



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Facultad de Medicina

Estudio sobre la Calidad Seminal en Jóvenes

Universitarios de la Región de Murcia

D^a. Laura Sarabia Cos

2015



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Programa de Doctorado en Salud Pública

Estudio sobre la calidad seminal en jóvenes
universitarios de la Región de Murcia

Directores:

Dr. Alberto M. Torres Cantero

Dr. Jaime Mendiola Olivares

Dr. Julián Jesús Arenal Gonzalo

Laura Sarabia Cos

15 Julio de 2015

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores su dedicación y apoyo.

A Alberto, por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral y por su confianza en mi trabajo durante estos cinco años.

A Jaime, por guiarme durante todo el proceso, por hacer que las cosas parezcan sencillas, por su amabilidad y paciencia. Sin su ayuda no habría sido capaz.

A Julián, por su generosa colaboración, su comprensión y por su actitud optimista cuando me hizo falta.

También quiero agradecer a Manoli Roca que me animó para que me involucrara en este proyecto e hizo posible la colaboración con USP Dexeus Murcia. A Carmen Ruiz, Estela Belmonte, Fuensanta Mas y a todo el personal de la clínica por su ayuda en la recopilación de datos.

A Lidia Mínguez Alarcón, Guillermo Vivero Salmerón, José Juan López Espín y todas aquellas personas que con su trabajo han contribuido en la realización de esta investigación.

A mi empresa, Quirón Dexeus Murcia, por estos diez años de trabajo que me han permitido desarrollarme profesionalmente.

Y por último, agradecer igualmente a mi familia y amigos su apoyo. A Salvi y a María por animarme y compartir con su amistad una meta en común. A Clara, Raquel, Ana Elisa y Pablo por quitarle drama a mis agobios. A Marcial, por su ayuda y cariño. A mis padres y hermanos, Paco y Eduardo, por su comprensión y de manera especial a mi madre por animarme a conseguir nuevos retos, por su ayuda logística y por creer siempre en mí. Y a Pedro, mi niño, por portarse tan bien.

INDICE

1. RESUMEN.....	5
1.1 <i>Resumen.....</i>	5
1.2 <i>Summary.....</i>	7
2. INFORMACIÓN SOBRE LAS PUBLICACIONES.....	9
3. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	11
3.1 <i>Espermatozoide humano.....</i>	11
3.2 <i>Espermatogénesis.....</i>	13
3.3 <i>Parámetros seminales.....</i>	16
3.3.1 <i>Volumen seminal.....</i>	17
3.3.2 <i>Motilidad espermática.....</i>	17
3.3.3 <i>Concentración y recuento espermático.....</i>	18
3.3.4 <i>Morfología espermática.....</i>	18
3.3.5 <i>Estudio de la cromatina espermática.....</i>	19
3.4 <i>Determinantes de calidad seminal.....</i>	20
3.5 <i>Estrés oxidativo y calidad seminal.....</i>	22
3.6 <i>¿Está decreciendo la concentración espermática?.....</i>	24
4. PRESENTACIÓN DE LOS TRABAJOS.....	28
4.1 <i>Objetivos generales y específicos.....</i>	28
4.2 <i>Resumen global de los resultados y conclusiones finales.....</i>	29
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
6. COPIA DE TRABAJOS PUBLICADOS.....	42

1. RESUMEN

1.1 Resumen

Diversos estudios muestran una disminución en la concentración espermática en las últimas décadas, aunque en este hecho se han observado diferencias geográficas importantes. El descenso de la concentración espermática se ha atribuido a exposiciones a tóxicos y contaminantes ambientales, estilos de vida o ciertos factores nutricionales pero que, en gran medida, son aún desconocidos, permanecen inexplorados o no han sido suficientemente estudiados.

Entre 2010 y 2011 se llevó a cabo un estudio transversal en jóvenes universitarios de la Región de Murcia (n=215) con el propósito de estudiar su calidad seminal. Los participantes proporcionaron una muestra seminal, se les realizó un examen andrológico y cumplimentaron cuestionarios epidemiológicos sobre hábitos de vida, incluido un cuestionario de frecuencia alimentaria. El análisis de los parámetros seminales se realizó siguiendo las recomendaciones de la OMS (2010) y también se analizó la fragmentación del ADN espermático mediante el método de dispersión de la cromatina espermática (SCD). A partir de los datos de este estudio, en la presente tesis doctoral se profundiza en el estudio de la calidad seminal en jóvenes varones, abordando el problema desde distintos aspectos.

En el primer trabajo se estudió la asociación entre la ingesta dietaria de nutrientes antioxidantes y la calidad seminal en dichos varones. Los resultados indicaron una asociación positiva entre el consumo de distintos nutrientes antioxidantes (criptoxantina, vitamina C, licopeno y b-caroteno) y el recuento total de espermatozoides móviles. El volumen seminal también aumentó con una mayor ingesta de vitamina C, licopeno y b-caroteno. En conclusión, nuestro estudio sugirió que algunos parámetros espermáticos podrían ser sensibles a la ingesta de nutrientes antioxidantes, y que la recomendación actual de ingesta de vitamina C podría ser insuficiente para alcanzar el máximo beneficio en términos de calidad seminal.

En el segundo trabajo, el objetivo fue examinar si la calidad seminal había variado durante la última década entre los jóvenes del sureste español. Para llevar a

cabo este trabajo se utilizaron los datos obtenidos en un estudio anterior realizado en Almería entre 2001 y 2002. Los datos del estudio de Almería se incluyeron en un análisis de tendencias junto con los datos relativos a los jóvenes estudiantes murcianos. Se utilizó modelos de regresión lineal múltiple para analizar en la población combinada un efecto de cohorte de nacimiento durante el período de estudio 2001-2011. Nuestros resultados indicaron que el recuento total y la concentración espermática podrían haber disminuido en los jóvenes del Sureste español durante la última década, mostrando una tendencia temporal adversa en dichos parámetros. En el sur de España recientemente ha tenido lugar un aumento de la industrialización, y con ello, un aumento del riesgo de posibles exposiciones potencialmente adversas que podrían afectar a distintos parámetros reproductivos masculinos.

En el tercer trabajo se estudió la fragmentación del ADN espermático en los jóvenes varones. Dicha fragmentación podría estar relacionada con procesos de estrés oxidativos y comprometer la calidad seminal. Por una parte, se describieron y analizaron los índices de fragmentación del ADN espermático (SDF) de las muestras tras la eyaculación, lo que se denominó como SDF basal. Y por otro lado, se estudió la dinámica de la fragmentación del ADN espermático, es decir, el incremento de la fragmentación del ADN con el tiempo tras la eyaculación. Para estudiar la dinámica se incubaron las muestras a 37°C durante 2.5, 17 y 24 horas y se calculó la tasa de fragmentación del ADN espermático (*rate* SDF; rSDF). Los resultados obtenidos indicaron unos valores medios de SDF basal relativamente altos comparados con otros estudios publicados. La rSDF fue mayor durante las primeras horas tras la eyaculación. Por otra parte, las muestras con SDF basal superior a 30% presentaron una rSDF mayor durante las primeras horas de incubación comparadas con las muestras con niveles basales inferiores a 15%.

1.2 Summary

In the last decades several studies have shown a decrease in human sperm concentrations. In spite of this fact, there have been significant geographical differences. The decline in sperm count has been attributed to exposure to environmental toxins and pollutants, lifestyle or certain nutritional factors which are still largely unknown, unexplored or have been understudied.

Between 2010 and 2011 we conducted a cross-sectional study among university students in the Region of Murcia (n = 215) in order to study their sperm quality. Participants provided a semen sample, underwent an andrological examination, and filled out epidemiological questionnaires on lifestyle and a food frequency questionnaire. The seminal analysis was performed following the WHO guidelines (2010) and sperm DNA fragmentation was also analyzed by the sperm chromatin dispersion method (SCD). From all this data, the current thesis explores the semen quality in young males, approaching the problem from different perspectives.

In the first study, the association between dietary intake of antioxidant nutrients and semen quality was studied. The results indicated a positive association between the consumption of various antioxidant nutrients (cryptoxanthin, vitamin C, lycopene and b-carotene) and total motile sperm count. The seminal volume also increased with a higher intake of vitamin C, lycopene and b-carotene. In conclusion, our study suggested that some sperm parameters could be sensitive to the intake of antioxidant nutrients, and that the current recommended intake of vitamin C may be insufficient to achieve the maximum benefit in terms of semen quality.

In the second study, the aim was to examine whether semen quality has changed among Spanish young men in the last decade. To carry out this study we used data obtained in a previous study in Almeria between 2001 and 2002. This data was added to our current population in order to analyze the sperm quality trend in Southern Spain. Multiple linear regression models were used to analyze the combined effect of population birth cohort during the study's period 2001-2011. Our results indicated that the total count and sperm concentration may have decline in young Spanish men over the last decade, showing an adverse temporal trend in these parameters. Southern

Spain has recently gone through a growing innovation and industrialization in many areas, and with this, an increased risk of potential adverse exposures, which might affect reproductive parameters in men.

In the third study, the sperm DNA fragmentation was studied in young men. Such fragmentation could be related to oxidative stress and compromise semen quality. On the one hand, sperm DNA fragmentation (SDF) of the samples after ejaculation was analyzed, which was named as basal SDF. On the other hand, the dynamics of sperm DNA fragmentation, that is the increase of DNA fragmentation after ejaculation time was studied. To study the dynamics, samples were incubated at 37°C for 2.5, 17 and 24 hours and the rate of sperm DNA fragmentation (SDF rate; rSDF) was calculated. The results showed average values of basal SDF relatively high compared with other published studies. The rSDF was higher during the first hours after ejaculation. Besides, the samples with basal SDF higher to 30% showed an elevated rSDF during the first hours of incubation compared with the samples with basal levels lower than 15 %.

2. INFORMACIÓN SOBRE LAS PUBLICACIONES

Esta tesis doctoral ha sido realizada según la modalidad de compendio de trabajos publicados en revistas científicas incluidas en índices de calidad como el *Journal Citation Reports* (JCR).

