

EFFECTO DEL CROMO HEXAVALENTE SOBRE LA CINÉTICA DE MUERTE DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS

José Manuel Puga Arriaga¹, Tatiana Poznyak²,
Laura Martínez Tabche³, Elena Kiseleva⁴

RESUMEN

En el mundo actual, tan industrializado, se soslaya el efecto que tanta actividad industrial tiene sobre nuestros ecosistemas, sobre la salud de los seres humanos, y sobre todo en la reproducción humana. Si bien el cromo es utilizado en una gama muy amplia de actividades industriales, pensamos que se ha subestimado su efecto en la reproducción y salud humanas. La información disponible sugiere que su efecto depende de la vía de ingreso al organismo, de cómo se distribuye en éste, del tiempo de exposición, y finalmente de las concentraciones que alcance en los tejidos. En el presente trabajo se estudió el efecto producido por el cromo (VI) al ser inoculado en forma directa en espermatozoides humanos, evaluando el efecto de la inoculación directa de cromo sobre la cinética de muerte de espermatozoides humanos. Para el estudio sobre la cinética de muerte se utilizó la metodología tradicional, sin embargo, por primera vez se estudió el efecto *in vitro* del cromo inoculado directamente sobre los espermatozoides. Se realizó una evaluación (*in vitro*) del efecto tóxico de microconcentraciones de cromo hexavalente (un rango de concentraciones que varió de 0.3 M a 0.7 M de dicromato de potasio) en la cinética de muertes de los espermatozoides humanos con fin de investigar dicho efecto.

Palabras Clave: *Cinética de muerte, espermatozoides, cromo hexavalente, intoxicación, reproducción humana.*

Effect of Hexavalent Chrome (Chrome VI) on Human Sperm Death Kinetics

ABSTRACT

In the world at present, we frequently ignore the effect that industrial activity has on our environment, on human health, and above all, on human reproduction. Although chrome is used in a very wide range of industrial activities, we think that its effect in human reproduction has been underestimated. Available information suggests that its effect depends on the route by which it accesses the human body, on exposure time, on how it is distributed in the organism, and finally on the concentrations that it reaches in human tissues.

In the present work, the effect produced by chrome (VI) inoculated *in vitro* on human sperm was studied. We evaluated the effect of direct chrome inoculation in human sperm death kinetics (acute toxicity). Traditional methodology for study of human sperm death kinetics was used. For the first time, *in vitro* direct effect of chrome on sperm was studied.

Key Word: *Death kinetics, Human sperm, Chrome VI, Acute toxicity, Human reproduction.*

ARTÍCULO RECIBIDO EL 4 DE SEPTIEMBRE DEL 2001 Y ACEPTADO EL 17 DE ENERO DEL 2002.

INTRODUCCIÓN

Un sin número de sustancias son utilizadas en la industria hoy en día y se incorporan 200,000 más cada año a los procesos productivos, si no se conoce el efecto que pueda tener la exposición a éstas, el efecto que el conjunto de estímulos nocivos tiene en el ser humano, en el ecosistema, en el medio ambiente laboral, se pone en riesgo, no sólo la salud de un individuo, ó al ecosistema, sino la supervivencia de la especie humana. Es en el medio ambiente laboral donde sin duda se

tiene un mayor grado de exposición dado que las concentraciones de las sustancias son generalmente mayores¹. El cromo es usado en una diversidad de industrias de nuestro país en distintas formas utilizando valencias II, III y VI y diferentes compuestos de este metal. Sin embargo, no se cuenta con datos de exposición confiables para trabajadores mexicanos. Desde el punto de vista toxicológico, los más importantes son los que se forman con la valencia III y VI, siendo ésta última la forma más tóxica y puede causar cáncer pulmonar^{2,3}. El cromo es componente del acero inoxidable hasta en un 26% y puede ser inhalado por los soldadores, también por los trabajadores de la industria cementera, ya que también este material contiene cromo importantemente⁴. Por otro lado, aunque se conocen los efectos tóxicos del cromo, se desconocen todavía algunos de los

¹ENMH del IPN, SEPI, Salud Ocupacional, Seguridad e Higiene, México.

²ESIQIE del IPN, SEP, Postgrado e Investigación, México.

³ENCB del IPN, Depto. Toxicología Acuática, México.

⁴Depto. de Materiales y Composiciones Poliméricas, Instituto de Físicoquímica, Academia de Ciencias de Rusia.

