alimento (Lymberopoulos et al., 2003). Por su parte Ansa et al. (2017; Blanco et al. (2010) observaron vacuolizaciones y degeneración del epitelio seminífero en conejos y ratones alimentados con Cd. Estos últimos autores, son enfáticos en señalar que el consumo prolongado, 6 meses o más, de Cd es nocivo para el epitelio seminífero. En el caso del As se reportan, los mismos daños en el epitelio seminífero de rumiantes (Muhammad Zubair & Martyniuk, 2019) ratones que los ocasionados por el Cd (Uygun et al., 2014; Yilmaz et al., 2020). En las condiciones del presente estudio no es posible identificar si los daños observados en el epitelio seminífero fueron ocasionados por el Cd o por As.

El bajo porcentaje de malformaciones en los caprinos consumiendo metales pesados, puede ser debido a que la concentración de arsénico consumida por los caprinos es inferior a la suministrada en otras investigaciones (Lymberopoulos et al., 2000; Uygun et al., 2014; Yilmaz et al., 2018).

Con respecto al efecto negativo del cadmio sobre la morfología espermática en el presente estudio, éste pudo haberse disminuido debido a la presencia de zinc en el maíz o en el pasto consumido, potenciando un efecto positivo que se reflejó en el bajo porcentaje de malformaciones espermáticas. Al respecto López Alonso et al. (2002) señalan que el Cd puede hacer sinergia positiva con el zinc, mejorando la calidad de los espermatozoides.

La concentración espermática depende de la presencia de células de Sertoli y la concentración de testosterona depende del número de células de Leydig. En este estudio los túbulos seminíferos de los caprinos consumiendo metales pesados, se caracterizaron por presentar

un aumento en la luz del mismo, debido a un bajo número de células de Leydig y Sertoli, lo que podría explicar la baja concentración espermática y de testosterona. Dichos resultados podrían atribuirse a la presencia del Cd, coincidiendo con lo reportado por Ansa et al. (2017) quienes indican que el cadmio puede causar la pérdida de células en el parénquima testicular. Por su parte Blanco et al. (2007) son específicos al señalar que concentraciones de Cd iguales o superiores a 0.001 mg/g de tejido testicular, tiene efecto detrimental sobre las células de Leydig. Dicha concentración es la encontrada en los testículos de los caprinos en el presente estudio.

## Conclusión

El consumo de alimento y agua contaminados con residuos de minería, permiten que metales pesados como cadmio y arsénico se acumulen en los testículos afectando negativamente el parénquima testicular, pero no el desarrollo testicular.