Las publicaciones que componen esta tesis son:

Artículo 1:

“Mínguez-Alarcón L, Mendiola J, López-Espín JJ, **Sarabia-Cos L**, Vivero-Salmerón G, Vioque J, Navarrete-Muñoz EM, Torres-Cantero AM. Dietary intake of antioxidant nutrients is associated with semen quality in young university students. *Hum Reprod.* 2012;27:2807-14”

Información previa y criterios de calidad:

- Manuscrito recibido el 27/4/2012; aceptado el 6/6/2012.
- Factor de impacto (JCR, 2012): 4,670
- Área temática y posición: Obstetrics & Gynecology; 3/78 (D1/Q1).

Este fue el primer trabajo de investigación en el que participé. Realicé todo el trabajo de campo y adquisición de datos del presente estudio, incluyendo análisis de calidad seminal, cuestionarios epidemiológicos y controles de calidad. Colaboré en la elaboración del primer borrador del manuscrito y en los análisis estadísticos, con el objetivo de estudiar la posible relación entre el consumo de antioxidantes y la calidad seminal en estos sujetos. También colaboré e intervine en la interpretación de los principales resultados obtenidos, así como en la redacción de los borradores hasta la versión final del manuscrito

Artículo 2:

“Mendiola J, Jørgensen N, Mínguez-Alarcón L, **Sarabia-Cos L**, López-Espín JJ, Vivero-Salmerón G, Ruiz-Ruiz KJ, Fernández MF, Olea N, Swan SH, Torres-Cantero AM. Sperm counts may have declined in young university students in Southern Spain. *Andrology.* 2013;1:408-13”

Información previa y criterios de calidad:

- Manuscrito recibido el 3/10/2012; aceptado el 10/12/2012.
- Factor de impacto (JCR, 2013): -
- Área temática y posición: Andrology; 7/7 (Q4).

Este fue el segundo trabajo de investigación en el que participé. Realicé todo el trabajo de campo y adquisición de datos del presente estudio, incluyendo análisis de calidad seminal, cuestionarios epidemiológicos y controles de calidad. Colaboré en la elaboración del primer borrador del manuscrito y en los análisis estadísticos, con el objetivo de estudiar la calidad seminal de nuestra población, compararla con otras poblaciones y mostrar posibles tendencias seculares en el tiempo. También colaboré e intervine en la interpretación de los principales resultados obtenidos, así como en la redacción de los borradores hasta la versión final del manuscrito.

Artículo 3:

“**Sarabia-Cos L, Arenal-Gonzalo JJ, Mínguez-Alarcón L, Gosálvez J, Mendiola J, Torres-Cantero AM.** Estudio de la dinámica de fragmentación del ácido desoxirribonucleico espermático en jóvenes varones. Rev Int Androl. 2015;13:1-7”

Información previa y criterios de calidad:

- Manuscrito recibido el 15/7/2014; aceptado el 4/8/2014.
- Factor de impacto (JCR, 2014): 0,227
- Área temática y posición: Andrology; 6/7 (Q4).

He liderado la elaboración de este manuscrito. Realicé todo el trabajo de campo y adquisición de datos del presente estudio, incluyendo análisis de calidad seminal y dinámica de fragmentación del ADN espermático. Realicé las búsquedas bibliográficas para actualizar la información existente sobre el objetivo del estudio e interpretar los resultados obtenidos. También realicé los análisis estadísticos para estudiar las características de la dinámica de fragmentación del ácido desoxirribonucleico espermático en dicha población. Por último, también he liderado la realización de las tablas y gráficos relacionados con los resultados principales, así como en la redacción de los borradores hasta la versión final del manuscrito.

3. INTRODUCCIÓN GENERAL

3.1 Espermatozoide humano

El espermatozoide maduro es una célula extremadamente especializada, diseñada exclusivamente para transmitir su material genético al ovocito. Para ello, cuenta con un potente flagelo que le permite desplazarse a través de un medio acuoso y carece de orgánulos citoplasmáticos como ribosomas, retículo endoplasmático o complejo de Golgi, los cuales son innecesarios para la tarea de ceder el ADN al óvulo. Para poder accionar este flagelo con mayor eficiencia, el espermatozoide presenta numerosas mitocondrias colocadas estratégicamente donde pueden proporcionar con la mayor eficacia la energía que necesita el flagelo para su movimiento (1).

El espermatozoide está formado por dos regiones morfológica y funcionalmente diferentes, rodeadas por una misma membrana plasmática: la cabeza, que contiene un núcleo haploide extremadamente condensado, y la cola, que impulsa al espermatozoide hacia el óvulo y le ayuda a penetrar a través de la envoltura del óvulo. El ADN del núcleo está densamente empaquetado, de modo que su volumen está reducido al mínimo para su transporte (1).

En la cabeza del espermatozoide existe una vesícula secretora llamada vesícula acrosómica que contiene enzimas hidrolíticas que ayudan a atravesar la envoltura externa del ovocito. Cuando el espermatozoide entra en contacto con un ovocito, el contenido de la vesícula se libera por exocitosis, lo que se conoce como reacción acrosómica (1).

Estructura de la cromatina espermática

El material genético de los espermatozoides de mamíferos presenta una estructura diferente al resto de las células. La cromatina espermática está estructurada de manera que resulta seis veces más compacta y con un volumen 40 veces menor que la cromatina de las células somáticas (2). Este empaquetamiento hace que el espermatozoide resulte transcripcionalmente inactivo pero le proporciona estabilidad adicional necesaria para su desplazamiento en el tracto reproductivo femenino (3)

La cromatina espermática de los mamíferos presenta tres dominios estructurales diferentes: ADN unido a protaminas formando toroide (4), ADN unido a histonas (5) y ADN

unido a la matriz nuclear espermática en las regiones de anclaje a la matriz (MARs) a intervalos regulares de 50 kb (6).

La mayoría de la cromatina espermática está unida a protaminas y compactada formando una estructura denominada toroide. Los toroides contienen aproximadamente 50 kb de ADN (4). Las protaminas son unas proteínas específicas de los espermatozoides maduros, no se encuentran en otros tipos celulares. Se trata de unas proteínas pequeñas y ricas en residuos de arginina cargados positivamente que neutralizan las cargas negativas del ADN (7). Por otra parte, las protaminas de mamífero también poseen cisteínas que mediante uniones disulfuro intermoleculares aumentan la estabilidad de la cromatina (7). La principal función de este dominio estructural es proporcionar protección a la molécula de ADN durante el transporte hasta llegar al ovocito. En los espermatozoides humanos encontramos dos tipos distintos de protaminas: Protamina 1 (P1) y Protamina 2 (P2). La proporción P1/P2 varía entre las distintas especies, siendo en humanos aproximadamente 1 (8). Hay numerosos estudios que relacionan los desequilibrios en la ratio P1/P2 con un descenso de la calidad seminal, un aumento de la fragmentación del ADN espermático y un descenso en la capacidad del espermatozoide para fecundar al ovocito (9).

Una pequeña fracción de la cromatina espermática, entre un 2 y un 15%, se encuentra unida a histonas. Las histonas no se distribuyen al azar, se encuentran asociadas a regiones específicas del ADN. Un estudio realizado por el grupo de Hammoud y colaboradores en 2009 observó que las histonas se asociaban preferentemente a genes importantes para el desarrollo temprano (5). Las teorías actuales sugieren que la cromatina espermática asociada a histonas incluye genes funcionales para la espermiogénesis y el inicio de la fecundación (5). Se trataría de cromatina activa residual que persiste a la condensación (3)

Por último, una tercera fracción de la cromatina se organiza en dominios formando bucles que se unen a la matriz nuclear (11). Este dominio estructural está relacionado con distintas funciones, por una parte parece que es imprescindible para que tenga lugar la replicación del ADN del pronúcleo paterno y por otro lado actúa como punto de control de la integridad del ADN espermático tras la fecundación (3).

3.2 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso complejo mediante el cual se generan los espermatozoides a partir de las células germinales presentes en el testículo. La producción de espermatozoides comienza en la pubertad después de un largo período preparatorio de “pre-espermatogénesis” en el feto y durante la niñez (12).

En la espermatogénesis podemos distinguir tres etapas principales: Fase proliferativa o espermatogoniagénesis, fase meiótica y la espermiogénesis.

Fase proliferativa

Las espermatogonias son células diploides que se sitúan en la base del epitelio seminífero y a partir de las cuales se diferencian las células que darán lugar finalmente a los espermatozoides. En el hombre se han descrito tres tipos distintos de espermatogonias en función de su localización en el epitelio seminífero, su morfología y las características del núcleo; espermatogonias tipo A oscuro, espermatogonias tipo A claro y espermatogonias tipo B (13). Las espermatogonias tipo A oscuras actúan como células de reserva y sólo se dividen ocasionalmente para producir espermatogonias tipo A claro. Las espermatogonias tipo A claro se dividen mediante mitosis dando lugar a dos espermatogonias de tipo B. Las espermatogonias tipo B se dividen mitóticamente para dar lugar a los espermátocitos primarios (12). Las espermatogonias se multiplican continuamente mediante mitosis sucesivas.

Fase meiótica

En esta fase los espermátocitos primarios se dividen mediante meiosis para dar lugar a las espermátides. Las células que experimentan la primera división meiótica, también llamada meiosis reduccional, son los espermátocitos primarios. Como resultado de este proceso, se forman a partir de cada espermátocito primario, dos espermátocitos secundarios. Los dos espermátocitos secundarios sufren una segunda división meiótica, cuyo resultado son cuatro espermátides (1). Los espermátocitos iniciales en estadio de proleptonema se encuentran en un principio en el compartimento basal y son semejantes a las espermatogonias. Pronto migran y se alejan de la lámina basal para atravesar el complejo de unión Sertoli-Sertoli e introducirse en el compartimento adluminal. Los espermátocitos primarios aumentan de tamaño y presentan una morfología nuclear

distintiva al atravesar los distintos estadios de la profase meiótica. Durante esta primera división meiótica tiene lugar la replicación del ADN, condensación de los cromosomas, el emparejamiento de homólogos y el entrecruzamiento cromosómico. Tras esta primera división meiótica los espermatocitos primarios pasan a ser espermatocitos secundarios, que se vuelven a dividir, sin replicar su ADN, para dar lugar a las espermátidas (12).