E-mail: tpoznyak@hotmail.com

mecanismos por medio de los cuales causa toxicidad. Algunos artículos sugieren que el cromo VI es genotóxico aunque el mecanismo no está totalmente aclarado⁵. La asociación entre la exposición al cromo y el desarrollo de enfermedades ha sido descrita en varios estudios epidemiológicos ocupacionales⁴. Se han estudiado ampliamente los efectos de la exposición a metales pesados, pero en general se conoce poco el efecto que estos pueden tener en los órganos reproductores, así como en la vida reproductiva de los sujetos expuestos a estos metales. Otros estudios reportan que uno de los mecanismos por medio de los cuales el cromo (VI) produce toxicidad es la ruptura de las cadenas simples de DNA¹. Estos reportes describen en forma muy detallada el mecanismo por el cual se lleva a cabo la ruptura de dichas cadenas. Además, se ha reportado⁷⁻⁹, que el cromo inhalado no modifica la calidad y cuenta de los espermatozoides humanos, mientras que estudios en animales de laboratorio (roedores) concluyen, que el incremento en el cromo (VI) de la dieta si disminuye significativamente la cuenta y calidad de los espermatozoides⁹. Es nuestra opinión que la aparente discordancia en estos estudios se puede atribuir a la diferente vía de ingreso al organismo del metal, a las diferencias entre las especies y a las altas temperaturas a que estaban expuestos los soldados¹⁰⁻¹², que inhalaban el cromo¹³.

El cromo hexavalente es un contaminante conocido, se sabe que contamina el aire los suelos e incluso el agua. Su uso está ampliamente difundido en la industria. Los efectos a la salud de la exposición a este metal también son conocidos, incluso el mecanismo por el cual causa ruptura de las cadenas de DNA ha sido estudiado a profundidad^{9-13,14}. La presencia de altas concentraciones de la forma hexavalente del cromo en el ambiente, principalmente de trabajo, es dañina para la salud, ya que causa problemas de carácter local tales como: dermatitis irritativa, dermatitis alérgica, corrosión del tabique nasal. También causa trastornos de carácter general, entre los que se destacan: el asma bronquial, el cáncer de pulmón y el daño renal¹⁵.

La importancia del cromo desde el punto de vista de sus efectos adversos sobre la salud es mayor en lo que se refiere a la exposición ocupacional que en aquella del ambiente general; ya que cuando no hay contaminación por fuentes antropogénicas, las concentraciones ambientales naturales son muy bajas. El número de trabajadores potencialmente expuestos al cromo (VI) en los Estados Unidos de América se ha calculado en 175,000 distribuidos en 104 actividades laborales distintas.

Al parecer el metabolismo humano de la glucosa depende en parte de las concentraciones del cromo trivalente⁴, ya que juega un papel en los factores de tolerancia a ésta. Sin embargo, la presencia de concentraciones elevadas de cromo (VI) en el ambiente, particularmente en las fuentes de trabajo es dañina para la salud, teniendo un sin número de posibles efectos adversos para ésta, dependiendo de su vía de entrada al organismo, de la concentración y el tiempo de exposición.

Sin embargo, en México no se realiza un monitoreo del efecto que pueda tener sobre la salud de los trabajadores. Es claro que en esta fase de la investigación fue necesario, con el objeto de no introducir un sesgo, que los sujetos de quienes se tomaron las muestras no hubieran estado expuestos a ningún tóxico y además fueran personas sanas, con el fin de controlar las variables del experimento.

En el presente trabajo se estudió a los espermatozoides inoculados con cromo, encontrando una dosis letal 50, realizando un estudio de cinética de muerte, primero sin cromo, y después inoculados con diferentes dosis de este metal, con el objeto de observar el efecto *in-vitro* de concentraciones similares a las obtenidas en plasma.

La respuesta a las siguientes preguntas nos ayudará a formular las ideas respecto al problema. Es sabido que los metales pesados tienen algún grado de toxicidad hacia las gónadas¹⁶. ¿Será que los niveles alcanzados en intoxicaciones agudas no determinan niveles tóxicos en las gónadas?, ¿qué efecto tendrá el cromo (VI) inoculado a espermatozoides *in vitro*?, ¿la toxicidad dependerá de la concentración de cromo y/o del tiempo de exposición?

Relación del trabajo con el medio laboral mexicano

El efecto del cromo VI es ampliamente conocido, con respecto a su efecto carcinogénico, así como, sus efectos en la salud de los trabajadores expuestos a él en forma prolongada. Tan es así que las normas internacionales establecen límites de exposición, así como condiciones especiales para el trabajador que lo maneja, dependiendo de las características del proceso y tiempo de exposición.

La Norma Oficial Mexicana número 10 (NOM-010-STPS-1994), contempla al cromo (VI), estableciendo los niveles máximos permisibles de concentraciones a que puedan estar expuestos los trabajadores¹⁷. Las concentraciones establecidas en la norma pueden expresarse en ppm y/o mg/m³. Para cromatos (algunos compuestos insolubles en agua de cromo (VI) con número de identificación 159), marca un CPT (concentración promediada en el tiempo) de 1 mg/m³, para los compuestos de cromo solubles en agua (número de identificación 164) marca 0.5 mg/m³, para compuestos de cromo II y cromo III (número de identificación 163) marca 0.5 mg/m³, para cromo metal (número de identificación 165) marca 0.5 mg/m³.