## Bibliografía

1. Ansa A A, Akpere O, Imasuen J A. Semen traits , testicular morphometry and histopathology of cadmium-exposed rabbit bucks administered methanolic extract of Phoenix dactylifera fruit. *Acta Scientiarum*. 2017; 39, 207–215. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v39i2.32858>
2. Arechiga C, Aguilera J, Rincón R, Méndez S, Bañuelos V, Meza C. Situación actual y perspectivas de la producción caprina ante el reto de la globalización. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2008; 9, 1–14.
3. Arroyave C, Araque P, Pelaez C A. Evaluación de la bioacumulación y toxicidad de cadmio y mercurio en pasto llanero (*Brachiaria dictyoneura*). *Vitae*. 2010; 17, 45–49.
4. Barth A. Evaluation of Potential Breeding Soundness of the Bull. In R. Youngquist & W. Threlfall (Eds.), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* St. Louis: ELSEVIER; 2007. p. 228.
5. Benítez-González E, Chamba-Ochoa H, Sánchez-Sánchez E, Luzon-Cevallos F, Sánchez-Carrillo J. Evaluación comparativa de dos métodos de recuperación espermática de epidídimos bovinos post-mortem Comparative evaluation of two methods of spermatid recovery of epididymis bovine post-mortem *Abanico Veterinario*. 2017; 8, 59–74.
6. Berndtson W. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: A review. *Journal of Animal Science*. 1977; 44, 818–833.
7. Blanco A, Moyano R, Flores R, Molina A, Blanco C, Ag E. Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium. *Environ.Toxicol. Pharmacol*. 2007; 23, 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.07.008>
8. Blanco A, Moyano R, Molina López AM, Blanco C, Flores-Acuña R, García-Flores JR, Espada M, Monterde JG. Preneoplastic and neoplastic changes in the Leydig cells population in mice exposed to low doses of cadmium. *Toxicology and Industrial Health*. 2010; 26, 451–457. <https://doi.org/10.1177/0748233710371111>
9. Bustamante J, Chaparro A, Peláez M. Impacto de las actividades antrópicas derivadas de la industria petrolera en relación con la presencia de metales pesados en la ganadería bovina colombiana. *Revista de Toxicología*. 2015; 32(2), 124–130. <https://doi.org/10.17151/uaz.2016.43.5>
10. Carrillo E, Meza-Herrera CA, Véliz FG. Estacionalidad reproductiva de los machos cabríos de la raza Alpino-Francés adaptados al subtrópico Mexicano. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*. 2010; 1(2), 169–178.
11. Casao A, Cebrián I, Asumpção M E, Pérez-Pérez R, Abecia JA, Forcada F, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2010. 8, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-59>
12. Cervantes-Ramírez LT, Ramírez-López M, Mussali-Galante P, Ortiz-Hernández ML, Sánchez-Salinas E, Tovar-Sánchez E. Heavy metal biomagnification and genotoxic damage in two trophic levels exposed to mine tailings: a network theory approach. *Revista Chilena de Historia Natural*. (2018); 91(6), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40693-018-0076-7>
13. Chentouf M, Molina FA, Loup Bister J. Evolución mensual de los parámetros testiculares y espermáticos de los machos cabríos del norte de Marruecos. *Comunicaciones*. 2009. 367–371. <https://www.researchgate.net/publication/272576484>
14. Christensen P, Stryhn H, Hansen C. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology*. 2005; 63, 992–1003. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.026>
15. De la Vega A, Morales P, Zimmerman M, Wilde O. Variación anual de la circunferencia escrotal en caprinos criollos serranos. *Archivos de Zootecnia* 2006; 55(209), 113–116.
16. Díaz-Villaseñor E, Talavera-Mendoza O, Sampedro-Rosas M, López-Díaz J, Ramírez Guzmán, A. Avances de la evaluación de la eficiencia de trampas hidrogequímicas establecidas para neutralizar los metales pesados generados por los lixiviados en los jales El Fraile, en Taxco, Guerrero, México. *Revista Tlamati*. 2017; 8(2), 27–36.
17. Escorcía-Reynoso, M. (2020). *Geoquímica de Pb, Cd y As para evaluar la Bioexposición de metales pesados en caprinos criados cerca de los jales mineros en Taxco, Guerrero, México*. Universidad Autónoma de Guerrero.
18. Espinoza-González R. Bezoares gastrointestinales: mitos y realidades. *Revista Medica Chile*. 2016; 144, 1073–1077.
19. Gómez-Bernal J, Santana-Carrillo J, Romero-Martín F, Armienta-Hernández M, Morton-Bremea O, Ruiz-Huerta E. Plantas de sitios contaminados con desechos mineros en Taxco, Guerrero, Mexico. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*. 2010; 87, 131–133.
20. Guvvala PR, Ravindra JP, Selvaraju S. Impact of environmental contaminants on reproductive health of male domestic ruminants : a review. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06980-4>
21. Haouem S, Fathel M, El A, Sakly R. Accumulation of cadmium and its effects on testis function in rats given diet containing cadmium-polluted radish bulb. *Experimental and Toxicology Pathology*. 2008; 59, 307–311. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2007.10.002>
22. Jubril AJ, Kabiru M, Olapade JO, Taiwo VO. Biological monitoring of heavy metals in goats exposed to environmental contamination in Bagega. *Advances in Environmental Biology*. 2017; 11(June), 11–18.
23. Kabiraj SK, Hoque SA, Khandoker Y, Husain SS. Testicular biometry and its relationship with body weight and semen output of black Bengal bucks in Bangladesh. *Journal of Cell and Animal Biology*. 2011; 5(2), 27–32.
24. López Alonso M, Miranda M, Castillo C, Hernández J, Benedito J. Interacción entre metales tóxicos y esenciales en ganado vacuno de Galicia. *Revista Toxicology* 2002; 19, 69–72.
25. Lymberopoulos AG, Kotsaki-Kovatsi VP, Papaioannou N, Taylor A, Brikas P, Belibasaki S. Effects of cadmium chloride administration on the testicular growth and plasma testosterone secretion of Chios ram-lambs. *Small Ruminant Research*. 2003; 49(1), 51–60. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00061-0](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00061-0)