Un rasgo interesante de la espermatogénesis es que las células germinales masculinas en desarrollo no completan la división citoplasmática (citocinesis) ni durante la mitosis ni durante la meiosis. Por consiguiente, grandes clones de células hijas diferenciadas descendientes de una misma espermatogonia madura permanecen conectados por puentes citoplasmáticos, formando un sincitio. Los puentes citoplasmáticos se mantienen hasta el final de la diferenciación de los espermatozoides, cuando estos son liberados a la luz del túbulo. Estos puentes intercelulares permiten el intercambio de proteínas y productos génicos, de manera que aunque las espermátides son genéticamente haploides pueden disponer de todos los productos de un genoma diploide completo (1).

Fase espermiogénesis

En la espermiogénesis tiene lugar la citodiferenciación de las espermátides a espermatozoides. Una vez finalizada esta etapa los espermatozoides son liberados del epitelio seminífero. Las espermátides al inicio de la espermiogénesis, son células redondeadas con un núcleo esférico que presentan un aparato de Golgi yuxtannuclear, abundantes mitocondrias y un par de centriolos. A lo largo de esta fase dichas estructuras sufren importantes modificaciones (14). Entre los cambios más importantes destacan: la formación del acrosoma, el desarrollo de las estructuras del flagelo, la remodelación de la cromatina espermática y la eliminación del exceso de citoplasma (1). Durante la remodelación de la cromatina espermática se suceden distintos cambios en la composición de la misma. En primer lugar se incorporan unas proteínas denominadas variantes histónicas. Estas proteínas son formas no alélicas de las proteínas convencionales. A continuación, una vez que los nucleosomas se han desensamblado, las histonas son sustituidas por proteínas de transición (15). Finalmente las proteínas de transición son sustituidas por las protaminas para formar un complejo toroidal con el ADN altamente compactado (16). Durante la transición de histonas a protaminas se producen en la molécula de ADN una serie de roturas de doble cadena (17,18). Estas roturas transitorias en la molécula tienen lugar en

toda la población de espermátides durante la fase de elongación (19) y estos descansos transitorios en la estructura de la molécula de ADN son necesarios para que tenga lugar la remodelación.

La última etapa de la diferenciación de las espermátides consiste en su liberación del epitelio germinal hacia la luz de túbulo seminífero. Este proceso se denomina espermiación y es administrado por las células de Sertoli. Como resultado de la compleja cooperación de los filamentos intermedios y los túbulos citoplasmáticos de las células de Sertoli, las espermátides avanzan a la frontera de la luz del túbulo seminífero (12). Allí las espermátides maduras cierran sus puentes intercelulares, desconectando su contacto con el epitelio germinal y se convierten en células libres, que ahora se denominan espermatozoides. Las piezas más pequeñas de las espermátides con gránulos de ARN acumulados, unas pocas mitocondrias, gotitas de lípidos y las membranas se liberan, formando los llamados cuerpos residuales. La mayoría de estos residuos se incorporan y son digeridos por las células de Sertoli (20). Una vez que son liberados a la luz del túbulo seminífero, los espermatozoides pasan al epidídimo, un tubo muy sinuoso junto a los testículos donde son almacenados y se produce la maduración final (1).

Cinética de la espermatogénesis

El proceso de división y diferenciación de las células germinales sigue un patrón específico. En una sección histológica de un túbulo seminífero no se observan todos los tipos de células germinales, sino que únicamente es posible apreciar algunos de ellos que aparecen en forma de asociaciones celulares denominadas estadios. En la espermatogénesis en humanos podemos diferenciar 6 estadios, que se van sucediendo en el tiempo hasta completar un ciclo de la espermatogénesis y vuelta a empezar (12). Desde que una espermatogonia empieza el proceso de diferenciación celular hasta que se diferencia en espermatozoide maduro transcurren 4,6 ciclos. La duración de cada ciclo es de aproximadamente 16 días, así que la duración total de la espermatogénesis es de 74 días. Las espermátidas maduras liberadas por el epitelio germinal como espermatozoides son transportadas a través del epidídimo durante otros 12 días más. Por lo tanto, un ciclo de espermatogénesis completo, desde espermatogonia a espermatozoide maduro, durará como mínimo 86 días (12).

3.3 Parámetros seminales

El semen es una combinación de espermatozoides diluidos en secreciones testiculares y del epidídimo, que se mezclan en el momento de la eyaculación con las secreciones de la próstata, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales (14).

El propósito de un análisis básico del semen es evaluar los parámetros clásicos del eyaculado, lo que aporta información importante sobre la situación clínica del individuo. Los parámetros evaluados son: aspecto, olor, licuefacción, viscosidad, pH, volumen, concentración espermática, recuento total de espermatozoides, motilidad espermática, morfología, aglutinación y la presencia de elementos celulares, como leucocitos o células germinales (14). La calidad seminal de una muestra queda determinada por los valores de los principales parámetros: la concentración o recuento espermático, la motilidad progresiva y la morfología espermática. Una muestra con buena calidad es aquella que presenta los valores de dichos parámetros por encima de los valores de referencia establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

La recolección y el análisis de la muestra de semen deben ser realizados mediante procedimientos estandarizados si se pretende que los resultados proporcionen información válida (21). La OMS publicó en 1980 un manual para el procesamiento de semen humano, con el fin de poder dar herramientas para una homogenización de este examen en todos los laboratorios clínicos, andrológicos y de investigación en el mundo. La quinta y última versión de este manual se publicó en el año 2010 y en ella se establecen nuevos valores de referencia de los parámetros seminales. Estos valores han sido definidos a través de una muestra representativa de la población mundial de varones cuyas parejas consiguieron embarazo en un tiempo igual o inferior a 12 meses (22).

Por otra parte, aunque el análisis de los parámetros seminales clásicos es la principal herramienta para el diagnóstico de la infertilidad masculina, el estudio de la integridad del ADN espermático se ha propuesto como un nuevo marcador que permita discriminar entre pacientes fértiles e infértiles. El estudio de la fragmentación del ADN espermático podría ser una herramienta útil complementaria a los parámetros seminales clásicos para valorar el potencial fértil de los varones (23).

3.3.1 Volumen seminal

El semen es una mezcla de una suspensión concentrada de espermatozoides almacenados en el epidídimo junto con secreciones fluidas formadas en las glándulas sexuales anexas (vesícula seminal, próstata, glándulas de Cowper). El volumen del eyaculado se forma principalmente a partir de fluidos procedentes de las vesículas seminales y de la próstata, siendo una pequeña parte procedente de las glándulas bulbouretrales y del epidídimo. Aproximadamente el 90% del volumen seminal está compuesto por secreciones de las glándulas sexuales anexas (21).

La medición del volumen seminal es esencial para la evaluación de la calidad seminal ya que nos permite calcular el recuento espermático total de espermatozoides y de células no espermáticas. La forma más precisa para determinar el volumen de una muestra de semen es medir su peso y a continuación calcular su volumen suponiendo que la densidad del semen es 1g/ml (24). El límite inferior de referencia para el volumen de semen es de 1.5 ml (percentil 5, IC 95%: 1.4 a 1.7)(21).

3.3.2 Motilidad espermática

Los espermatozoides cuentan con una estructura celular que les permite desplazarse a través de un medio acuoso hasta el ovocito, pero no todos presentan la misma capacidad para desplazarse. La OMS distingue varios tipos de movilidad en los espermatozoides

- Movilidad progresiva (PR), movimiento activo, ya sea lineal o en un círculo grande, independientemente de la velocidad.
- Movilidad no progresiva (NP), que incluye todos los otros patrones de movilidad con ausencia de progresión.
- Inmovilidad (IM) para espermatozoides sin movimiento.

La motilidad espermática se ha de valorar lo antes posible tras la obtención de la muestra. Cambios en la temperatura o el pH pueden afectar a la movilidad de los espermatozoides. Lo ideal es realizar dicho análisis 30 minutos tras la eyaculación y nunca después de una hora. La motilidad se puede definir de distintas maneras: Motilidad total (porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva y no progresiva), motilidad progresiva (porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva) y en algunas ocasiones como número total de espermatozoides con motilidad progresiva: se obtiene multiplicando el número total de espermatozoides en el eyaculado por el porcentaje de

espermatozoides progresivamente móviles. Los límites de referencia para la motilidad total (PR + NP) es del 40% mientras que para la motilidad progresiva (PR) es del 32% (21).

3.3.3 Concentración y recuento espermático

El recuento total y la concentración espermática están relacionados con las tasas de embarazo (25) y con el tiempo necesario para conseguir una gestación (26). Distintos estudios señalan a ambos parámetros como predictores de embarazo (27,28)

La concentración espermática es el número de espermatozoides por unidad de volumen. A la hora de valorar este parámetro se debe considerar el tiempo de abstinencia, ya que un tiempo de abstinencia elevado deriva en un aumento de la concentración total de espermatozoides. El recuento espermático total es el número total de espermatozoides en el eyaculado y se obtiene multiplicando el volumen seminal por la concentración espermática. La concentración espermática no es una medida directa de la capacidad para producir espermatozoides por parte del testículo, ya que está influenciado por el funcionamiento de las glándulas sexuales anexas. Para eyaculados normales, cuando el tiempo de abstinencia es corto y no se aprecian obstrucciones en el tracto genital masculino, el recuento espermático está correlacionado con el volumen testicular (29) y es una medida de la capacidad de los testículos para producir espermatozoides (21). El límite inferior de referencia para la concentración de espermatozoides es de 15×10^6 espermatozoides por ml (percentil 5, IC 95%: 12, 16×10^6) y para el recuento total de espermatozoides es de 39×10^6 espermatozoides por eyaculado (percentil 5, IC 95%: 33, 46×10^6)(21).

3.3.4 Morfología espermática

La morfología espermática está muy relacionada con la fertilidad y en particular, con la capacidad de fecundación de los espermatozoides tanto en fecundación in vitro (FIV) (30) como en inseminación artificial (31). La morfología espermática, especialmente la evaluada con criterios estrictos, es un buen factor pronóstico de fecundación in vivo e in vitro (14). Las observaciones realizadas a espermatozoides recuperados a partir del tracto reproductivo femenino, especialmente en el moco endocervical postcoital y también desde la superficie de la zona pelúcida, han ayudado a definir la apariencia de los espermatozoides morfológicamente normales (21).