Por otro lado, al consultar la norma nos encontramos que las citas bibliográficas a que hace referencia son de agencias de protección ambiental y de higiene y seguridad en el trabajo, en los Estados Unidos, no se encontró ninguna evidencia de estudios realizados en México, con trabajadores mexicanos.

MATERIALES Y EQUIPO

Para obtener las muestras de semen se utilizaron vasos de precipitado de 20 ml de capacidad. Las muestras obtenidas se mantuvieron a 4°C antes de su uso. Para la incubación a 36°C

de temperatura se usó una estufa de laboratorio marca "Riossa". Un microscopio de luz marca "Zeiss", se usó para la cuenta de espermatozoides. Para la cuenta de espermatozoides se utilizó una cámara de Neubauer, tubos de ensaye, así como tubos con tapa de rosca de 2ml; para sellar se utilizó papel parafina. Para la obtención de muestras se usaron jeringas desechables de 5cm³.

Selección de voluntarios sanos

Se solicitó a voluntarios sanos de nivel socioeconómico medio que se sometieran al cuestionario para conocer sus antecedentes. Varones de entre 18 y 25 años de edad, con edades en el mismo rango, ninguno de los voluntarios tenía antecedentes laborales de exposición a sustancias tóxicas. En su mayoría eran estudiantes. A los que donaron semen se les pidió no haber tenido alguna patología relacionada con sus órganos reproductivos (no fue rechazado ningún voluntario por este motivo). Ninguno tuvo historia laboral de exposición a metales pesados. También se les solicitó una abstinencia sexual de tres días previos al experimento.

Tomad de muestras

Los espermatozoides fueron obtenidos por masturbación y el donador los vertió en un vaso de precipitado, para ser vertidos a su vez en tubos de ensaye.

Preparación de muestras de espermatozoides

Los espermatozoides fueron vertidos en frascos de 2 ml, una vez obtenida la muestra fue cubierta con papel de parafina e introducida a un termostato a 36.5°C durante el tiempo del experimento. Se tomaron 200 µl de la muestra y se adicionaron, 800 µl de solución salina isotónica para diluir y hacer posible su cuenta. A los espermatozoides que fueron inoculados con dicromato de potasio, se les inocularon inicialmente concentraciones del orden de 25 µM/L que fueron descendiendo hasta 0.3, 0.5 µM, 0.6 µM y 0.7 µM. según

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para determinar la concentración ideal para observar el efecto del cromo en la cinética de muerte de los espermatozoides, primero se preparó una solución madre con 100 ml de solución 0.5 mM de dicromato de potasio. De ésta se tomó un mililitro y se aforó a 10 ml quedando una concentración de 0.05 mM. Esta concentración resultó ser letal, ya que se morían el 100% de los espermatozoides en el tiempo de exposición 0. Por lo que se hizo otra dilución: se tomó nuevamente 1 ml y se aforó a 10 ml, quedando así una solución a 0.005 mM de concentración, la que también resultó letal para más del 50% de los espermatozoides.

Para poder observar el efecto del cromo sobre la cinética de muerte de los espermatozoides, decidimos disminuir 10 veces dicha concentración de dicromato de potasio. Así que se tomó 0.1 ml de la solución y se agregó 0.1 ml de solución de espermatozoides, aforando después hasta 1 ml, quedando así una concentración final de 0.0005 mM. Concentración semejante a la que se puede encontrar en el plasma de sujetos expuestos,

tomando en cuenta que sólo puede determinarse en forma indirecta, ya que el cromo VI es rápidamente reducido a cromo III, menos tóxico. Sólo un aumento en la excreción urinaria de cromo III, sugiere concentraciones altas de cromo VI en plasma⁴.

A partir de dicha concentración, se calculó el logaritmo y se propusieron concentraciones por arriba y por abajo de ésta, es decir una y dos décimas logarítmicas por arriba y por debajo de la concentración inicial (tabla 1), con el fin de observar como se modifica la cinética de muerte de los espermatozoides. Así se tomaron 200 µl de la mezcla y se contaron los espermatozoides durante cada hora inoculados y no inoculados con cromo (VI) para observar los cambios en la movilidad, (se contaron, móviles e inmóviles) hasta por 8 horas a 36°C.

Concentración de K ₂ Cr ₂ O ₇ , µM	Log de la concentración
0.7	-3.1
0.6	-3.2
0.5	-3.3
0.4	-3.4
0.3	-3.5

Tabla 1. Concentraciones calculadas para realizar el estudio de la cinética de muerte.