26. *Lymberopoulos AG, Kotsaki-Kovatsi VP, Taylor A, Papaioannou N, Brikas P.* Effects of cadmium chloride administration on the macroscopic and microscopic characteristics of ejaculates from chios ram-lambs. *Theriogenology.* 2000; 54(7), 1145–1157. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00422-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00422-2)
27. *Massányi P, Trandzik J, Nad P, Koreneková B, Skalická M, Toman R, Lukac N, Halo M, Strapak P.* Concentration of Copper, Iron, Zinc, Cadmium, Lead, and Nickel in Bull and Ram Semen and Relation to the Occurrence of Pathological Spermatozoa. *Journal of Environmental Science and Health, Part A- Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering.* (2004); 39(11–12), 3005–3014. <https://doi.org/10.1081/lesa-200034832>
28. *Méndez-Ramírez M, Armienta Hernández M.* Distribución de Fe , Zn , Pb , Cu , Cd y As originada por residuos mineros y aguas residuales en un transecto del Río Taxco en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas.* 2012; 29(12), 450–462.
29. *Milam C, Dimas BJ, Jang AL, Eneche JE.* Determination of Some Heavy Metals in Vital Organs of Cows and Bulls at Jimeta Abattoir , Yola , Adamawa State , Nigeria. *American Chemical Science Journal.* 2015; 8(4), 1–7. <https://doi.org/10.9734/ACSJ/2015/17012>
30. *Ruiz-Huerta E, Armienta-Hernández M.* Acumulación de Arsénico y Metales Pesados en Maíz en Suelos Cercanos a Jales o Residuos Mineros. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 2012; 28(2), 103–117.
31. *Siu ER, Mruk DD, Porto CS, Cheng CY.* Cadmium-induced testicular injury. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2009; 238(3), 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.01.028>
32. *Sultana F, Husain S, Khatun A, Apu A, Khandoker M.* Study on buck evaluation based on semen quality and fertility. *Bangladesh Journal of Animal Science.* 2013; 42(2), 103–108. <https://doi.org/10.3329/bjas.v42i2.18487>
33. *Uygur R, Aktas C, Caglar V, Uygur, E, Erdogan H, Ozen OA.* Protective effects of melatonin against arsenic-induced apoptosis and oxidative stress in rat testes. *Toxicology and Industrial Health.* 2014; December 2013. <https://doi.org/10.1177/0748233713512891>
34. *Yilmaz BO, Yildizbayrak N, Erkan M.* Sodium arsenite-induced detriment of cell function in Leydig and Sertoli cells : the potential relation of oxidative damage and antioxidant defense system the potential relation of oxidative damage and antioxidant defense system. *Drug and Chemical Toxicology.* 2018; 0(0), 1–9. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1505902>
35. *Zubair M, Ahmad M, Jamil H, Deeba F.* Toxic effects of arsenic on semen and hormonal profile and their amelioration with vitamin E in Teddy goat bucks. *Andrologia.* 2016; 48(10), 1220–1228. <https://doi.org/10.1111/and.12564>
36. *Zubair M, Ahmad M, Qureshi ZI.* Review on arsenic- induced toxicity in male reproductive system and its amelioration. *Andrologia* 2017; 9(November 2016), 1–8. <https://doi.org/10.1111/and.12791>
37. *Zubair M, Martyniuk CJ.* A review on hemato-biochemical, accumulation and patho-morphological responses of arsenic toxicity in ruminants. *Toxin Reviews* 2019; 38(3), 176–186. <https://doi.org/10.1080/15569543.2018.1442347>