La morfología se suele expresar como el porcentaje de espermatozoides normales. Por otra parte el número total de espermatozoides con morfología normal en la muestra de semen tiene significado biológico y se obtiene multiplicando el número total de espermatozoides en el eyaculado por el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales. El límite inferior de referencia para la morfología normal es de 4% (percentil 5, IC 95%: 3, 5)(21)

3.3.5 Estudio de la cromatina espermática

La integridad del ADN espermático es un factor crítico para la correcta transmisión de la información genética paterna al embrión (32), de tal forma que alteraciones en la cromatina podrían comprometer el éxito reproductivo (33,34). El daño en el ADN espermático tiene consecuencias negativas para la fertilidad, tanto a la hora de conseguir la implantación embrionaria como para el desarrollo fetal posterior (35,36). El elevado daño en el ADN de los espermatozoides se ha asociado a bajas tasas de fecundación, bajas tasas de implantación, aumento en la tasa de abortos y un aumento en la incidencia de enfermedades en los niños nacidos (34,35,37).

Actualmente existen distintas técnicas para detectar el daño en el ADN espermático de manera eficaz, y las estrategias en las que se basan estas técnicas son muy distintas. Un grupo de técnicas cuantifican el daño en el ADN mediante enzimas que marcan el ADN en los lugares donde hay roturas. Dentro de este grupo encontramos el ensayo *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL) (38) y la técnica *In Situ Nick Translation* (ISNT) (38). Por otra parte, otras técnicas se basan en la propiedad que tiene la molécula de ADN fragmentado para desnaturalizarse fácilmente bajo ciertas condiciones. Es decir, se basan en la susceptibilidad de la molécula de ADN a la desnaturalización. Entre estas encontramos el ensayo del cometa o *single cell gel electrophoresis* (SCGE) (39), *DNA Breakage Detection-Fluorescence in Situ Hybridization* DBD-FISH (40), *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA) (41,42) y el test *Sperm Chromatin Dispersion* (SCD) (43). Por último, existe otro grupo de técnicas que se basan en las propiedades de algunos colorantes como la Cromomicina A3 (44) y el Azul de Toluidina (45). A pesar de los distintos enfoques, los resultados obtenidos con estas pruebas están correlacionadas entre sí (46) y con otros parámetros seminales como la morfología, la motilidad y la viabilidad espermática (21).

Los trabajos publicados parecen indicar que cuando los niveles de daño en el ADN son muy altos, la probabilidad de obtener un embarazo es baja (34). Sin embargo, a pesar

de los muchos intentos, hasta ahora no se ha logrado establecer un umbral por encima del cual no se produzca un embarazo. Distintos trabajos realizados utilizando la técnica de SCSA, proponen que con niveles de fragmentación espermática $\geq 30\%$ (41) la probabilidad de obtener un embarazo sería muy próxima a cero. Sin embargo, según estudios posteriores (47) parece ser que esta situación no es tan crítica, e individuos con valores superiores a los propuestos pueden dejar descendencia normal. Según Gosálvez y colaboradores, individuos jóvenes, normozoospermicos y con fertilidad probada suelen presentar índices de fragmentación por debajo del 15-20% y rara vez por debajo de un 5%. Como tendencia general, individuos con índices menores a un 15% serían normales, los que muestran un valor de afectación media ($> 15\%$ y $< 30\%$) pueden estar revelando algún tipo de problema, pero son potencialmente fértiles, mientras que los individuos que presentan valores $> 30\%$ son potencialmente estériles (48). El índice de fragmentación (*Sperm DNA Fragmentation; SDF*) se define como el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado con respecto al total de los espermatozoides analizados.

La mayoría de estudios que analizan la fragmentación del ADN espermático valoran este daño como el porcentaje de espermatozoides que tienen la molécula de ADN dañada en un momento determinado (36,37). Sin embargo, trabajos recientes indican que la fragmentación del ADN espermático es un fenómeno dinámico, ya que tras la eyaculación tiende a aumentar con el tiempo (49) y es un fenómeno que afecta a todas las especies de mamíferos y que parece correlacionarse, entre otros factores, con el tipo y calidad de la protaminación (50,51). De hecho, diversos trabajos han explorado o evaluado la dinámica de la fragmentación espermática como herramienta coadyuvante en el estudio de la infertilidad masculina (49,50,52). La dinámica de la fragmentación espermática se estudia como la tasa de fragmentación del ADN espermático (*rateSDF; rSDF*) que se define como el incremento de la SDF por unidad de tiempo evaluado en horas.

3.4 Determinantes de calidad seminal

Diversos estudios han identificado factores de riesgo que podrían afectar o estar relacionados con la calidad seminal, la exposición a tóxicos ambientales y ocupacionales, determinados estilos de vida o hábitos dietéticos durante la vida adulta o el desarrollo fetal, se han asociado con una baja calidad seminal en humanos.

Estilos de vida o exposiciones a tóxicos sufridos por las madres durante el embarazo se han relacionado con baja calidad seminal de los hijos en la edad adulta. Entre otros

factores, la obesidad (53), el consumo de tabaco (54–56) o el elevado consumo de carne de vacuno (57) durante el embarazo se han asociado con una reducción significativa de la concentración seminal en la edad adulta. En muchas ocasiones, las alteraciones que tienen lugar durante el período fetal están relacionadas con unos compuestos denominados disruptores endocrinos, que se caracterizan por tener propiedades antiandrogénicas afectando a la masculinización normal de los fetos masculinos (58).

En relación con las exposiciones durante el desarrollo fetal y sus consecuencias en la vida adulta, en 2001, el equipo liderado por Skakkebaek y colaboradores sugirió que el aparato reproductor masculino es más vulnerable a determinadas exposiciones durante el período crítico de diferenciación celular y desarrollo fetal. Según la hipótesis de Skakkebaek y colaboradores, la exposición a tóxicos durante esta etapa del desarrollo podría ser la responsable del descenso de la calidad seminal, del aumento de la incidencia del cáncer testicular, las hipospadias y criptorquidias en las últimas décadas. Estas cuatro alteraciones son signos de un problema con una base fisiopatológica común al que denominó Síndrome de Disgenesia Testicular (TDS) (59).

Numerosos trabajos han estudiado los posibles factores o exposiciones que durante la vida adulta afectan a la calidad seminal. Entre los tóxicos ambientales o contaminantes estudiados encontramos: hidrocarburos aromáticos (60), ciertos hidrocarburos halogenados (61), ftalatos (62–64), bifenilos policlorados (65), algunos compuestos organoclorados (66) y diversos metales pesados (67). Por otra parte, hábitos de vida como el tabaquismo (68–72) el consumo de alcohol (73,74), el estrés psicológico (75–78), la obesidad (79,80) el sedentarismo (81) y la escasa actividad física (82) se han relacionado con el deterioro de la calidad seminal.

Respecto a los factores nutricionales, la ingesta de determinados alimentos como la cafeína (83), carne o productos lácteos (84), grasas saturadas (85) y productos derivados de la soja (86) se han asociado con una calidad seminal disminuida.

Por otra parte, el consumo inadecuado de determinados nutrientes antioxidantes ha sido señalado como factor causante de estrés oxidativo en los espermatozoides. Eskenazi y colaboradores estudiaron la asociación entre una dieta rica en antioxidantes y calidad seminal en varones sanos no fumadores sin antecedentes de infertilidad. Encontraron que una dieta rica en vitaminas se asociaba a una mayor calidad seminal. Observaron una

correlación significativa entre la ingesta de vitamina C y una mayor concentración de espermatozoides, mientras que la ingesta de vitamina E se asociaba a una mayor movilidad progresiva total en las muestras de semen estudiadas (87). Esto concuerda con estudios anteriores que relacionaban los niveles de vitamina E en el plasma seminal con una mayor movilidad espermática (88). Recientemente varios artículos han mostrado asociaciones entre una dieta rica en frutas y verduras (con mayor concentración de antioxidantes y micronutrientes) y una calidad seminal óptima (89,90).

3.5 Estrés oxidativo y calidad seminal

El estrés oxidativo y la excesiva producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) se han relacionado con la disminución de la concentración, movilidad y morfología espermática (91–93). Se estima que aproximadamente el 25% de los hombres infértiles presentan niveles elevados de EROs en el semen (94) y con frecuencia una menor capacidad antioxidante en el semen (95,96).

En condiciones normales existe un equilibrio entre la generación de EROs y su neutralización por los sistemas de defensa antioxidantes de las células, pero cuando este equilibrio se rompe, bien por la sobreproducción de agentes oxidantes, bien por la deficiencia de los sistemas antioxidantes o por ambas razones, se produce el estrés oxidativo (97–99). Las especies reactivas del oxígeno son agentes oxidantes generados como resultado del metabolismo del oxígeno. El término EROs engloba una amplia categoría de moléculas que incluye radicales (moléculas altamente inestables por poseer un electrón desapareado) y no radicales. Pueden oxidar rápidamente otras biomoléculas cercanas ejerciendo una influencia sobre su función celular normal.

Espermatozoides y especies reactivas del oxígeno

Los espermatozoides son unas células especialmente susceptibles a las EROs por varios motivos. En primer lugar, debido a que presentan en su membrana un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados y en segundo lugar, a su escaso contenido citoplasmático, lo que limita su capacidad antioxidante y reparadora (100). Por otro lado, al igual que ocurre con otras células de nuestro organismo, las EROs son necesarias para su funcionamiento. En condiciones fisiológicas se necesita una pequeña producción intracelular de radicales superóxido para que tengan lugar distintos procesos indispensables para la función espermática, como son la capacitación y la reacción

acrosómica (101). En condiciones normales el balance entre la producción de EROs y la actividad antioxidante se mantiene, cuando este equilibrio se rompe, bien por un exceso en su producción o por una deficiente actividad antioxidante, se producen daños en los espermatozoides (102).