Estudio de la cinética de muerte de espermatozoides

Para estudiar el efecto del cromo (VI) sobre la cinética de muerte de los espermatozoides se realizó un experimento preliminar para conocer el tiempo de vida aproximado de los espermatozoides. Para lo que se tomó una muestra con un volumen de 1ml se diluyó con 0.5ml de solución salina isotónica estéril para homogeneizar, se cubrió con papel parafina y se mantuvo a 36.5°C durante las 7 horas que duró la observación. Se tomaron 100 µl de la solución anterior y se agregaron 900 µl de solución isotónica, los espermatozoides se contaron en una cámara de Neubauer al microscopio contando el total de espermatozoides móviles en cuatro cuadros de la cámara, repitiendo el procedimiento cada hora durante 7 horas.

Estudio de la cinética de muerte de espermatozoides (no inoculados)

El volumen de semen eyaculado fue de 1.0ml. La muestra luego fue diluida con 0.5ml de solución isotónica estéril, posteriormente se incubó a 36.5°C cubriendo el vaso de precipitado con parafina. Posteriormente se tomaron 100 µl de la muestra y se agregaron 900 µl de solución isotónica. Los espermatozoides se contaron cada hora en una cámara de Newbower al microscopio. En la tabla 2 se presentan los datos experimentales.

En la figura 1 se muestra la cinética de muerte de espermatozoides mantenidos a temperatura constante. Observamos que el efecto del tiempo durante las primeras tres horas es mínimo (7% tomando en cuenta que el % de muertes no es igual a 0 en el tiempo 0) situación que podemos aprovechar para comparar la mortalidad de los espermatozoides inoculados, con los no

Tiempo hrs	Número de espermatozoides			Fracción de espermatozoides, %	
	c/mov.	s/mov.	total	inmov.	mov.
0	147	3	150	2	98
1	135	6	141	4	96
2	175	11	186	5	95
3	216	17	233	7	93
4	205	22	227	9	91
5	217	32	249	12	88
6	210	54	264	20	80
7	215	133	348	38	62

Tabla 2. Cinética de muerte de espermatozoides.

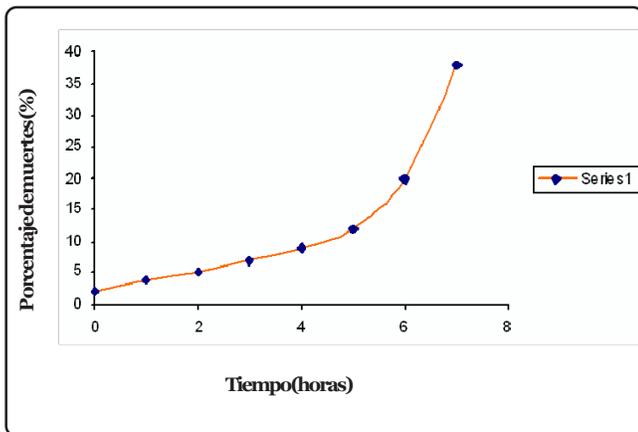


Figura 1. Cinética de muerte de espermatozoides no inoculados.

inoculados, en función del tiempo de exposición y de la dosis inoculada.

Efecto del cromo sobre la cinética de muerte

Para poder realizar un estudio de cinética de muerte de espermatozoides humanos, se determinó una concentración letal 50, que es igual a 0.7 μM. Partiendo de esta concentración se seleccionaron dosis menores de cromo (VI) (0.3 – 0.7 μM), para observar el efecto directo de dosis pequeñas sobre la cinética de muerte de espermatozoides humanos.

Estudio de la cinética de muerte de espermatozoides inoculados

Con base en la concentración letal 50 (CL50) determinada anteriormente, se seleccionó un rango de dosis para realizar el estudio cinético de muerte. El rango de dosis de dicromato de potasio se eligió con base en el logaritmo de CL50: de una a cuatro décimas logarítmicas por debajo del logaritmo de CL50, para buscar la concentración efectiva mínima.

Para el experimento utilizamos un rango de concentraciones que varió de 0.3 μM a 0.7 μM

de dicromato de potasio. Una vez inoculados se realizó una cuenta de espermatozoides en el tiempo 0, y luego cada hora hasta tres horas.

Se midió el volumen de cada muestra y se agregó un volumen igual de solución isotónica. Posteriormente, de cada muestra se tomaron 200 μL de espermatozoides y 800 μL de solución isotónica. 200 μL de esta solución se usaron para los controles y para el experimento con dicromato de potasio (100 μL de K₂Cr₂O₇).

Para la muestra inoculada usamos las siguientes concentraciones de K₂Cr₂O₇: 0.003, 0.004, 0.005, 0.006 y 0.007 μM. Los espermatozoides se contaron cada hora en una cámara de Neubauer bajo el microscopio óptico. En las figuras 2 y 3 se muestran el efecto inmediato de las dosis de cromo sobre la cinética de muerte de las cinco muestras y el efecto promedio, correspondiente.