Las EROs causan daños en los espermatozoides a dos niveles, en la membrana plasmática y en el ADN. Los espermatozoides poseen una membrana plasmática rica en ácidos grasos poliinsaturados, las especies reactivas del oxígeno provocan en ellos una reacción denominada lipoperoxidación (103). La composición lipídica de la membrana espermática es esencial en la maduración y funcionalidad de los espermatozoides. Estos cambios en la membrana espermática afectan a la motilidad, a la reacción acrosómica y la fusión entre gametos (104). Por otra parte, las EROs causan daño en al ADN espermático produciendo distintos tipos de lesiones en la molécula. Las principales son la roturas de ADN de cadena sencilla o de cadena doble, la pérdida o modificaciones químicas de bases y entrecruzamientos del ADN (105).

Fuentes principales de EROs en el semen

En el semen hay dos fuentes principales de EROs: los leucocitos y los espermatozoides. En la mayoría de las muestras de semen encontramos leucocitos, principalmente neutrófilos (106). El principal mecanismo de defensa de los neutrófilos contra los patógenos es la producción de EROs, por este motivo son una fuente potencial de estrés oxidativo para los espermatozoides (105). La otra fuente principal de EROs son los propios espermatozoides. Los espermatozoides inmaduros y morfológicamente anormales se caracterizan por presentar en su pieza intermedia un exceso de citoplasma, denominado residuo citoplasmático. Estos residuos citoplasmáticos son ricos en una enzima, la glucosa-6-fosfatasa deshidrogenasa, que controla la producción intracelular de NADPH. Esta molécula cuando entra en contacto con una enzima presente en la membrana (NADPH oxidasa) genera especies reactivas del oxígeno (107).

Mecanismos antioxidantes del semen

Los espermatozoides son células muy vulnerables al estrés oxidativo ya que durante su diferenciación pierden la mayoría de su citoplasma y con él, los principales sistemas de

protección celulares. Debido a esta carencia de protección intrínseca contra el estrés oxidativo, estas células son muy dependientes de las propiedades antioxidantes del líquido seminal en el que se encuentran.

El sistema de protección antioxidante del semen está compuesto por factores enzimáticos y por una serie de compuestos de bajo peso molecular con capacidad antioxidante. Los distintos componentes de este sistema interactúan estrechamente con el fin de garantizar una protección óptima contra las EROs. Parece que la deficiencia de cualquiera de ellos puede causar una disminución en la capacidad antioxidante total del plasma. El principal sistema enzimático antioxidante en el semen está formado por la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. Además de estas enzimas, juegan un papel importante los antioxidantes no enzimáticos, entre estos encontramos, el glutatión, ácido pantoténico, la coenzima Q10, la carnitina, vitaminas A, E, C y complejo B y minerales, tales como el zinc, el selenio y el cobre (108). Una reducción en la actividad de dichas enzimas o de los compuestos antioxidantes en el plasma seminal se ha asociado con infertilidad masculina (95,109–111).

Terapias con Antioxidantes

Durante las últimas dos décadas se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos para establecer los posibles efectos beneficiosos de los tratamientos con antioxidantes en la calidad seminal. Sin embargo, la falta de uniformidad entre la mayoría de estos estudios hace que no se puedan comparar resultados ni llegar a establecer qué tratamiento sería el más adecuado. Recientemente se han publicado varias revisiones (105,112–114), la mayoría de estas se ponen de acuerdo en el efecto beneficioso de los antioxidantes sobre la infertilidad masculina, pero el tipo y dosis de antioxidantes adecuados es todavía desconocido. Los autores destacaron unánimemente la necesidad de más ensayos clínicos correctamente diseñados en el futuro (115).

3.6 ¿Está decreciendo la concentración espermática?

El debate en torno a las tendencias temporales en los parámetros seminales ha sido un tema candente desde la década de los noventa. Varios metaanálisis de los estudios realizados desde los años cincuenta reportan una disminución en la concentración

espermática en los países industrializados (116,117). Las exposiciones ambientales, sobre todo durante el desarrollo fetal, son sospechosas de ser los responsables de esta disminución de la calidad seminal, así como del aumento de la incidencia de patologías como el cáncer testicular, criptorquidia e hipospadia (118,119).

El debate en torno a este tema comenzó con el metaanálisis realizado por Carlsen y colaboradores en 1992 (117). Este trabajo, en el que se analizaron 61 estudios, mostró una disminución significativa de la concentración espermática entre 1938 y 1990. El promedio de la concentración pasó de 113 a 66 millones/ml, lo que supone una disminución de aproximadamente 1% por año (117). Las críticas a este trabajo se centraron en la heterogeneidad de los individuos incluidos y en un posible sesgo debido a las variaciones geográficas de la calidad seminal (120). Tras este metaanálisis se llevaron a cabo nuevos estudios basados en datos de centros independientes, algunos coincidían con Carlsen y colegas (24,121,122) y otros no (123–125). Entonces, en 1997, Swan y colaboradores realizaron un minucioso re-análisis que incluía 56 de los 61 estudios analizados por Carlsen et al. (1992) y confirmaron la disminución de la concentración espermática con importantes diferencias geográficas (116). El descenso estimado fue del 1,5% por año en los EE.UU. (1938-1988) y del 3,1% por año en Europa (1971-1990) (116). Más tarde, el mismo grupo llevó a cabo un metaanálisis actualizado y ampliado que incluyó un total de 101 estudios publicados entre 1934 y 1996 (126) y confirmó, una vez más, una disminución en la concentración espermática a lo largo de las últimas décadas.

Posteriores estudios, tanto en Estados Unidos como en Europa, exploraron las diferencias geográficas en cuanto a calidad seminal. Así, en 2001, se llevó a cabo en Europa un estudio transversal prospectivo que incluyó 1.082 varones con fertilidad probada procedentes de cuatro países europeos. Este estudio reveló que los daneses presentaban peores recuentos espermáticos, seguidos de los franceses y escoceses, mientras que los finlandeses presentaron mejores resultados (127). Del mismo modo, se detectaron diferencias regionales en los parámetros seminales en los hombres fértiles dentro de los Estados Unidos y estas diferencias fueron más pronunciadas que las encontradas en Europa. Los datos de este estudio sugerían que la concentración espermática era menor en zonas rurales y agrícolas comparadas con las zonas más urbanas y menos expuestas a la agricultura (128).

Una vez estudiadas las diferencias geográficas en la calidad seminal de varones fértiles, se realizaron estudios sobre la población general, utilizando jóvenes varones con fertilidad desconocida. Estos trabajos confirmaron las diferencias geográficas anteriormente publicadas (129–134) e indicaron que países como Dinamarca y Noruega presentaban peores parámetros seminales que Finlandia y Estonia (129), mientras que Lituania quedaba en lugar intermedio entre estos países en cuanto a calidad seminal (132) y Alemania se situaba a nivel de Noruega y Dinamarca (133). Posteriormente, un estudio realizado en España mostró que los parámetros seminales y valores hormonales de la población general estudiada (estudiantes universitarios principalmente), eran los esperables en una población relativamente normal (135). En estos trabajos europeos también se analizó la relación entre calidad seminal e incidencia de cáncer de testículo y de acuerdo con la hipótesis del Síndrome de Disgenesia Gonadal (136), aquellas zonas geográficas con peor calidad seminal también presentaron una incidencia mayor de cáncer de testículo (129).

A pesar del paso de los años, la disminución global de la calidad seminal humana sigue siendo un tema controvertido (137). Recientes estudios han evaluado esta cuestión encontrando distintas tendencias. Mientras que en países como Finlandia (138) o Francia (Rolland et al. 2013) los estudios indican una disminución temporal en los parámetros seminales, otros estudios realizados en Dinamarca (139) y Suecia (130) no muestran este descenso en la calidad seminal. De hecho, el estudio realizado en Dinamarca (139), entre 1996 y 2010, muestra un ligero incremento en el recuento total y la concentración espermática mientras que no se observan cambios en la movilidad y la morfología. No obstante, las concentraciones espermáticas siguen siendo relativamente bajas y una gran parte de esos individuos podría presentar problemas reproductivos en el futuro. Por otra parte, aunque en un principio la situación de Finlandia parecía mejor que en otros países europeos en cuanto a calidad seminal (129), estos nuevos estudios muestran un descenso desalentador en la calidad seminal de la población general en el período comprendido entre 1998 y 2006. Los hombres más jóvenes presentan peores parámetros seminales comparados con los individuos nacidos tan sólo unos años antes. Además, la incidencia del cáncer de testículo también es mayor en hombres más jóvenes que la observada en los nacidos unos años antes (138).

El descenso en la concentración espermática no es sólo un problema científico, también resulta preocupante desde el punto de vista clínico. Un estudio prospectivo

realizado con parejas que planificaban su primer embarazo mostró que el “tiempo de consecución de embarazo”, un indicador epidemiológico utilizado para evaluar la fecundidad, era menor en parejas con concentraciones superiores a 55 millones/ml (26). Por lo tanto, según estos estudios una gran parte de los hombres jóvenes de la población general en distintos países europeos presentaría concentraciones espermáticas inferiores a estos valores óptimos (138–140).

4. PRESENTACIÓN DE LOS TRABAJOS

4.1 Objetivos generales y específicos

Diversos estudios muestran una disminución en la concentración espermática en las últimas décadas (116,117,126) aunque en este hecho se han observado importantes diferencias geográficas (127–134). Mientras que en algunos países como Finlandia (138) y Francia (141) los estudios indican un descenso temporal de la concentración seminal, otros estudios realizados en Dinamarca (139) y Suecia (130) no muestran esta variación.

El descenso de la concentración espermática se ha atribuido a exposiciones ambientales, estilos de vida o factores nutricionales pero que, en gran medida, son aún desconocidos o han sido insuficientemente estudiados. Respecto a los factores nutricionales, la ingesta de determinados alimentos, como las grasas saturadas, la carne o los productos lácteos, se han asociado con una afectación de la calidad seminal (83–86). Por otra parte, recientemente varios estudios han mostrado asociaciones entre una dieta rica en frutas y verduras (con mayor concentración de antioxidantes y micronutrientes) y una calidad seminal óptima (89,90).