Como podemos observar en las figuras 2 y 3 existe una dependencia del porcentaje de muertes con respecto a la dosis, inmediatamente después de la inoculación, con una tendencia a la saturación del efecto con concentraciones cercanas a 0.6-0.7 μM de cromo y con una mortalidad máxima en promedio no mayor al 50%.

En las figuras 4 y 5 se muestra el efecto de las dosis de cromo después de una hora de exposición sobre la cinética de muerte de las cinco muestras y el efecto promedio, correspondiente. Como podemos observar en la figura 4 la muestra #5 tiene la tendencia de saturación del efecto tóxico de cromo con dosis mayor de 0.4 μM.

En la figura 5 se presenta el efecto promedio de cromo sobre la cinética de muerte para las otras 4 muestras. Estas muestras no presentan una tendencia a la saturación del dicho efecto.

Después de un tiempo de exposición de dos horas (Fig. 6) se

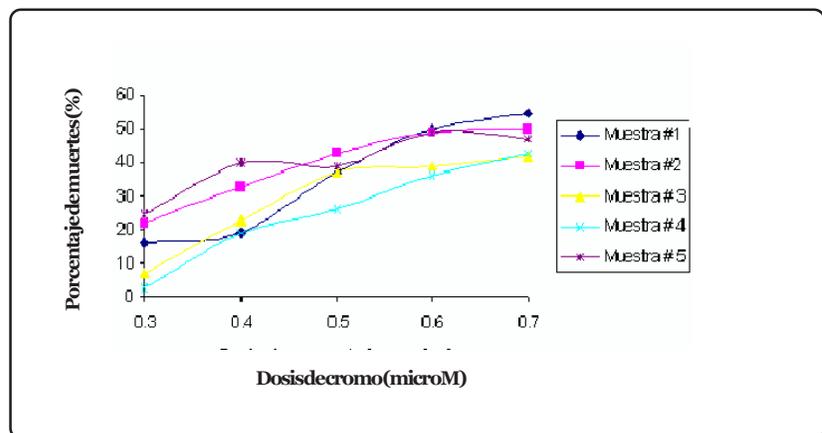


Figura 2. Efecto inmediato de diferentes dosis de cromo sobre el porcentaje de espermatozoides muertos.

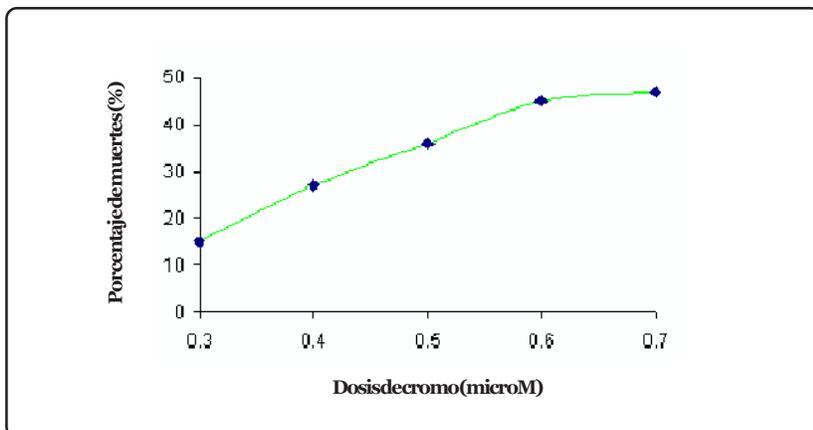


Figura 3. Efecto inmediato de la inoculación de espermatozoides con diferentes dosis de cromo VI, promedio de cinco muestras.

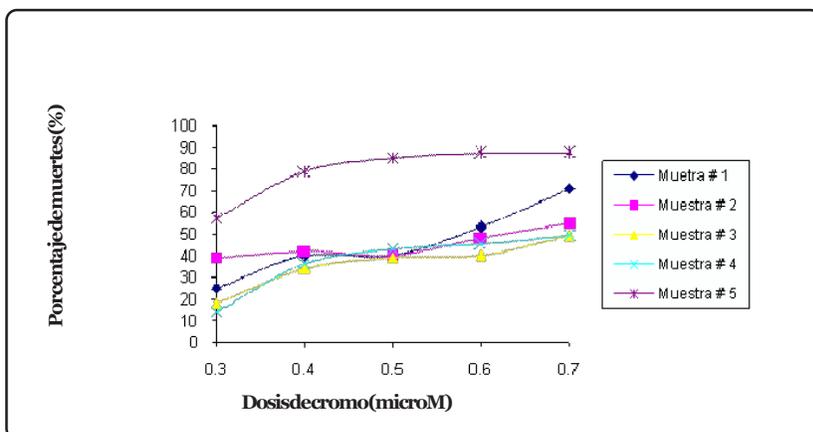


Figura 4. Efecto del cromo VI sobre la cinética de muerte después de 1 hora de exposición.