Distintos trabajos señalan al estrés oxidativo como el mecanismo de acción de algunos de los determinantes de la calidad seminal comentados (115,142). El estrés oxidativo afecta a los espermatozoides de distintas maneras, por una parte compromete la motilidad al dañar su membrana plasmática y por otra parte causa importantes daños en la molécula de ADN, aumentando su fragmentación (105). La integridad del ADN espermático es un factor crítico para la correcta transmisión de la información genética paterna al embrión (32), de tal forma que las alteraciones en la cromatina podrían comprometer el éxito reproductivo (33,34).

A pesar del gran interés y preocupación que genera la calidad seminal en varones, muchos de estos aspectos permanecen inexplorados. Hasta donde conocemos, no existen trabajos previos que estudien la tendencia temporal en recuento espermático, la dinámica de la fragmentación del ADN espermático y la relación entre ingesta de antioxidantes y calidad seminal en varones jóvenes españoles.

Resumen de los objetivos

El objetivo general de este trabajo es profundizar en el estudio de la calidad seminal en jóvenes universitarios sanos con fertilidad desconocida, abordando el problema desde distintos aspectos. Los objetivos específicos de cada una de las secciones son los siguientes.

1. Analizar la relación entre la ingesta dietaria de nutrientes antioxidantes y la calidad seminal en jóvenes estudiantes universitarios de la Región de Murcia.
2. Describir y examinar si la calidad seminal de los jóvenes españoles del Sureste español ha variado en la última década.
3. Describir y analizar los niveles basales y la dinámica de fragmentación del ADN espermático tras la eyaculación en varones jóvenes estudiantes universitarios de la Región de Murcia.

4.2 Resumen global de los resultados y conclusiones finales

1. Se mostró una asociación positiva entre la ingesta de varios nutrientes antioxidantes (criptoxantina, vitamina C, licopeno y b-caroteno) y el recuento total de espermatozoides móviles en los hombres jóvenes. El volumen seminal también aumentó con una mayor ingesta de vitamina C, licopeno y b-caroteno. En conclusión, nuestro estudio sugiere que algunos parámetros espermáticos podrían ser sensibles a la ingesta de nutrientes antioxidantes, y que la recomendación actual de ingesta de vitamina C podría ser insuficiente para alcanzar el máximo beneficio en términos de calidad seminal.
2. Nuestros resultados indican que el recuento total y la concentración espermática podrían haber disminuido en los jóvenes españoles del Sureste español en la última década, mostrando una tendencia temporal adversa en dichos parámetros. En el sur de España recientemente ha tenido lugar un aumento de la industrialización, y con ello, un aumento del riesgo de posibles exposiciones potencialmente adversas que podrían afectar a distintos parámetros reproductivos masculinos.
3. En los jóvenes varones estudiados, el índice medio de fragmentación del ADN espermático basal obtenido fue de 27,2% [desviación estándar (DE): 14,4)], valores relativamente altos si los comparamos con otros estudios previamente

publicados. La tasa de fragmentación del ADN espermático fue significativamente mayor durante las primeras horas tras la eyaculación. Por otra parte, las muestras con un nivel basal de fragmentación superior al 30% presentaron una velocidad de fragmentación significativamente mayor durante las primeras horas que las muestras con índices de fragmentación basal inferiores a 15%. Sería aconsejable para cualquier actividad clínica que las muestras seminales se utilizaran lo más rápido posible tras su obtención, en especial aquellas con alteraciones importantes en el índice de fragmentación del ADN espermático basal.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. 4th ed. New York; 2002.
2. Boissonneault G. Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS Lett* 2002;514(2-3):111–4.
3. Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod*.2010;16(1):30–6.
4. Hud N V, Allen MJ, Downing KH, Lee J, Balhorn R. Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun*.1993;193(3):1347–54.
5. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature*. 2009 ;460(7254):473–8.
6. Martins RP, Ostermeier GC, Krawetz S a. Nuclear matrix interactions at the human protamine domain: a working model of potentiation. *J Biol Chem*. 2004;279(50):51862–8.
7. Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol*. 1982;93(2):298–305.
8. Barone JG, De Lara J, Cummings KB, Ward WS. DNA organization in human spermatozoa. *J Androl*.1994;15(2):139–44.
9. Aoki VW, Liu L, Jones KP, Hatasaka HH, Gibson M, Peterson CM, et al. Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertil Steril*.2006;86(5):1408–15.
10. Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl*. 2006;27(6):890–8.
11. Ward WS, Partin AW, Coffey DS. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma*. 1989;98(3):153–9.
12. Holstein A, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1:107.
13. Clermont Y. Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population. *Fertil Steril* .1966;17(6):705–21.
14. Remohi J, Pellicer A, Simón C, Navarro J. *Reproducción Humana*. Segunda Ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2002.
15. Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*. 2003;111(8):483–8.

16. Oliva R, Castillo J. Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. *Asian J Androl.* 2011;13(1):24–30.
17. Marcon L, Boissonneault G. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod.* 2004;70(4):910–8.
18. Meyer-Ficca ML, Scherthan H, Bürkle A, Meyer RG. Poly(ADP-ribosyl)ation during chromatin remodeling steps in rat spermiogenesis. *Chromosoma.* 2005 ;114(1):67–74.
19. Laberge R-M, Boissonneault G. On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol Reprod.* 2005;73(2):289–96.
20. Breucker H, Schäfer E, Holstein AF. Morphogenesis and fate of the residual body in human spermiogenesis. *Cell Tissue Res.* 1985;240(2):303–9.
21. World Health Organization D of RH and R. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen Fifth edition. 5^a ed. 2010.
22. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update.* 2009;16(3):231–45.
23. Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ, et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl.* 2010;33(1):e221–7.
24. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med.* 1995;332(5):281–5.
25. Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J Androl.* 2000;21(1):145–53.
26. Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jørgensen N, Horte A, et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod.* 2002;17(2):503–15.
27. Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet.* 1998;352(9135):1172–7.
28. Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH, et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Hum Reprod.* 2000;15(7):1562–7.
29. Andersen AG, Jensen TK, Carlsen E, Jørgensen N, Andersson AM, Krarup T, et al. High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Hum Reprod.* 2000;15(2):366–72.

30. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum Reprod Update*. 1998;4(1):73–82.
31. Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ, Ombelet W. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update*. 2001;7(5):495–500.
32. Evenson DP, Wixon R. Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertil Steril*. 2008;90(4):1229–31.
33. Bungum M, Bungum L, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian J Androl*. 2011;13(1):69–75.
34. Zini A. Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic? *Syst Biol Reprod Med*. 2011;57(1-2):78–85.
35. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2008;23(12):2663–8.
36. Tandara M, Bajić A, Tandara L, Bilić-Zulle L, Šunj M, Kozina V, et al. Sperm DNA integrity testing: big halo is a good predictor of embryo quality and pregnancy after conventional IVF. *Andrology*. 2014;2(5):678–86.
37. Bungum M, Bungum L, Lynch K-F, Wedlund L, Humaidan P, Giwercman A. Spermatozoa DNA damage measured by sperm chromatin structure assay (SCSA) and birth characteristics in children conceived by IVF and ICSI. *Int J Androl*. 2012 ;35(4):485–90.
38. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res*. 1993 ;53(8):1945–51.
39. Kaneko S, Yoshida J, Ishikawa H, Takamatsu K. Single-cell pulsed-field gel electrophoresis to detect the early stage of DNA fragmentation in human sperm nuclei. *PLoS One*. 2012 ;7(7):e42257.
40. Fernández JL, Gosálvez J. Application of FISH to detect DNA damage. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH). *Methods Mol Biol*. 2002;203:203–16.
41. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 1999;14(4):1039–49.
42. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*. 2002;23(1):25–43.
43. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 2003;24(1):59–66.

44. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod.* 1995;52(4):864–7.
45. Erenpreisa J, Erenpreiss J, Freivalds T, Slaidina M, Krampe R, Butikova J, et al. Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. *Cytometry A* . 2003;52(1):19–27.
46. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl.* 2006;27(1):53–9.
47. Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril.* 2005;84(2):356–64.
48. Gosálvez Berenguer J, Caballero Peregrín P, López-Fernández C, Fernández JL, Núñez Calonge R. Fragmentación del ADN espermático. *Rev Int Andrología.* 2008;6(3):193–209.
49. Gosálvez J, Cortés-Gutierrez E, López-Fernández C, Fernández JL, Caballero P, Nuñez R. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil Steril.* 2009;92(1):170–3.
50. Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL, Gouraud A, Holt W V. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Mol Reprod Dev.* 2011;78(12):951–61.
51. Castillo J, Simon L, Mateo SDE, Lewis S, Oliva R. Protamine / DNA Ratios and DNA Damage in Native and Density Gradient Centrifuged Sperm From Infertile Patients. 2011;32(3):324–32.
52. García-Peiró A, Martínez-Heredia J, Oliver-Bonet M, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, et al. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil Steril.* 2011;95(1):105–9. 4
53. Ramlau-Hansen CH, Nohr EA, Thulstrup AM, Bonde JP, Storgaard L, Olsen J. Is maternal obesity related to semen quality in the male offspring? A pilot study. *Hum Reprod.* 2007;22(10):2758–62.
54. Jensen TK, Jørgensen N, Punab M, Haugen TB, Suominen J, Zilaitiene B, et al. Association of in utero exposure to maternal smoking with reduced semen quality and testis size in adulthood: a cross-sectional study of 1,770 young men from the general population in five European countries. *Am J Epidemiol.* 2004;159(1):49–58.
55. Jensen MS, Mabeck LM, Toft G, Thulstrup a M, Bonde JP. Lower sperm counts following prenatal tobacco exposure. *Hum Reprod.* 2005;20(9):2559–66.
56. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Storgaard L, Toft G, Olsen J, Bonde JP. Is prenatal exposure to tobacco smoking a cause of poor semen quality? A follow-up study. *Am J Epidemiol.* 2007;165(12):1372–9.

57. Swan SH, Liu F, Overstreet JW, Brazil C, Skakkebaek NE. FAST-TRACK ARTICLE Semen quality of fertile US males in relation to their mothers' beef consumption during pregnancy. 2007;22(6):1497–502.
58. Heindel JJ, Jobling S, Kidd KA, Zoeller RT. Endocrine Disrupting Chemicals - 2012. 2012.
59. Skakkebaek NE, Meyts ER, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome : an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. 2001;16(5):972–8.
60. Wagner U, Schlebusch H, van der Ven H, van der Ven K, Diedrich K, Krebs D. Accumulation of pollutants in the genital tract of sterility patients. J Clin Chem Clin Biochem. 1990;28(10):683–8.
61. Whorton MD, Foliart DE. Mutagenicity, carcinogenicity and reproductive effects of dibromochloropropane (DBCP). Mutat Res. 1983 ;123(1):13–30.
62. Duty SM, Silva MJ, Barr DB, Brock JW, Ryan L, Chen Z, et al. Phthalate exposure and human semen parameters. Epidemiology . 2003 ;14(3):269–77.
63. Rozati R, Reddy PP, Reddanna P, Mujtaba R. MALE FACTOR Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. 2002;78(6):1187–94.
64. Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, et al. Decrease in Anogenital Distance among Male Infants with Prenatal Phthalate Exposure. Environ Health Perspect. 2005;113(8):1056–61.
65. Spanò M, Toft G, Hagmar L, Eleuteri P, Rescia M, Rignell-Hydbom A, et al. Exposure to PCB and p, p'-DDE in European and Inuit populations: impact on human sperm chromatin integrity. Hum Reprod. 2005;20(12):3488–99.
66. Carreño J, Rivas A, Granada A, Jose Lopez-Espinosa M, Mariscal M, Olea N, et al. Exposure of young men to organochlorine pesticides in Southern Spain. Environ Res. 2007;103(1):55–61.
67. Benoff S, Jacob A, Hurley IR. Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. Hum Reprod Update . 2000;6(2):107–21.
68. Elshal MF, El-Sayed IH, Elsaied MA, El-Masry SA, Kumosani TA. Sperm head defects and disturbances in spermatozoal chromatin and DNA integrities in idiopathic infertile subjects: association with cigarette smoking. Clin Biochem. 2009;42(7-8):589–94.
69. Colagar AH, Marzony ET, Chaichi MJ. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. Nutr Res. 2009;29(2):82–8.
70. Richthoff J, Elzanaty S, Rylander L, Hagmar L, Giwercman A. Association between tobacco exposure and reproductive parameters in adolescent males. Int J Androl. 2008;31(1):31–9.
71. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. Hum Reprod. 2007;22(1):188–96.

72. Yu B, Chen J, Liu D, Zhou H, Xiao W, Xia X, et al. Cigarette smoking is associated with human semen quality in synergy with functional NRF2 polymorphisms. *Biol Reprod* . 2013;89(1):5.
73. La Vignera S, Condorelli RA, Balercia G, Vicari E, Calogero AE. Does alcohol have any effect on male reproductive function? A review of literature. *Asian J Androl* [Internet]. 2013;15(2):221–5.
74. Martini AC, Molina RI, Estofán D, Senestrari D, Fiol de Cuneo M, Ruiz RD. Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality. *Fertil Steril*. 2004 ;82(2):374–7.
75. Collodel G, Moretti E, Fontani V, Rinaldi S, Aravagli L, Saragò G, et al. Effect of emotional stress on sperm quality. *Indian J Med Res*. 2008;128(3):254–61.
76. Eskiocak S, Gozen AS, Taskiran A, Kilic AS, Eskiocak M, Gulen S. Effect of psychological stress on the L-arginine-nitric oxide pathway and semen quality. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39(5):581–8.
77. Bhongade MB, Prasad S, Jiloha RC, Ray PC, Mohapatra S, Koner BC. Effect of psychological stress on fertility hormones and seminal quality in male partners of infertile couples. *Andrologia*. 2015;47(3):336–42.
78. Gollenberg AL, Liu F, Brazil C, Drobni EZ, Guzick D, Overstreet JW, et al. Semen quality in fertile men in relation to psychosocial stress. *Fertil Steril* . 2010;93(4):1104–11.
79. Jensen TK, Andersson A-M, Jørgensen N, Andersen A-G, Carlsen E, Petersen JH, et al. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril*. 2004;82(4):863–70.
80. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK, et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2012 ;19(3):221–31.
81. Bujan L, Daudin M, Charlet JP, Thonneau P, Mieusset R. Increase in scrotal temperature in car drivers. *Hum Reprod*. 2000;15(6):1355–7.
82. Gaskins AJ, Mendiola J, Afeiche M, Jørgensen N, Swan SH, Chavarro JE. Physical activity and television watching in relation to semen quality in young men. *Br J Sports Med*. 2013;4–11.
83. Jensen TK, Swan SH, Skakkebaek NE, Rasmussen S, Jørgensen N. Caffeine intake and semen quality in a population of 2,554 young Danish men. *Am J Epidemiol*. 2010;171(8):883–91.
84. Mendiola J, Torres-Cantero AM, Moreno-Grau JM, Ten J, Roca M, Moreno-Grau S, et al. Food intake and its relationship with semen quality: a case-control study. *Fertil Steril*. 2009;91(3):812–8.
85. Attaman J a, Toth TL, Furtado J, Campos H, Hauser R, Chavarro JE. Dietary fat and semen quality among men attending a fertility clinic. *Hum Reprod*. 2012;27(5):1466–74.

86. Chavarro JE, Toth TL, Sadio SM, Hauser R. Soy food and isoflavone intake in relation to semen quality parameters among men from an infertility clinic. *2008;23(11):2584–90.*
87. Eskenazi B, Kidd SA, Marks AR, Slotter E, Block G, Wyrobek AJ. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Hum Reprod. 2005;20(4):1006–12.*
88. Théron P, Auger J, Legrand A, Jouannet P. alpha-Tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. *Mol Hum Reprod. 1996;2(10):739–44.*
89. Mendiola J, Torres-Cantero AM, Vioque J, Moreno-Grau JM, Ten J, Roca M, et al. A low intake of antioxidant nutrients is associated with poor semen quality in patients attending fertility clinics. *Fertil Steril. 2010;93(4):1128–33.*
90. Zareba P, Colaci DS, Afeiche M, Gaskins AJ, Jørgensen N, Mendiola J, et al. Semen quality in relation to antioxidant intake in a healthy male population. *Fertil Steril. 2013;100(6):1572–9.*
91. Kao S-H, Chao H-T, Chen H-W, Hwang TIS, Liao T-L, Wei Y-H. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil Steril. 2008;89(5):1183–90.*
92. Miraglia E, De Angelis F, Gazzano E, Hassanpour H, Bertagna A, Aldieri E, et al. Nitric oxide stimulates human sperm motility via activation of the cyclic GMP/protein kinase G signaling pathway. *Reproduction. 2011;141(1):47–54.*
93. Aitken RJ, Baker MA. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int J Dev Biol. 2013;57(2-4):265–72.*
94. Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod. 2010;25(10):2415–26.*
95. Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril. 1997;67(1):142–7.*
96. Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J, Lissi E. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum Reprod. 1996;11(8):1655–60.*
97. De Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod. 1995;10 Suppl 1:15–21.*
98. Saalu LC. The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: an evidence based evaluation. *Pakistan J Biol Sci PJBS. 2010;13(9):413–22.*
99. Hampl R, Drábková P, Kandár R, Stěpán J. [Impact of oxidative stress on male infertility]. *Ceska Gynekol. 2012;77(3):241–5.*

100. Lenzi A, Picardo M, Gandini L, Dondero F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum Reprod Update*. 1996;2(3):246–56.
101. De Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod*. 1995;10 Suppl 1:15–21.
102. Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J Androl*. 2011;13(1):43–52.
103. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 1996;48(6):835–50.
104. Lenzi A, Picardo M, Gandini L, Lombardo F, Terminali O, Passi S, et al. Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. *Hum Reprod*. 1994;9(11):2044–50.
105. Gharagozloo P, Aitken RJ. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod*. 2011;26(7):1628–40.
106. Aitken RJ, Baker HW. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans? *Hum Reprod*. 1995;10(7):1736–9.
107. Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl*. 1996;17(3):276–87.
108. Aitken RJ, Curry BJ. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(3):367–81.
109. Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl*. 2004;6(1):59–65.
110. Mostafa T, Tawadrous G, Roaia MMF, Amer MK, Kader RA, Aziz A. Effect of smoking on seminal plasma ascorbic acid in infertile and fertile males. *Andrologia*. 2006 Dec;38(6):221–4.
111. Song GJ, Norkus EP, Lewis V. Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. *Int J Androl*. 2006;29(6):569–75.
112. Ross C, Morriss A, Khairy M, Khalaf Y, Braude P, Coomarasamy A, et al. A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reprod Biomed Online*. 2010;20(6):711–23.
113. Zini A, Al-Hathal N. Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction? *Asian J Androl*. 2011;13(3):374–81.

114. Showell MG, Mackenzie-Proctor R, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane database Syst Rev.*2014;12:CD007411.
115. Walczak-Jedrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska-Hilczler J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent Eur J Urol.* 2013;66(1):60–7.
116. Swan SH, Elkin EP, Fenster L. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect.* 1997;105(11):1228–32.
117. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 1992;305(6854):609–13.
118. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod.* 2001;16(5):972–8.
119. Gaspari L, Paris F, Jandel C, Kalfa N, Orsini M, Daurès JP, et al. Prenatal environmental risk factors for genital malformations in a population of 1442 French male newborns: a nested case-control study. *Hum Reprod.*2011;26(11):3155–62.
120. Fisch H, Goluboff ET. Geographic variations in sperm counts: a potential cause of bias in studies of semen quality. *Fertil Steril.*1996;65(5):1044–6.
121. Van Waeleghem K, De Clercq N, Vermeulen L, Schoonjans F, Comhaire F. Deterioration of sperm quality in young healthy Belgian men. *Hum Reprod.* 1996;11(2):325–9.
122. Irvine S, Cawood E, Richardson D, MacDonald E, Aitken J. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ.* 1996;312(7029):467–71.
123. Fisch H, Goluboff ET, Olson JH, Feldshuh J, Broder SJ, Barad DH. Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertil Steril.* 1996;65(5):1009–14.
124. Handelsman DJ. Sperm output of healthy men in Australia: magnitude of bias due to self-selected volunteers. *Hum Reprod.* 1997;12(12):2701–5.
125. Paulsen CA, Berman NG, Wang C. Data from men in greater Seattle area reveals no downward trend in semen quality: further evidence that deterioration of semen quality is not geographically uniform. *Fertil Steril.* 1996;65(5):1015–20.
126. Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect.* 2000;108(10):961–6.
127. Jørgensen N, Andersen A, Eustache F, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH, et al. Regional differences in semen quality in Europe. 2001;16(5):1012–9.
128. Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, Liu F, Kruse RL, Hatch M, et al. Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. *Environ Health Perspect.* 2003;111(4):414–20.