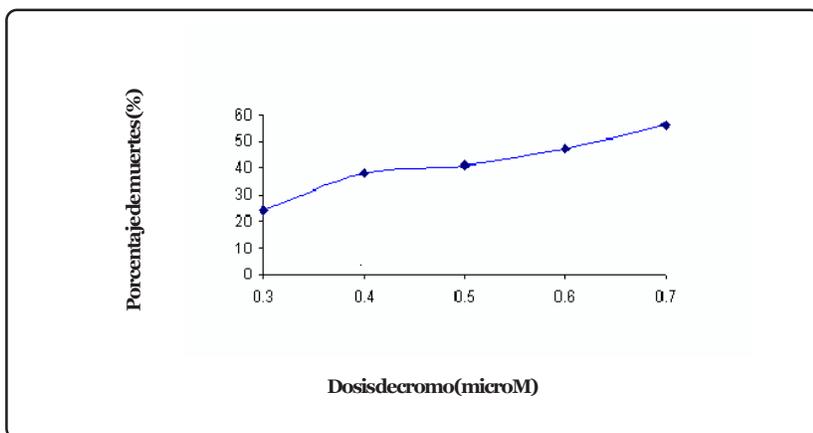


Figura 5. Efecto de la inoculación de diferentes dosis de cromo (VI) sobre la cinética de muerte de espermatozoides, después de 1 hora de exposición, promedio de todas las muestras.

observa un interesante efecto: dos de las muestras (# 1 y # 5) presentan una mortalidad de casi el 100%, mientras que los tres restantes muestran una mortalidad entre 40 y 65% sin tendencia a la saturación del efecto con diferentes dosis de cromo. En la figura 7 se muestran dos promedios de porcentaje de muertes, uno de las muestras # 1 y # 5, y otro de las restantes, donde es más evidente el efecto anteriormente descrito.

Después de tres horas de exposición al cromo (figuras 8 y 9) la mayor parte de las muestras presentan un porcentaje muy alto de muertes, por lo que no es posible observar un gran efecto de la dosis de cromo. Por esa misma razón no se toman en cuenta las muestras # 1 y # 5. En este caso el efecto del tiempo de exposición es mucho mayor que el posible efecto de la dosis. Sin embargo, en el promedio sí se aprecia un pequeño efecto de la dosis, con tendencia a la saturación del efecto tóxico (Fig. 9).

Por otro lado, cuando observamos el efecto del tiempo de exposición y de la dosis de cromo¹⁰⁻¹⁴ simultáneamente la dependencia del porcentaje de las muertes con respecto a la dosis se ve modificada por el tiempo de exposición. Sin embargo, esta modificación depende, en nuestra opinión, de la susceptibilidad individual de la muestra. Es evidente que el rango de porcentaje inicial de muertes se eleva en función del tiempo de exposición.

En la muestra #1 por ejemplo, después de dos horas tenemos 28% de muertos, con un 2% inicial en el control, mientras que el grupo correspondiente a la dosis mínima 3 μM, tuvo 16% de muertos inmediatamente y 98% después de dos horas. Resulta evidente un efecto del tiempo de exposición.

CONCLUSIONES

Microconcentraciones de cromo (de 0.3 μM a 0.7 μM) modifican la cinética de muerte de los espermatozoides desde un 15 hasta 48% dependiendo de la dosis. La dependencia del porcentaje de muerte de los espermatozoides con respecto a la dosis, se puede modificar en función del tiempo de exposición (*in-vitro*). Esto último significa que los espermatozoides son células muy sensibles y son dañados por estas concentraciones tan bajas de cromo. Existen diferencias de susceptibilidad individual entre las muestras.

A partir del estudio de cinética de muerte podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1. La dosis letal 50 (L50) de cromo es igual en promedio 0.7 μM.
2. Hay un efecto de la dosis sobre la cinética de muerte de los espermatozoides,

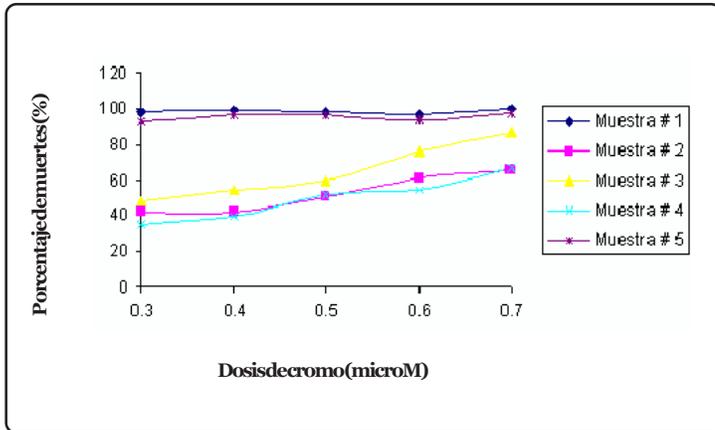


Figura 6. Efecto del cromo sobre la cinética de muerte con tiempo de exposición de 2 horas.