129. Jørgensen N, Carlsen E, Neramo I, Punab M, Suominen J, Andersson A-G, et al. East-West gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area: a study of men from the general population in Denmark, Norway, Estonia and Finland. *Hum Reprod.* 2002;17(8):2199–208.
130. Axelsson J, Rylander L, Rignell-Hydbom A, Giwercman A. No secular trend over the last decade in sperm counts among Swedish men from the general population. *Hum Reprod.* 2011;26(5):1012–6.
131. Richthoff J, Rylander L, Hagmar L, Malm J, Giwercman A. Higher sperm counts in Southern Sweden compared with Denmark. *Hum Reprod.* 2002;17(9):2468–73.
132. Punab M, Zilaitiene B, Jørgensen N, Horte A, Matulevicius V, Peetsalu A, et al. Regional differences in semen qualities in the Baltic region. *Int J Androl.* 2002;25(4):243–52.
133. Paasch U, Salzbrunn A, Glander HJ, Plambeck K, Salzbrunn H, Grunewald S, et al. Semen quality in sub-fertile range for a significant proportion of young men from the general German population: a co-ordinated, controlled study of 791 men from Hamburg and Leipzig. *Int J Androl.* 2008;31(2):93–102.
134. Fernandez MF, Duran I, Olea N, Avivar C, Vierula M, Toppari J, et al. Semen quality and reproductive hormone levels in men from Southern Spain. *Int J Androl.* 2012;35(1):1–10.
135. Fernandez MF, Duran I, Olea N, Avivar C, Vierula M, Toppari J, et al. Semen quality and reproductive hormone levels in men from Southern Spain. *Int J Androl.* 2012;35(1):1–10.
136. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* [Internet]. 2001;16(5):972–8.
137. Fisch H. Declining worldwide sperm counts: disproving a myth. *Urol Clin North Am.* 2008;35(2):137–46, vii.
138. Jørgensen N, Vierula M, Jacobsen R, Pukkala E, Perheentupa A, Virtanen HE, et al. Recent adverse trends in semen quality and testis cancer incidence among Finnish men. *Int J Androl.* 2011;34(4 Pt 2):e37–48.
139. Jørgensen N, Joensen UN, Jensen TK, Jensen MB, Almstrup K, Olesen IA, et al. Human semen quality in the new millennium: a prospective cross-sectional population-based study of 4867 men. *BMJ Open.* 2012;2(4).
140. Andersson A-M, Jørgensen N, Main KM, Toppari J, Rajpert-De Meyts E, Leffers H, et al. Adverse trends in male reproductive health: we may have reached a crucial “tipping point”. *Int J Androl.* 2008;31(2):74–80.
141. Rolland M, Le Moal J, Wagner V, Royère D, De Mouzon J. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum Reprod.* 2013;28(2):462–70.

142. Paul C, Teng S, Saunders PTK. A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. *Biol Reprod.* 2009;80(5):913–9.

6. COPIA DE TRABAJOS PUBLICADOS

Las publicaciones que componen esta tesis son:

Artículo 1

“Mínguez-Alarcón L, Mendiola J, López-Espín JJ, **Sarabia-Cos L**, Vivero-Salmerón G, Vioque J, Navarrete-Muñoz EM, Torres-Cantero AM. Dietary intake of antioxidant nutrients is associated with semen quality in young university students. Hum Reprod. 2012;27:2807-14”

Revista: *Human reproduction (Oxford, England)*

Abstract:

STUDY QUESTION: What are the associations between the dietary intake of antioxidant nutrients and semen parameters in young men? SUMMARY ANSWER: Our study suggests that some sperm parameters are sensitive to dietary intake of antioxidant nutrients. WHAT IS KNOWN ALREADY: A few reports have suggested that some dietary factors might be related to semen quality. However, the relationship between the intake of antioxidant nutrients and semen quality in young men remains unexplored. STUDY DESIGN, SIZE, DURATION: In this cross-sectional study, 215 young men were included between October 2010 and November 2011. PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS: Healthy university students with complete dietary and semen quality data were analyzed. Dietary intake was recorded using a validated food frequency questionnaire. The associations between the energy-adjusted nutrient intake of antioxidants in quartiles and the semen volume, sperm concentration, sperm motility, sperm morphology, total sperm count and total motile sperm count were assessed using multivariate linear regression. MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE: Out of 240 students who contacted us, 223 (92.9%) were eligible to participate in this study, and 215 attended the clinical appointment. In the multivariate adjusted linear regression models, there was a positive association between dietary intakes of cryptoxanthin ($P(\text{trend}) = 0.03$), vitamin C ($P(\text{trend}) = 0.04$), lycopene ($P(\text{trend}) = 0.03$) and β -carotene ($P(\text{trend}) = 0.04$) and total motile sperm count. The semen volume increased with higher intakes of vitamin C ($P(\text{trend}) = 0.04$). LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION: Only one sample of semen was taken for each subject. However, there are indications that one semen sample may be sufficient to characterize the semen quality of the individuals in epidemiological studies. Bias due to measurement errors may also occur since there is no perfect method to assess diet. However,

any bias due to measurement error would be non-differential and would reduce, not increase, the strength of the associations. Although selection bias in cross-sectional studies might not always be ruled out, our subjects were university student volunteers who were rewarded for their participation and the study was not advertised as a fertility study. WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS: Previous articles in this area have focused mainly on men attending fertility clinics, thus our study brings generalizability to young men of the general population with unknown or untested fertility. Some of our results are in agreement with the previously reported papers.

Dirección url: <http://humrep.oxfordjournals.org/content/27/9/2807.abstract>

Artículo 2

"Mendiola J, Jørgensen N, Mínguez-Alarcón L, **Sarabia-Cos L**, López-Espín JJ, Vivero-Salmerón G, Ruiz-Ruiz KJ, Fernández MF, Olea N, Swan SH, Torres-Cantero AM. Sperm counts may have declined in young university students in Southern Spain. *Andrology*. 2013;1:408-13"

Revista: *Andrology*

Abstract:

Several studies have investigated temporal trends in semen quality in Northern Europe, but none has examined this question in Southern Europe. A prior study conducted in Almería Province (Southern Spain) reported higher sperm count and concentration among Spanish young men recruited from 2001 to 2002 compared with young men from Northern Europe. The aim of this new study was to examine whether semen quality has changed among Spanish young men in the last decade. In this cross-sectional study, questionnaires and semen samples were collected from 215 healthy young university students from Murcia Region between 2010 and 2011. The 273 men from the Almería study previously studied were included in a trend analysis of the two populations from Southern Spain. Descriptive statistics were calculated for the Murcia study population and these and semen variables for the Murcia and Almería study populations were compared. Study methods and population characteristics were similar across the two studies. Therefore, we used multiple linear regression analyses on the combined population (controlling for study centre, age, ejaculation abstinence time, season, smoking, medication during the last 3 months, Body mass index (BMI), presence of varicocele and prenatal exposure to tobacco) to look for a birth-cohort effect over the combined study period (2001-2011). Sperm concentration and total sperm count declined significantly with year of birth in the pooled analysis ($\beta = -0.04$ and $\beta = -0.06$, respectively, both $p < 0.01$). Sperm counts were significantly lower in Murcia study subjects than in the Almería participants; sperm concentration median (5th-95th) = 44.0 (8.9-129) million/mL vs. 51.0 (5.0-206) million/mL; $p < 0.01$ and total sperm count = 121 (17.8-400) million vs. 149 (8.0-599) million; $p < 0.01$. Other semen variables did not differ significantly between the two studies. Our study suggests that total sperm count and sperm concentration may have declined in young Spanish men over the last decade.

Dirección url: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2047-2927.2012.00058.x/full>

Artículo 3

“**Sarabia-Cos L**, Areense-Gonzalo JJ, Mínguez-Alarcón L, Gosálvez J, Mendiola J, Torres-Cantero AM. Estudio de la dinámica de fragmentación del ácido desoxirribonucleico espermático en jóvenes varones. Rev Int Androl. 2015;13:1-7”

Revista: Revista Internacional de Andrología

Abstract:

Objective: To describe and analyze sperm DNA fragmentation and its dynamics after ejaculation in young men.

Material and method: This is a cross-sectional study conducted between 2010 and 2011 in young university students (n = 114) from the Murcia Region (Spain). Sperm DNA fragmentation index (SDF) was defined as the percentage of sperm with fragmented DNA divided by the total amount of assessed sperm. The rate of sperm DNA fragmentation (rSDF) was determined by periods of incubation according to the sperm chromatin dispersion test. SDF and its dynamics were evaluated after incubation for 2.5, 17 and 24 h at 37 °C. Parametric and non-parametric tests were used for statistical analyses.

Results: Mean basal SDF was 27.2% (SD 14.4) and rSDF was significantly higher in the first period of incubation compared to the following periods of incubations. The rate of sperm DNA degradation during the first 2.5 h (5,5%/h) was significantly higher in those samples with a basal SDF above 30%.

Conclusions: These results indicate that our mean values of SDF are relatively higher compared to other published studies and corroborate that rSDF is significantly higher during the first hours after ejaculation. Moreover, samples with basal SDF above 30% showed higher rSDF during the first hours of incubation compared to the samples with basal SDF below 15%.

Dirección url donde se encuentra publicado: <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-internacional-andrologia-262-articulo-estudio-dinamica-fragmentacion-del-acido-90387352>