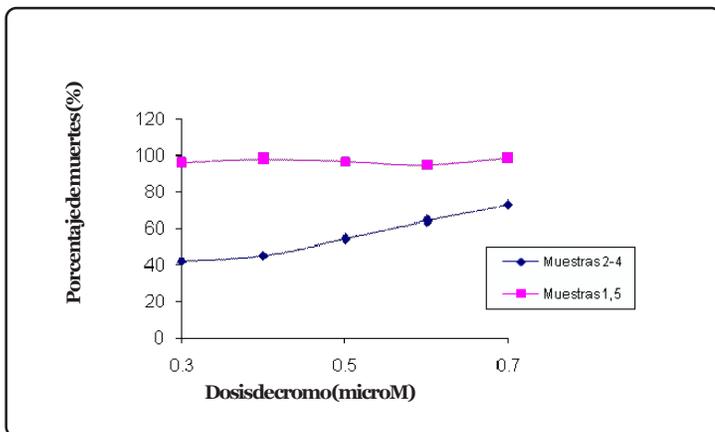


Figura 7. Efecto promedio del cromo sobre la cinética de muerte de espermatozoides, con un tiempo de exposición de 2 horas.

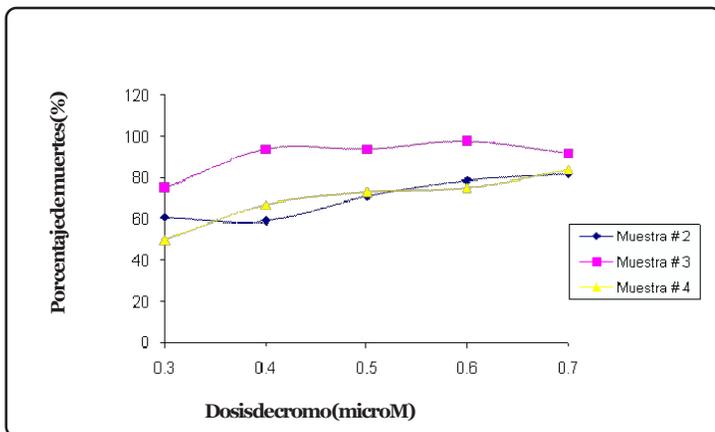


Figura 8. Efecto del cromo sobre la cinética de muerte con tiempo de exposición de 3 horas.

incrementándose la mortalidad de un 15-48% dependiendo de la dosis. Esto significa que encontramos una relación prácticamente lineal entre un aumento de la concentración inoculada y la mortalidad de los espermatozoides inoculados, concluyendo que a mayor concentración mayor número de muertes en menor tiempo.

3. Hay un efecto del tiempo de exposición, que es independiente de la dosis, que incrementa así mismo la mortalidad, en proporción variable. Es decir hay una curva de mortalidad a las dosis manejadas, independiente de la concentración, que es modificada en función del tiempo de exposición.

4. Existen diferencias de susceptibilidad individual entre las muestras. Es decir los espermatozoides de algunos sujetos resultaron más sensibles que los de otros, lo que con el número de muestras manejado, no puede ser considerado estadísticamente significativo, sin embargo, se consigna como indicio observado en el desarrollo del trabajo.

5. La dependencia del porcentaje de muertes con respecto a la dosis, se puede modificar en función del tiempo de exposición. Observamos claramente dos tipos de influencia en la mortalidad de los espermatozoides, una en función de la concentración y otra en función del tiempo de exposición, que si bien se suman en cuanto al efecto en la mortalidad, son efectos independientes. Lo que quiere decir que una concentración menor puede ser tóxica si el tiempo de exposición es prolongado. Por otro lado una concentración mayor es tóxica, independientemente del tiempo de exposición, aunque puede serlo aún más en función del tiempo.

6. Los espermatozoides son células extremadamente sensibles a sustancias tóxicas, aunque es importante señalar que *in vivo* existen mecanismos que amortiguan el efecto tóxico de estas sustancias. Por otro lado, es difícil conocer la distribución de estas sustancias en los diferentes tejidos y fluidos orgánicos, siendo predecible sólo en forma indirecta.

7. Es innegable que los mecanismos *in vivo* modifican el efecto observado *in vitro*, sin embargo, los experimentos son importantes a fin de conocer las concentraciones que pueden afectar las células reproductivas, que en un momento dado pueden ser semejantes a las alcanzadas en exposiciones prolongadas o repetitivas.

8. Es importante realizar este tipo de experimentos con cada sustancia tóxica existente, así como sus posibles metabolitos, a fin de conocer si éstos o aquellas afectan la cuenta y características de los espermatozoides humanos. Ampliando el presente trabajo, se pueden estudiar comparativamente las espermatobioscopias de sujetos sanos sin exposición a tóxicos con aquellas de sujetos expuestos a una sustancia en particular.

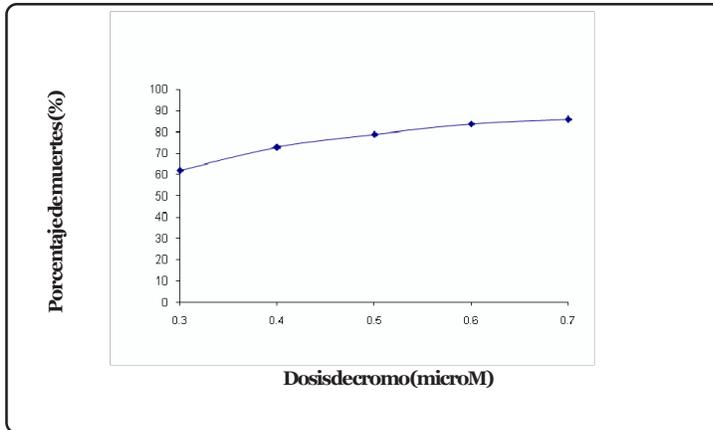


Figura 9. Efecto promedio del cromo sobre la cinética de muerte después de 3 horas.

REFERENCIAS

1. NIOSH, Chromium p70 (National Institute for Occupational Safety and Health) YIV. 1992.
2. Agency for toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for Chromium. U.S: Public Health. Service U.S. Department of Health and Human Services, ATLANTA, CA 1993.
3. World. Health Organization. Chromium. Environmental Health. Criteria 61, Geneva, Switzerland 1988.
4. U.S. Environment Protection Agency. Health Assessment. Document for Chromium. EPA/600/883/014A. Environmental Criteria and Assessment office, office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Research Triangle Institute, NC. 1983.
5. Chen J, Thilly WG. "Mutational spectrum of chromium (VI) in human Cells". *Mutat Res* 1994; 323 (1-2): 21-7.
6. U.S. Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System (IRIS) on Chromium. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati, OH. 1993.
7. Moulin JJ, Wild P, Haguenoer J.M., Francon D., De Gaudemaris R, Mur JM, Mareau M., Gary Y., Toamain JP., Birembaut Y, et al. A mortality study among mild steel and Stainless steel welders. *Br J Ind. Med.* 1993; 50(3): 234-43.
8. Susa N, Deno S, Furukawa Y, Ueda I, Sugiyama M. Potent protective effect of melatonin on Chromium (VI) induced DNA single-strand breaks, cytotoxicity, and lipid peroxidation in primary cultures of rat. Hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997; 144 (2): 377-84.
9. Sugiyama M, Tsuzuki K, Ogura R. Effect of ascorbic acid on DNA damage, cytotoxicity, glutathione reductase and formation of paramagnetic chromium in Chinese hamster V-76 cells treated with Sodium Chromate (VI). *J. Biol. Chem.* 1991; 266(6): 3383-6.
10. Bonde J.P. The risk of male subfecundity attributable to welding of metals. Studies of semen quality, infertility, fertility, adverse pregnancy outcome and childhood malignancy. *Int. J Androl* 1993; 16 Suppl 1: 1-29.
11. Lowine RJ, Mathew RM, Chenault CB, Brown MH, Hurlt ME, Bentley KS, Mohr KL, Working, PK. Differences in the quality of semen in outdoor workers during summer and winter. *N. Engl. J. Med* 1990; 323 (1): 12-16.
12. Elbetieha A, AC Hamood MH. Long term exposure of male and female mice to trivalent and hexavalent chromium compounds effect on fertility. *Toxicology* 1997; 116 (1-3): 39-47.
13. Kerger BD, Finley BL, Cobertt GE, Dodge DG, Paustenbach D.J. Ingestion of Chromium (VI) in drinking water by human volunteers: absorption, distribution, and excretion of single and repeated doses. *J. Toxicol. Environ. Health* 1997; 50 (1): 67-95.
14. Franchini I, Multlé A. Selected toxicological aspects of chromium (VI) compounds. *Sci total Environ* 1988; 71(3): 379-87.
15. Minoia C, Cavalleri A. Chromium in urine, semen and red blood cells in the biological monitoring of workers exposed to different chromium valence states. *Sci total Environ* 1988; 71 (3): 323-7.
16. E. Knobil and J. Neil et al. *The Spermatozoon Ch. 2. The Physiology of reproduction.* Ed. E. Knobil and J. Neill et al Raven Press, LTD New York 1998: 27-67.
17. Norma oficial Mexicana número 10 (NOM-010-STPS-1994) Secretaria del Trabajo y Previsión Social.